

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**NEUROTRANSMISSÃO DO COMPONENTE
SIMPÁTICO DO QUIMIORREFLEXO NO NTS
CAUDAL NA PREPARAÇÃO CORAÇÃO-TRONCO
CEREBRAL ISOLADOS DE RATOS**

VALDIR DE ANDRADE BRAGA

Ribeirão Preto

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

VALDIR DE ANDRADE BRAGA

**NEUROTRANSMISSÃO DO COMPONENTE
SIMPÁTICO DO QUIMIORREFLEXO NO NTS
CAUDAL NA PREPARAÇÃO CORAÇÃO-TRONCO
CEREBRAL ISOLADOS DE RATOS**

**Tese de Doutorado apresentada à área de Pós-
graduação do Departamento de Fisiologia da Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto, como parte das
exigências para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências.**

Orientador: Prof. Dr. Benedito Honório Machado

“Morrer ignorante sabendo que tinha a capacidade de ter sido sábio, isto sim, é uma tragédia humana.”

Willian Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Com muita consideração e respeito, agradeço:

À minha mãe Maria de Andrade Braga, pelo amor, incentivo, coragem e dedicação que a fez optar por anular a própria vida em função de um ideal: a minha formação.

À memória do meu pai Waldyr Vianna Braga, um homem de muita visão, o qual sonhou em ter um filho doutor e infelizmente faleceu antes que eu começasse a andar ou falar, mas que agora, onde quer que ele esteja, tenho a certeza de estar muito feliz por ter seu sonho realizado.

Aos meus irmãos Valéria e Renan pela compreensão da minha ausência em suas vidas. Mesmo assim, o carinho, o amor e a amizade nos mantiveram sempre unidos apesar da distância geográfica que nos separou por tanto tempo.

À Fabiola da Cruz Nunes Braga, a pessoa que pelas mãos de Deus passou a fazer parte da minha vida e que nunca mediu esforços em me incentivar e apoiar com muito amor, carinho, sabedoria e respeito a ponto de deixar a segurança de seu mundo e buscar novas realizações ao meu lado.

Ao Prof. Benedito H. Machado que, ao longo desses anos de convivência, conduziu a minha orientação com muito profissionalismo e dedicação, me guiando cientificamente desde os primeiros passos até a coragem para alçar vôos cada vez mais altos.

Ao Professor Jeffrey T Potts e sua Pós-doutoranda Angelina Y. Fong, os quais “abriram as portas” do seu laboratório proporcionando-me uma experiência científica e cultural internacional que certamente enriqueceu minha formação.

Aos membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Sérgio Luiz Domingues Cravo, Prof. Dr. Eduardo Colombari, Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas e Prof. Dr. Wamberto Antônio Varanda pelas discussões e sugestões apresentadas durante a fase final deste trabalho.

Aos professores e mestres do departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Luís, Frederico, Marinho, Wellington, Generoso e todos aqueles que me apoiaram durante a graduação e no início da minha pós-graduação em Ribeirão Preto.

Ao professor e amigo Marcelo Abidu Figueiredo, meu primeiro orientador durante a graduação, o qual me ensinou que a relação entre orientador e orientado não se baseia apenas na ciência, mas sim em toda uma lição de vida.

Aos amigos Carlos Alberto Aguiar, Leni Gomes Heck Bonagamba, Mauro de Oliveira e Jaci Ayrton Castania pelo apoio técnico, amizade e companheirismo.

Ao amigo Felipe que me apresentou ao Prof. Benedito e ao amigo Vagner que me ensinou os primeiros passos na preparação coração-tronco cerebral isolados.

Ao amigo Daniel B. Zoccal que me apoiou nos momentos que mais precisei, me ajudando a superar algumas dificuldades encontradas no caminho.

Aos meus amigos de sempre: Cadu, Daniela, João, Luciano, Alex, Renato, Gisela, Josiane, Karin, Luciana, Daniel Penteado, Patrícia de Paula, Valter, Jussara, Érica, Giuliana, Géssica, Domitila, e muitos outros, pelos momentos inesquecíveis de convivência e pelas lições aprendidas no dia-a-dia.

A todos os Docentes deste Departamento que souberam conduzir, com extrema competência, meus conhecimentos na área de Fisiologia.

Aos funcionários da secretaria deste departamento: Elisa, Fernando, Cláudia e Carlos, pela competência e prontidão em todos os serviços por eles prestados.

Ao Leonardo e Eduardo pelo zelo com os animais de experimentação no biotério, pois sem eles certamente esta etapa não seria concluída e também pela sincera amizade.

Aos funcionários da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelos auxílios prestados durante a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	08
2. OBJETIVO	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
4. RESULTADOS	39
5. DISCUSSÃO	89
6. RESUMO	109
7. SUMMARY	112
8. REFERÊNCIAS	115
9. APÊNDICE	126
10. PUBLICAÇÕES	149

1. INTRODUÇÃO

O controle do sistema cardiovascular dos mamíferos envolve diversos mecanismos, os quais promovem um maior afluxo sanguíneo para os tecidos em atividade e realizam uma redistribuição do sangue frente a situações de alteração na homeostase corporal. Este controle tem por objetivo preservar um aporte sanguíneo adequado para todos os tecidos, principalmente para o encéfalo e para o coração, o que é feito principalmente por mecanismos neurais.

Os mecanismos neurais de controle do sistema cardiovascular caracterizam-se por promoverem ajustes rápidos na pressão arterial e envolvem a participação de sensores periféricos, os quais transmitem as informações captadas para regiões específicas do sistema nervoso central, onde ocorre a integração destas informações, promovendo alterações nas atividades eferentes simpática e parassimpática. Dentre os mecanismos neurais mais importantes para o controle da função cardiovascular destacam-se o barorreflexo, o reflexo cardiopulmonar e o quimiorreflexo.

O quimiorreflexo é um importante mecanismo neural envolvido no controle cardiovascular e respiratório. Os quimiorreceptores periféricos, localizados nos corpúsculos carotídeos, são estruturas especializadas em detectar alterações nas pressões parciais de oxigênio e gás carbônico bem como variações no pH (Biscoe e cols., 1967; 1969; Biscoe e Duchon, 1990). Quando um animal é submetido a situações de hipóxia ocorre uma excitação das células quimiossensíveis, as quais deflagram potenciais de ação que se propagam pelo nervo carotídeo em direção ao sistema nervoso central (González e cols., 1995).

Em um estudo clássico de Bernthal (1938) foi demonstrado que a estimulação química dos quimiorreceptores carotídeos com cianeto de sódio em cães promoveu vasoconstrição periférica, a qual foi também acompanhada por um aumento da frequência

respiratória. Estudos de Franchini e Krieger (1993) e Haibara e cols. (1995) mostraram que a ativação periférica do quimiorreflexo por meio da injeção de KCN (i.v.) em ratos não-anestesiados promove aumento na pressão arterial, intensa bradicardia e taquipnéia. Além disso, Haibara e cols. (1995) demonstraram que as respostas cardiovasculares à estimulação dos quimiorreceptores periféricos (resposta pressora e bradicardia) são resultantes da ativação de dois mecanismos autonômicos independentes: 1) a elevação na pressão arterial, decorrente do aumento na atividade simpática, a qual foi praticamente bloqueada pela prévia injeção (i.v.) de prazosin (antagonista α_1 -adrenérgico) sem alterar a resposta de bradicardia e, 2) a resposta bradicárdica, decorrente da ativação da via parassimpática, a qual foi bloqueada pela prévia injeção (i.v.) de metileno-atropina (antagonista dos receptores colinérgicos) sem alterar a resposta pressora.

Vale destacar que as respostas cardiovasculares promovidas pela ativação do quimiorreflexo em ratos anestesiados podem ser diferentes daquelas promovidas em ratos não-anestesiados. Estudos de Franchini e Krieger (1993) documentaram que o anestésico pentobarbital quase aboliu a resposta bradicárdica decorrente da ativação do quimiorreflexo e que, de modo similar ao anestésico cloralose, bloqueou a resposta pressora. Portanto, estudos envolvendo o processamento do quimiorreflexo no sistema nervoso central, devido aos seus múltiplos aspectos integrativos, devem ser preferencialmente realizados em modelos experimentais nos quais não sejam utilizados anestésicos.

O núcleo do trato solitário (NTS) é a região do tronco cerebral na qual ocorre a primeira sinapse das aferências dos reflexos cardiovasculares no sistema nervoso central (Mifflin, 1992, Ciriello e cols., 1994). Este núcleo é formado por um conjunto heterogêneo de neurônios localizados na porção dorso-medial do bulbo, o qual no seu aspecto rostro-

caudal se estende como colunas bilaterais que se unem na porção mais caudal (Ciriello e cols., 1994). O NTS pode ser dividido de acordo com sua localização no sentido rostro-caudal em NTS rostral, NTS intermediário e NTS caudal (Lowey, 1990). Estudos com marcadores retrógrados e estudos funcionais têm demonstrado que as terminações das aferências dos barorreceptores estão situadas na porção intermediária do NTS (Ciriello e cols., 1994; Ruggiero e cols., 1994). Por outro lado, vários estudos mostraram que as aferências dos quimiorreceptores carotídeos fazem as suas primeiras sinapses principalmente nas sub-regiões mediais e laterais do NTS caudal (Housley & Sinclair, 1988; Spyer e cols., 1990; Vardhan e cols., 1993; Chitravanshi e cols., 1994 e Chitravanshi & Sapru, 1995).

Evidências neuroquímicas, neuroanatômicas e funcionais sugerem que o aminoácido L-glutamato é o principal neurotransmissor das aferências do barorreflexo no NTS (Gordon & Talman, 1992; Ciriello e cols. 1994). Estudos sobre a neurotransmissão das aferências dos quimiorreceptores no NTS evidenciaram que durante a hipóxia sistêmica ou estimulação química dos quimiorreceptores carotídeos houve um aumento nos níveis extracelulares de L-glutamato no NTS caudal, sendo esses efeitos abolidos após a secção do nervo do seio carotídeo (Mizusawa e cols., 1994). Nesse mesmo estudo, Mizusawa e cols. demonstraram também que o L-glutamato, quando microinjetado no NTS, promoveu aumento nos parâmetros ventilatórios e além disso, o pré-tratamento com antagonistas glutamatérgicos no NTS reduziu as respostas ventilatórias induzidas pela hipóxia.

Estudos de Vardhan e cols. (1993) e Zhang & Mifflin (1993) investigaram o papel do L-glutamato na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS de ratos anestesiados com uretana ou com uma combinação de uretana com cloralose, respectivamente. Esses estudos mostraram que a resposta pressora do quimiorreflexo foi abolida após a microinjeção de

diferentes antagonistas dos receptores glutamatérgicos no NTS caudal. Entretanto, como discutido anteriormente, esses experimentos foram conduzidos sob anestesia, a qual pode ter contribuído para a supressão dessa resposta. Estudos eletrofisiológicos recentes de Accorsi-Mendonça e cols. (2006) mostraram que o anestésico uretana pode afetar profundamente a neurotransmissão GABAérgica no NTS.

Os primeiros estudos sobre o envolvimento dos receptores glutamatérgicos do NTS de ratos não-anestesiados nas respostas cardiovasculares promovidas pela ativação dos quimiorreceptores periféricos foram realizados por Haibara e cols. (1995). Nestes estudos os autores mostraram que a prévia microinjeção de AP-5 (antagonista dos receptores ionotrópicos do glutamato do subtipo NMDA) no NTS de ratos não-anestesiados produziu uma redução dose-dependente da bradicardia do quimiorreflexo. No entanto, a resposta pressora e a taquipnéia promovidas pela injeção intravenosa de KCN não foram afetadas. Esse estudo mostrou que o componente parassimpático do quimiorreflexo no NTS é mediado por receptores ionotrópicos de glutamato do subtipo NMDA.

Uma vez caracterizada a participação dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA na neurotransmissão do componente parassimpato-excitatório do quimiorreflexo, estudos de Haibara e cols. (1999) buscaram esclarecer se a resposta pressora à ativação do quimiorreflexo com KCN era mediada por receptores glutamatérgicos do subtipo não-NMDA. Assim, os autores mostraram que o DNQX (um antagonista seletivo para os receptores não-NMDA) e o ácido quinurênico (um antagonista não seletivo de receptores de aminoácidos excitatórios), microinjetados bilateralmente no NTS promoveram uma atenuação da resposta pressora, o que poderia a princípio, sugerir a participação destes receptores e do L-glutamato na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo. Porém, a microinjeção desses antagonistas no NTS promoveu uma

elevação significativa da pressão arterial basal, o que poderia explicar, pelo menos em parte, a redução na magnitude da resposta pressora à ativação do quimiorreflexo. O novo patamar assumido pela pressão arterial basal após a microinjeção dos antagonistas glutamatérgicos no NTS impediu que a resposta pressora do quimiorreflexo se expressasse em sua plena magnitude, uma vez que o grau de constrição da parede vascular decorrente da atividade simpática seria um fator limitante da expressão do aumento da atividade simpática decorrente da ativação do quimiorreflexo e conseqüente vasoconstrição adicional. Entretanto, essa interessante possibilidade necessita de confirmação experimental. Os autores sugeriram que os efeitos cardiovasculares (aumento da pressão arterial basal) observados, quando da microinjeção bilateral de DNQX ou de ácido quinurênico no NTS, seriam devido ao bloqueio da via simpato-inibitória do barorreflexo.

Recentemente, Machado e Bonagamba (2005) conduziram um estudo no qual foi realizada a microinjeção de ácido quinurênico em diferentes sítios no NTS caudal e intermediário. Após a microinjeção do ácido quinurênico, os autores promoveram a ativação do quimiorreflexo associada à infusão periférica de nitroprussiato de sódio (um doador de óxido nítrico) com o objetivo de manter a pressão arterial basal próxima aos valores observados antes da microinjeção do antagonista no NTS. Assim, os autores demonstraram que o antagonismo dos receptores glutamatérgicos no NTS não afetou a magnitude da resposta pressora do quimiorreflexo, sugerindo que outros neurotransmissores além do glutamato poderiam estar envolvidos na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS.

Existem evidências na literatura de que a liberação de glutamato no NTS envolve a participação do ATP. Estudos de Kato e Shigetomi (2001), por meio de registros na configuração “whole-cell patch-clamp” em neurônios de segunda ordem de fatias da porção

caudal do NTS, mostraram que o ATP após ser degradado em adenosina atua nos receptores A1 pré-sinápticos inibindo a liberação do glutamato. Por outro lado, o efeito direto do ATP atuando pré-sinápticamente nos receptores P2X estimula a liberação do glutamato. Posteriormente, Jin e cols. (2004) mostraram, por meio de estudos eletrofisiológicos, que a ativação dos receptores purinérgicos P2 pelo α,β -metileno-ATP (um agonista dos receptores P2 que não é degradado em adenosina) no NTS promove a liberação de glutamato. Além disso, Shigetomi e Kato (2004), por meio da técnica de patch-clamp em fatias do NTS caudal, mostraram que a liberação de glutamato pelo α,β -metileno-ATP envolve um mecanismo dependente de canais de Ca^{+2} .

O papel do ATP como neurotransmissor/neuromodulador foi sugerido pela primeira vez por Burnstock (1972). Estudos de imunohistoquímica demonstraram a presença de receptores purinérgicos P2X ao longo de todo o NTS, com uma predominância dos receptores P2X2 e P2X3 no NTS caudal (Llewellyn-Smith & Burnstock, 1998; Yao e cols., 2001). Estudos funcionais mostraram que o ATP desempenha importante função como neurotransmissor em áreas bulbares envolvidas com o controle cardiovascular, como por exemplo, no NTS (Phillis e cols. 1997; Scislo e cols. 1997 e 1998; Scislo e O'Leary, 1998).

Trabalhos de Scislo & O'Leary, (1998 e 2000); Scislo e cols. (1998) mostraram que as microinjeções de ATP e de seus análogos sintéticos (α,β -metileno-ATP e 2-metil-ATP) no NTS de ratos anestesiados promoveram hipotensão, bradicardia e diminuição da atividade simpática de forma dose-dependente. Além disso, esses mesmos autores mostraram que estas respostas foram bloqueadas pelo pré-tratamento com suramina, um antagonista não seletivo dos receptores P2. Estudos de Paula e cols. (2004) mostraram que a microinjeção de ATP no NTS intermediário de ratos não-anestesiados promoveu

resposta pressora e bradicardia de maneira dose-dependente, um perfil de resposta cardiovascular muito semelhante aquele promovido pela ativação do quimiorreflexo. Além disso, Antunes e cols. (2005a) mostraram que a microinjeção do ATP em diferentes sub-regiões do NTS de ratos não-anestesiados promoveu respostas hemodinâmicas e respiratórias distintas. Esses autores demonstraram que a microinjeção do ATP no NTS intermediário promoveu resposta pressora, bradicárdica e apnéia. Por outro lado, quando o ATP foi microinjetado no NTS caudal, esse agonista promoveu aumento da pressão arterial, bradicardia de pequena magnitude e taquipnéia, um padrão de respostas muito semelhante aquele observado quando da ativação do quimiorreflexo.

No presente estudo, testamos a hipótese de que a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal poderia envolver uma participação conjunta do glutamato e do ATP. Para explorar essa hipótese, optamos por utilizar uma metodologia que nos permitisse avaliar a atividade simpática em uma condição experimental na qual a pressão arterial estivesse reduzida a níveis suficientes para não ativar os barorreceptores, os quais regulam os níveis de pressão arterial batimento a batimento. Nessa nova condição experimental, os níveis de pressão foram mantidos entre 50 e 70 mmHg. Esses níveis de pressão de perfusão nos permitiram a avaliação da atividade eferente simpática livre da influência da modulação exercida pelos barorreceptores. Assim, a microinjeção de diferentes antagonistas no NTS caudal não afetou a linha de base da pressão, a qual foi mantida constante pelo sistema de perfusão artificial.

Para os estudos do quimiorreflexo em uma condição experimental onde os níveis de pressão arterial não interferiam com a avaliação do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo, adotamos como metodologia a preparação coração-tronco cerebral isolados (WHBP), a qual permitiu o registro direto da atividade eferente simpática. O uso desta

preparação possibilitou a avaliação das variações na frequência de despolarização do nervo eferente simpático torácico em resposta à ativação do quimiorreflexo, antes e após a microinjeção de antagonistas de receptores glutamatérgicos e purinérgicos no NTS. Assim, avaliamos a papel do L-glutamato, do ATP e dos seus respectivos receptores na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS. Além disso, utilizando a preparação WHBP, registramos a atividade do nervo frênico, a qual nos permitiu aferir o comportamento do componente respiratório do quimiorreflexo por meio de sua frequência de despolarização antes e após as microinjeções de diferentes antagonistas glutamatérgicos e purinérgicos no NTS.

A preparação WHBP foi desenvolvida por Paton (1996) e consiste em uma preparação “in situ” do coração e do tronco cerebral, na qual a integridade funcional das frequências de despolarização dos neurônios motores respiratórios e cardiovasculares possibilita uma adequada análise eletrofisiológica. Esta preparação também permite uma melhor visualização do NTS para a realização das microinjeções, uma vez que todo o tronco cerebral está exposto e acessível. Isto foi relevante para o nosso estudo, pois permitiu explorar áreas de difícil acesso quando se utiliza o animal não-anestesiado, como foi o caso das sub-regiões mais caudais do NTS. Nos estudos realizados “*in vivo*”, o osso occipital se sobrepõe a essa área e a implantação de cânulas-guia em direção a estas sub-regiões é tecnicamente inviável. Além disso, esta preparação tem perfusão artificial e como tal, as variações da pressão arterial observadas no rato intacto decorrentes das microinjeções de ácido quinurênico, não mais ocorreram nesta condição experimental, pois a pressão de perfusão (50 - 70 mmHg) foi determinada pela bomba peristáltica, o que facilitou a análise e interpretação dos resultados relativos à atividade eferente simpática.

No presente estudo, avaliamos os componentes simpato-excitatório, parasimpato-excitatório e respiratório do quimiorreflexo periférico utilizando a preparação WHBP, por meio da qual registramos a atividade simpática, diretamente do nervo eferente simpático torácico, em resposta à ativação do quimiorreflexo, antes e após as microinjeções de diferentes antagonistas de receptores glutamatérgicos e purinérgicos e no NTS caudal.

2. OBJETIVO

- Avaliar a possível participação do L-glutamato e do ATP, bem como dos seus respectivos receptores na neurotransmissão dos componentes simpato-excitatório, parassimpato-excitatório e respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal utilizando a preparação coração-tronco cerebral isolados a qual permite o registro direto da atividade eferente simpática e do nervo frênico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Nesse trabalho foram utilizados ratos *Wistar* fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Esses animais foram alojados no biotério de manutenção do Departamento de Fisiologia em caixas coletivas (5 ratos/caixa), alimentados com ração granulada e água de torneira “*ad libitum*” e mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12 horas. Para a realização da preparação coração-tronco cerebral isolados o peso dos animais variou entre 70 a 90 gramas. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 120/2005).

3.2. Preparação coração-tronco cerebral isolados (WHBP)

Para avaliação da atividade simpática, do nervo frênico e da frequência cardíaca em resposta as microinjeções de agonistas e/ou antagonistas dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos no NTS foi utilizada a preparação coração-tronco cerebral isolados (“working heart-brainstem preparation” – WHBP) descrita por Paton (1996).

3.2.1. Procedimentos cirúrgicos

No procedimento cirúrgico para a obtenção da preparação WHBP os animais foram anestesiados por meio da inalação de halotano (AstraZeneca do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil) em uma câmara previamente saturada e em seguida foram rapidamente hemiseccionados ao nível sub-diafragmático. Logo após, a cabeça e o tórax foram submersos em solução de fluido cerebrospinal artificial (ACSF) resfriada em gelo (5° C) e aerada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% de CO₂). Na etapa seguinte o animal foi descerebrado ao nível pré-colicular e a pele foi totalmente removida para evitar que os pêlos pudessem

contaminar a solução de perfusão e obstruir o sistema de perfusão, o qual será descrito mais adiante. Logo após foi feito o isolamento da aorta descendente para posterior canulação e a remoção das costelas na porção lateral esquerda do tórax para permitir melhor exposição do coração e facilitar o acesso à cadeia simpática paravertebral. Os pulmões foram retirados e o nervo frênico esquerdo foi isolado e cortado na base do diafragma. A superfície dorsal do tronco cerebral foi exposta pela remoção do osso occipital, da duramáter e do cerebelo. Os procedimentos cirúrgicos duraram em média 5 minutos. Após esses procedimentos a preparação foi transferida para uma câmara de registros e perfundida retrogradamente através da aorta descendente com uma solução de ACSF acrescida de Ficoll (ver item 3.2.2) por meio de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow 505S, Falmouth, Inglaterra). Essa bomba proporciona fluxo e pressão de perfusão para que o tronco cerebral e o coração sejam perfundidos adequadamente. O perfusato foi continuamente aerado com mistura carbogênica e aquecido através de um trocador de calor a uma temperatura de aproximadamente 32°C. Esse perfusato, antes de alcançar a preparação, foi filtrado através de um filtro de polipropileno de 25 mm de diâmetro com uma malha de 25 µm (Millipore, PP25). A filtração tem por finalidade evitar a passagem de coágulos sanguíneos e restos de tecidos em suspensão para o interior da preparação. Finalmente o perfusato passava através de uma “armadilha para bolhas”, a qual possui duas funções: (1) evitar a passagem de bolhas para a preparação e (2) amortecer as pulsações geradas pela bomba peristáltica.

A **figura 1** corresponde a uma representação esquemática da preparação e de todos os equipamentos necessários para o seu funcionamento. Todos os tubos utilizados no sistema são impermeáveis ao O₂ e ao CO₂ (Tygon Cole Palmer, ID: 1,56 mm; OD: 4,7 mm). A porção final do tubo é uma cânula de duplo lúmen (Portex: ID: 0,28mm; OD: 0,61

mm), sendo um para a perfusão e outro para o registro da pressão de perfusão (PP). Essa cânula estava conectada a um transdutor de pressão (PT 300, Grass Telefactor, West Warwick, RI, USA). O sinal era então transferido para um amplificador (Model 15A12 DC/AC Strain Gage Amplifier; Grass Telefactor, West Warwick, RI, USA) e deste para o computador no qual se encontra instalado o software Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) para aquisição e análise dos sinais.

3.2.2. Solução de Perfusão (Fluido cerebrospinal artificial - ACSF - modificado)

A solução artificial usada na perfusão da preparação substitui o sangue e é utilizada para manter a preparação viável durante todo o experimento. A solução era composta por 125 mM de NaCl, 24 mM de NaHCO₃, 5 mM de KCl, 2,5 mM de CaCl₂, 1,25 mM de MgSO₄, 1,25 mM de KH₂PO₄ e 3,6 g de glicose, diluídos em água deionizada. Outras substâncias foram adicionadas à solução de perfusão, tais como um agente oncótico (Ficoll 70, 1.25%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e um bloqueador da transmissão neuromuscular (Brometo de vecurônio 0,4 mg/mL; Organon do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Quando todos os procedimentos foram padronizados a preparação se manteve viável por períodos de 2 a 3 horas, o que permitiu a completa realização de todos os protocolos experimentais.

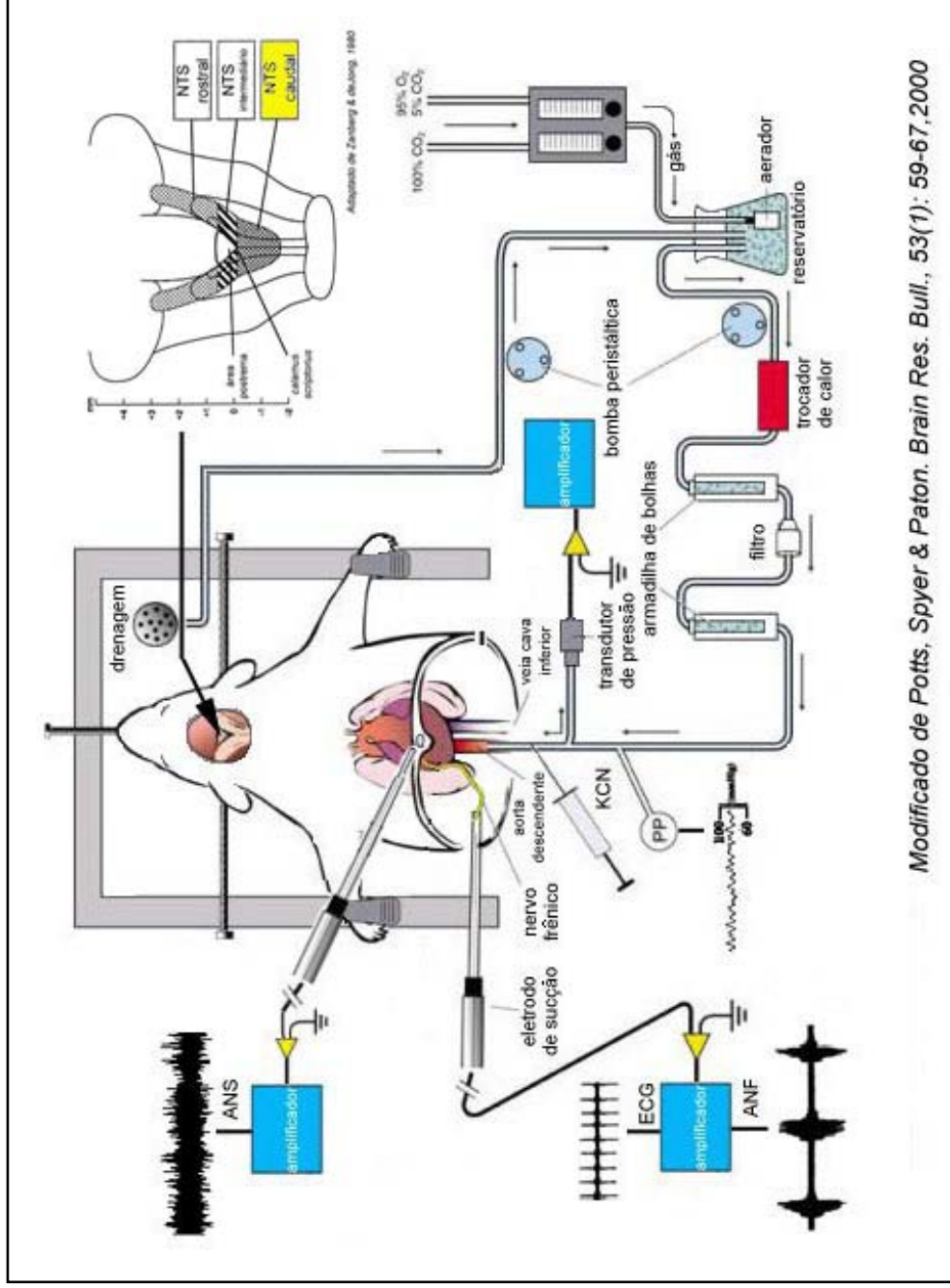


Figura 1: Esquema ilustrativo da preparação coração-tronco cerebral isolado (WHBP). ANF: atividade do nervo frênico; ANS: atividade do nervo simpático torácico; ECG: eletrocardiograma; PP: pressão de perfusão da bomba; NTS: núcleo do trato solitário (Modificado de Potts e cols., 2000).

3.2.3. Registros da atividade do nervo frênico, da frequência cardíaca e da atividade do nervo simpático torácico na preparação WHBP

Os potenciais do nervo frênico foram registrados fazendo-se uma sucção da extremidade previamente seccionada ao nível do diafragma. Para isso utilizamos uma micropipeta de vidro (diâmetro: 0,2 - 0,3 mm) com um fio de prata no seu interior. Esta micropipeta foi conectada a um pré-amplificador (INSIGHT Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil) o qual estava conectado a um amplificador (INSIGHT Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Do amplificador os sinais analógicos foram convertidos em digitais por uma unidade conversora analógico-digital CED 1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) e dessa unidade os sinais foram enviados para o computador e processados pelo programa Spike 2. Ao registrar a atividade do nervo frênico, obtêm-se simultaneamente o eletrocardiograma (ECG) e partir deste o programa Spike 2, utilizando um biotacômetro digital, deriva os batimentos cardíacos a partir das ondas R do eletrocardiograma proporcionando a avaliação da frequência cardíaca.

Após a dissecação da cadeia simpática paravertebral, o nervo eferente simpático torácico também foi seccionado, ao nível de T₅ a T₁₀, e seus potenciais foram registrados por meio de um outro eletrodo de vidro seguindo os mesmos procedimentos para o registro da atividade do nervo frênico (ANF), sendo utilizado um pré-amplificador fabricado na Universidade de Bristol, Inglaterra. Por meio deste registro, obtivemos a frequência de despolarização do nervo eferente simpático torácico. Os potenciais do nervo frênico foram adquiridos numa frequência de amostragem de 5000 Hz enquanto que os do nervo simpático foram adquiridos numa frequência de amostragem de 10000 Hz. A análise dos potenciais do nervo frênico, simpático e as alterações na frequência cardíaca foram feitas

após os registros por meio do programa Spike2 (Cambridge Eletronic Design, Cambridge, Reino Unido). A **figura 2** ilustra os registros da atividade dos nervos frênico e simpático (registros originais e integrados) em escala expandida.

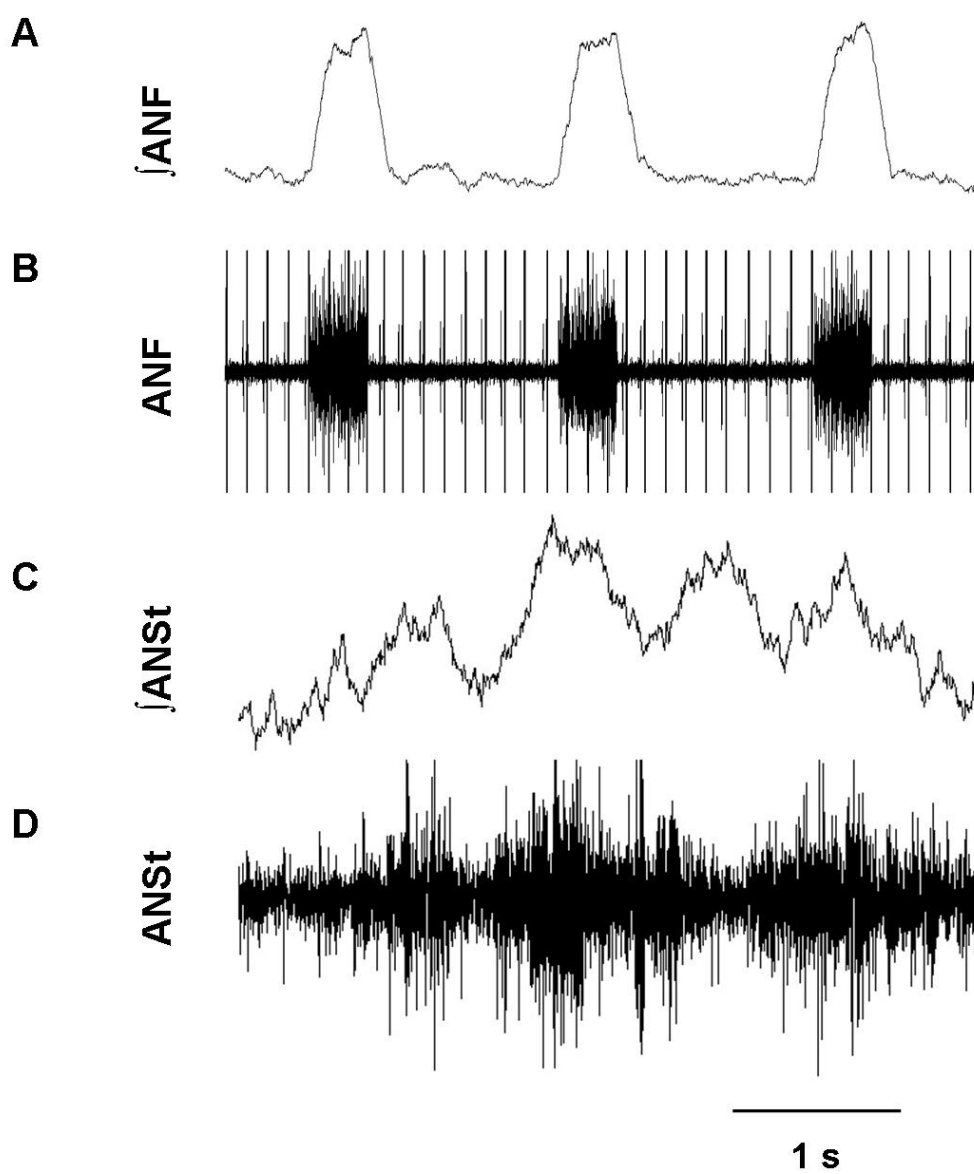


Figura 2: Registros das atividades basais dos nervos frênico (A e B) e simpático torácico (C e D). Os painéis A e C representam os registros após integração e os painéis B e D representam os registros originais.

3.2.4. *Ativação do quimiorreflexo na preparação WHBP*

Para a ativação do quimiorreflexo utilizamos o cianeto de potássio (KCN 0,05 %/0,05mL) o qual foi injetado na aorta descendente por meio de uma seringa acoplada ao sistema de perfusão. O KCN promove uma hipóxia-citotóxica nas células quimiossensíveis dos corpúsculos carotídeos (células glomus) e geram as respostas características da ativação do quimiorreflexo, ou seja, aumento na atividade dos nervos frênico e simpático e queda na frequência cardíaca como ilustrado na figura 4.

3.2.5. Microinjeções no NTS na preparação WHBP

As drogas utilizadas em nossos estudos foram microinjetadas no NTS caudal por meio de pipetas de vidro, do tipo multicanal, confeccionadas em nosso laboratório. Essas micropipetas foram conectadas a uma bomba (PICOSPRITZER II – Parker Hannifin Corporation, General Valve Division, Fairfield, NJ, USA) que permite a microinjeção das drogas por meio de “pulsos de pressão”. Inicialmente a bomba “Picospritzer II” foi calibrada para que o volume microinjetado fosse equivalente a 20 nL para todas as drogas utilizadas. O sítio das microinjeções no NTS caudal foi determinado com auxílio das coordenadas estereotáxicas do Atlas de Paxinos e Watson em relação ao *calamus scriptorius*, o qual foi visualmente identificado com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Zeiss) e definido como ponto zero. Para microinjeções no NTS caudal utilizamos as seguintes coordenadas: AP: -0,3 mm; DV: 0,4 mm; L: 0,3 mm. O pH das soluções microinjetadas foi ajustado com bicarbonato de sódio (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para valores próximos a 7,4.

3.3. Drogas e soluções utilizadas

- Ácido L-glutâmico monossódico - Aminoácido excitatório (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA).
- Cianeto de Potássio (KCN) - Para a ativação do quimiorreflexo (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA);
- Ácido quinurênico (KYN) - Antagonista não seletivo de receptores ionotrópicos de AAE (RBI, Natick, MA, EUA);
- (+/-)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG) - Antagonista não seletivo de receptores metabotrópicos de AAE (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA);
- Trans-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic acid (*trans*-ACPD) - Agonista dos receptores metabotrópicos de AAE (RBI, Natick, MA, EUA).
- Pyrinoxalphosphate-6-azophenil-2',4'-disulphonic acid tetrasodium salt (PPADS) - antagonista de receptores purinérgicos P2 (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA);
- α,β -metileno-ATP - Agonista de receptores purinérgicos P2 (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA).
- ACSF - Fluido cerebrospinal artificial - usado para a perfusão.
- Solução fisiológica estéril [NaCl 154 mM; (0,9%) - veículo].

3.4. Análise dos resultados

Todas as análises dos sinais adquiridos foram feitas após os registros utilizando o programa Spike 2. Para o nervo simpático o sinal adquirido foi retificado, o ruído foi determinado pela adição de hexametônio ao perfusato (25 mg/Kg, **Figura 3**) o qual foi subtraído do sinal retificado e então foi feita a integração utilizando uma constante de tempo de 100 ms. O mesmo padrão de integração foi obedecido para o nervo frênico. A

freqüência de envelopes de potenciais do nervo frênico foi quantificada a cada 10 segundos iniciando 40 segundos antes e se encerrando 50 segundos após dos tratamentos. Esses dados foram expressos em gráficos de linha e chamados de análise de seqüências temporais do nervo frênico. Além da análise das seqüências temporais, foi feita também a análise do pico da resposta onde avaliamos a freqüência de despolarização do nervo frênico durante os 10 segundos antes e 10 segundos após os tratamentos. Optamos pela utilização da freqüência de despolarização do nervo frênico e não da amplitude, pois para os registros foram utilizados eletrodos de sucção monopolares e a amplitude do sinal depende da qualidade do selo na ponta do eletrodo. Os valores da atividade do nervo frênico foram expressos em freqüência (Hz) e em variações da freqüência (Δ Hz). Com relação à análise da atividade simpática, após a integração dos sinais, avaliamos a atividade simpática 20 segundos antes e 20 segundos após os tratamentos, sendo quantificado o valor do pico da resposta após o tratamento. Os valores foram normalizados e expressos em valores percentuais (Δ %). Para a freqüência cardíaca, após a derivação deste parâmetro a partir do ECG, avaliamos as diferenças entre os valores basais e os valores pós-tratamentos. Os dados da freqüência cardíaca foram expressos em variações nos batimentos cardíacos por minuto (Δ bpm).

3.5. Análise estatística

Os resultados apresentados estão expressos como média \pm epm (erro padrão da média). Aos dados obtidos foi aplicada análise de variância para medidas repetidas (ANOVA One-way). Quando houve significância estatística utilizamos o pós-teste de Tukey pareado para múltiplas comparações. O nível de significância foi fixado com $p < 0,05$. Exceção foi feita para a análise das seqüências temporais da atividade do nervo

frênico, a qual foi aplicada a análise de variâncias para medidas repetidas (ANOVA Two-way) seguida do pós-teste de Bonferroni.

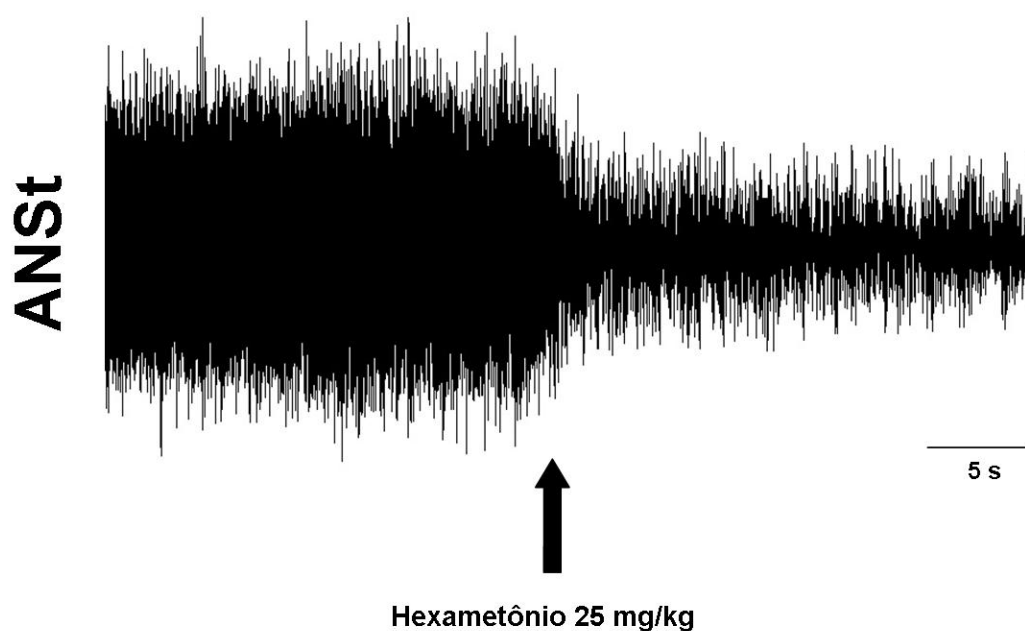


Figura 3: Registro da atividade simpática ao final de um experimento antes e após a adição de hexametônio (25mg/Kg) na solução de perfusão para a determinação do nível de ruído.

3.6. Análise histológica

Após os experimentos, os troncos cerebrais foram removidos e colocados em frascos contendo formalina 10% para fixação por imersão. Sete dias após o início da fixação os troncos cerebrais foram encaminhados para processamento histológico onde foram inseridos em blocos de parafina e cortados em fatias de 16 μm de espessura. Essas fatias foram montadas em lâminas e coradas pelo método de Nissl. Somente os animais que

apresentaram o sítio de microinjeção na região do NTS caudal foram considerados positivos e incluídos nos grupos de resultados.

3.7. Protocolos experimentais

3.7.1. Protocolo I: Alterações na atividade dos nervos frênico e simpático e na frequência cardíaca promovidas pela ativação dos quimiorreceptores arteriais com KCN na preparação WHBP

Logo após a estabilização dos registros do nervo frênico, simpático e frequência cardíaca na preparação WHBP foi injetado KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão com a finalidade de promover a ativação dos quimiorreceptores arteriais. Este protocolo teve como objetivo avaliar as alterações na atividade dos nervos frênico e simpático torácico e na frequência cardíaca decorrentes da ativação do quimiorreflexo com a finalidade de verificarmos se nas nossas condições experimentais a preparação WHBP seria um modelo experimental adequado para o estudo desse reflexo.

3.7.2. Protocolo II: Microinjeções de diferentes doses de L-glutamato no NTS caudal

Neste protocolo, realizamos microinjeções de diferentes doses de L-glutamato em seqüência aleatória no NTS caudal. Este protocolo teve o objetivo de estabelecer um padrão de respostas ao L-glutamato na preparação WHBP. Além disso, determinamos a partir dessas doses, uma dose intermediária de L-glutamato a ser utilizada nos experimentos subsequentes. Para o estabelecimento dessas microinjeções de diferentes doses de L-glutamato, no NTS caudal contralateral ao nervo frênico registrado (AP= -0,3, DV= 0,4 e L= 0,3 em relação ao *calamus scriptorius*) foram realizadas microinjeções de L-glutamato

nas concentrações de 5, 25, 50, 250 e 500 mM em um volume de 20 nL. A solução salina (NaCl 0,9 %) foi utilizada como controle (veículo). Realizamos nossas microinjeções na porção do NTS contralateral ao nervo frênico registrado, pois estudos de Mtui e cols (1993) mostraram que as projeções do NTS para o núcleo motor do frênico são predominantemente contralaterais. O intervalo entre as microinjeções foi de 15 minutos e as diferentes doses foram microinjetadas em seqüência aleatória. Durante a realização dos experimentos, foram avaliadas as possíveis alterações na frequência cardíaca, na atividade do nervo frênico e na atividade do nervo simpático torácico em resposta as microinjeções das diferentes doses de L-glutamato e do veículo.

3.7.3. Protocolo III: Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a microinjeção de L-glutamato no NTS caudal antes e após o antagonismo dos receptores ionotrópicos com ácido quinurênico

Neste protocolo avaliamos as respostas promovidas pela microinjeção do L-glutamato (50 mM) no NTS caudal antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores ionotrópicos do L-glutamato com ácido quinurênico (250 mM). Este protocolo teve o objetivo de mostrar que as respostas promovidas pela microinjeção do L-glutamato no NTS caudal eram passíveis de serem antagonizadas pelo antagonista glutamatérgico ácido quinurênico, o qual foi utilizado nos experimentos subseqüentes. Durante a realização dos experimentos, foram avaliadas as alterações na frequência cardíaca, na atividade do nervo frênico e na atividade do nervo simpático torácico em resposta à microinjeção de L-glutamato antes e após o antagonismo dos receptores ionotrópicos do L-glutamato no NTS caudal.

3.7.4. Protocolo IV: Microinjeções de diferentes doses de *trans*-ACPD no NTS caudal

Neste protocolo, realizamos microinjeções de diferentes doses de *trans*-ACPD em seqüência aleatória no NTS caudal. Este protocolo teve o objetivo de estabelecer um padrão de respostas ao *trans*-ACPD na preparação WHBP. Além disso, determinamos a partir dessas doses, uma dose intermediária de *trans*-ACPD a ser utilizada nos experimentos subseqüentes. Para o estabelecimento dessas microinjeções de doses crescentes de *trans*-ACPD, no NTS caudal contralateral ao nervo frênico registrado (AP= -0,3, DV= 0,4 e L= 0,3 em relação ao *calamus scriptorius*) foram realizadas microinjeções de *trans*-ACPD nas concentrações de 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 e 10 mM em um volume de 20 nL. A solução salina (NaCl 0,9 %) foi utilizada como controle (veículo). O intervalo entre as microinjeções foi de 15 minutos e as diferentes doses foram microinjetadas em seqüência aleatória. Durante a realização dos experimentos, foram avaliadas as alterações na frequência cardíaca, na atividade do nervo frênico e na atividade do nervo simpático torácico em resposta às microinjeções das diferentes doses de *trans*-ACPD e do veículo.

3.7.5. Protocolo V: Avaliação da frequência cardíaca e da atividade do nervo frênico em resposta a microinjeção de *trans*-ACPD no NTS caudal antes e após o antagonismo dos receptores metabotrópicos com MCPG

Neste protocolo, avaliamos as respostas promovidas pela microinjeção do *trans*-ACPD (2,5 mM) no NTS caudal antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores metabotrópicos do L-glutamato com MCPG (100 mM). Este protocolo teve o objetivo de mostrar que as respostas promovidas pela microinjeção do *trans*-ACPD no NTS caudal eram passíveis de serem antagonizadas pelo antagonista metabotrópico

glutamatérgico MCPG, o qual foi utilizado nos experimentos subseqüentes. Durante a realização dos experimentos, foram avaliadas as alterações na frequência cardíaca e na atividade do nervo frênico em resposta à microinjeção de *trans*-ACPD antes e após o bloqueio dos receptores metabotrópicos do L-glutamato no NTS caudal.

3.7.6. Protocolo VI: Avaliação da frequência cardíaca e da atividade do nervo frênico em resposta a microinjeção de L-glutamato no NTS caudal antes e após o duplo antagonismo dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos com ácido quinurênico e MCPG

Neste protocolo avaliamos as respostas promovidas pela microinjeção do L-glutamato (50 mM) no NTS caudal antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o duplo antagonismo dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos do L-glutamato com ácido quinurênico (250 mM) e MCPG (100 mM). Este protocolo teve como objetivo a avaliação das respostas promovidas pela microinjeção de L-glutamato no NTS caudal sob uma condição a qual tanto os receptores ionotrópicos quanto os receptores metabotrópicos do glutamato estavam bloqueados pelos seus respectivos antagonistas. Durante a realização dos experimentos, foram avaliadas as alterações na frequência cardíaca e na atividade do nervo frênico em resposta a microinjeção de L-glutamato antes e após o antagonismo dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos do L-glutamato no NTS caudal.

3.7.7. Protocolo VII: Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a ativação do quimiorreflexo periférico antes e após o antagonismo dos receptores ionotrópicos com ácido quinurênico (KYN, 250 mM) microinjetado bilateralmente no NTS caudal

Uma vez estabelecida a dose do antagonista (ácido quinurênico) capaz de atenuar mais de 50% da magnitude das respostas promovidas pela microinjeção do L-glutamato (50 mM), nesse protocolo o objetivo foi avaliar se a microinjeção bilateral do ácido quinurênico (250 mM) no NTS caudal afetava as respostas promovidas pela ativação do quimiorreflexo.

3.7.8. Protocolo VIII: Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a ativação do quimiorreflexo periférico antes e após o antagonismo dos receptores metabotrópicos com o MCPG (100 mM) microinjetado bilateralmente no NTS caudal

Uma vez estabelecida a dose do antagonista (MCPG) capaz de antagonizar as respostas promovidas pela microinjeção do agonista dos receptores metabotrópicos do L-glutamato (*trans*-ACPD, 2,5 mM), no presente protocolo o objetivo foi avaliar se a microinjeção bilateral do MCPG (100 mM) no NTS caudal afetava as respostas promovidas pela ativação do quimiorreflexo.

3.7.9. Protocolo IX: Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a ativação do quimiorreflexo periférico antes e após o duplo antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos com o ácido quinurênico combinado com o MCPG microinjetados bilateralmente no NTS caudal

Uma vez que a microinjeção do *trans*-ACPD no NTS caudal promoveu um aumento da frequência de despolarização do nervo frênico, um padrão de resposta respiratória semelhante ao da ativação do quimiorreflexo, no presente protocolo o objetivo foi avaliar das respostas parassimpato-excitatória, simpato-excitatória e respiratória do quimiorreflexo frente ao duplo bloqueio dos receptores glutamatérgicos no NTS caudal (receptores

ionotrópicos e metabotrópicos). Para tal, foram microinjetados o ácido quinurênico e o MCPG nas mesmas doses utilizadas nos protocolos anteriores.

3.7.10. Protocolo X: Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a ativação do quimiorreflexo periférico antes e após o duplo antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos com o ácido quinurênico combinado com o MCPG microinjetados em seis sítios ao longo do NTS

No presente protocolo o objetivo foi a avaliação das respostas parassimpato-excitatória, simpato-excitatória e respiratória do quimiorreflexo frente ao duplo bloqueio dos receptores glutamatérgicos (receptores ionotrópicos e metabotrópicos) ao longo de todo o NTS em seis diferentes sítios antero-posteriores. As microinjeções foram feitas de maneira bilateral no NTS caudal (AP=-0,3), ao nível do CS (AP=0,0) e no NTS intermediário (AP=+0,3). Para tal, foram microinjetados o ácido quinurênico e o MCPG nas mesmas doses utilizadas nos protocolos anteriores.

3.7.11. Protocolo XI: Microinjeções de diferentes doses de α,β -metileno-ATP no NTS caudal

Neste protocolo, realizamos microinjeções de diferentes doses de α,β -metileno-ATP em seqüência aleatória no NTS caudal. Este protocolo teve o objetivo de estabelecer um padrão de respostas ao α,β -metileno-ATP na preparação WHBP. Além disso, determinamos a partir dessas doses, uma dose intermediária de α,β -metileno-ATP a ser utilizada nos experimentos subseqüentes. Para o estabelecimento dessas microinjeções de diferentes doses de α,β -metileno-ATP, no NTS caudal contralateral ao nervo frênico

registrado (AP= -0,3, DV= 0,4 e L= 0,3 em relação ao *calamus scriptorius*) foram realizadas microinjeções de α,β -metileno-ATP nas concentrações de 5, 25, 50, 100 e 200 mM em um volume de 20 nL. A solução salina (NaCl 0,9 %) foi utilizada como controle (veículo). O intervalo entre as microinjeções foi de 15 minutos e as diferentes doses foram microinjetadas em seqüência aleatória. Durante a realização dos experimentos, foram avaliadas as alterações na frequência cardíaca, na atividade do nervo frênico e na atividade do nervo simpático torácico em resposta as microinjeções das diferentes doses de α,β -metileno-ATP e do veículo.

3.7.12. Protocolo XII: Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a microinjeção de α,β -metileno-ATP no NTS caudal antes e após o antagonismo dos receptores purinérgicos com PPADS

Neste protocolo avaliamos as respostas promovidas pela microinjeção do α,β -metileno-ATP (50 mM) no NTS caudal antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores purinérgicos com PPADS (10 e 20 mM). Este protocolo teve o objetivo de mostrar que as respostas promovidas pela microinjeção do α,β -metileno-ATP no NTS caudal eram passíveis de serem bloqueadas pelo antagonista purinérgico PPADS, o qual foi utilizado nos experimentos subseqüentes. Durante a realização dos experimentos, foram avaliadas as alterações na frequência cardíaca, na atividade do nervo frênico e na atividade do nervo simpático torácico em resposta à microinjeção de α,β -metileno-ATP antes e após o antagonismo dos receptores purinérgicos com PPADS nas doses de 10 e 20 mM no NTS caudal.

3.7.13. Protocolo XIII: Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores purinérgicos com PPADS (20 mM) microinjetado bilateralmente no NTS caudal

Uma vez estabelecida a dose do antagonista (PPADS, 20 mM) capaz de atenuar mais de 50% da magnitude das respostas promovidas pela microinjeção do α,β -metileno-ATP (50 mM) no NTS, no presente protocolo o objetivo foi avaliar se a microinjeção bilateral do PPADS (20 mM) no NTS caudal afetava as respostas promovidas pela ativação do quimiorreflexo.

3.7.14. Protocolo XIV: Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a ativação do quimiorreflexo periférico antes e após o antagonismo dos receptores purinérgicos com o PPADS (20 mM) e ionotrópicos do glutamato com ácido quinurênico (KYN, 250 mM) microinjetados bilateralmente no NTS caudal

Uma vez estabelecidas todas as respostas ao L-glutamato e ao α,β -metileno-ATP no NTS caudal, assim como o antagonismo dessas respostas pelos seus respectivos antagonistas e os testes de cada um desses antagonistas em separado contra o quimiorreflexo, nesse protocolo o objetivo foi avaliar se a combinação da microinjeção bilateral do PPADS (20 mM) e ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal afetava as respostas promovidas pela ativação do quimiorreflexo.

4. RESULTADOS

4.1. Alterações na atividade dos nervos frênico, simpático e na frequência cardíaca promovidas pela ativação dos quimiorreceptores com KCN na preparação WHBP

A **figura 4** apresenta um conjunto de registros originais de uma preparação WHBP, representativa do grupo, mostrando a atividade do nervo simpático torácico (microvolts), a atividade integrada desses potenciais (JANS), a atividade integrada do nervo frênico e a frequência cardíaca em resposta à ativação do quimiorreflexo com KCN. No traçado superior, correspondente à FC, observa-se uma acentuada bradicardia. O segundo traçado da figura representa o aumento da atividade do nervo frênico em resposta ao KCN. O terceiro e o quarto traçados representam a atividade do nervo simpático torácico integrada e o registro original, respectivamente, onde se observa um aumento significativo na atividade desse nervo em resposta à ativação do quimiorreflexo.

Na **figura 5** está representada a diminuição significativa na frequência cardíaca em relação ao basal quando da ativação dos quimiorreceptores com KCN (83 ± 6 vs 377 ± 27 bpm; $n=8$). A **figura 6** mostra que os aumentos percentuais na atividade do nervo simpático (44 ± 6 %; $n=7$) e do nervo frênico (105 ± 18 %; $n=8$) em resposta à ativação do quimiorreflexo foram significativos quando comparados com a atividade basal.

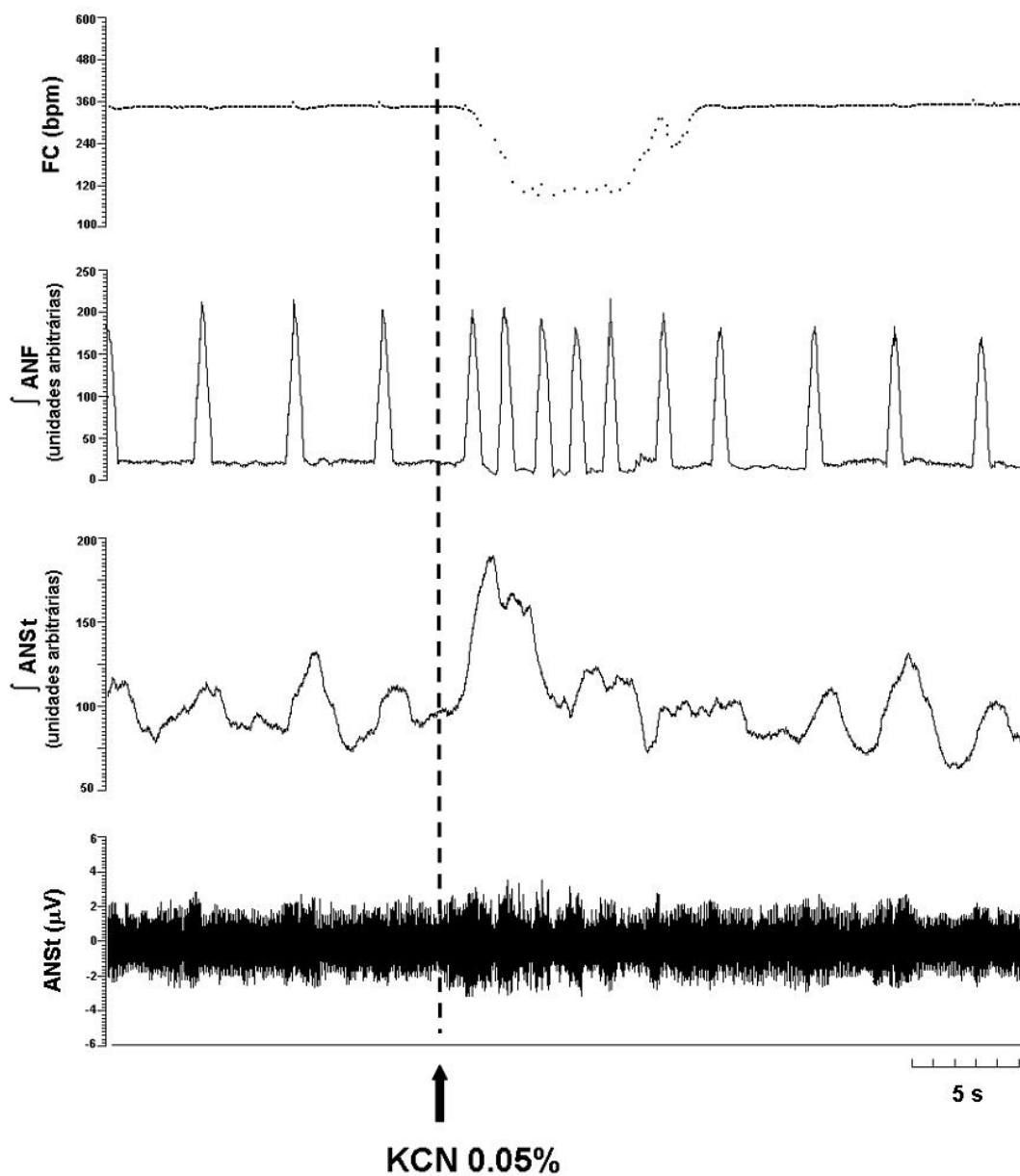


Figura 4: Traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, mostrando a atividade do nervo simpático torácico (ANSt, microvolts), a integração da ANSt (JANSt, unidades arbitrárias), a atividade integrada do nervo frênico (JANF, unidades arbitrárias), a frequência cardíaca (FC, bpm) e as alterações sobre esses parâmetros promovidas pela injeção de KCN.

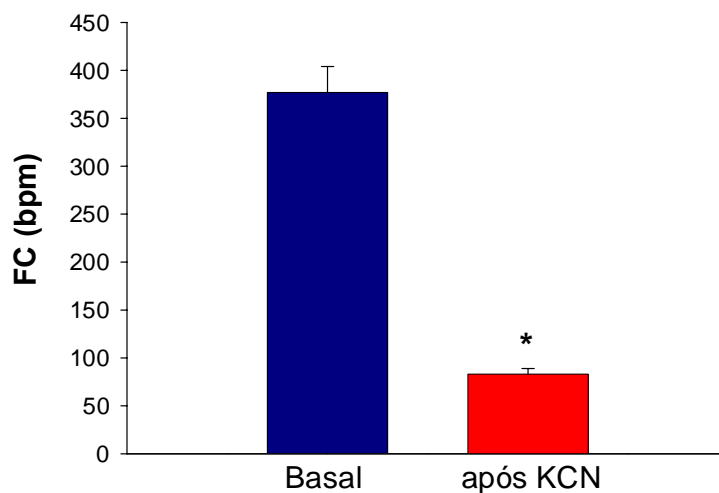


Figura 5: Variação da frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à ativação dos quimiorreceptores com KCN [0,05 %/0,05 mL, (n=8)] na preparação WHBP. * Diferente do basal ($p < 0,05$).

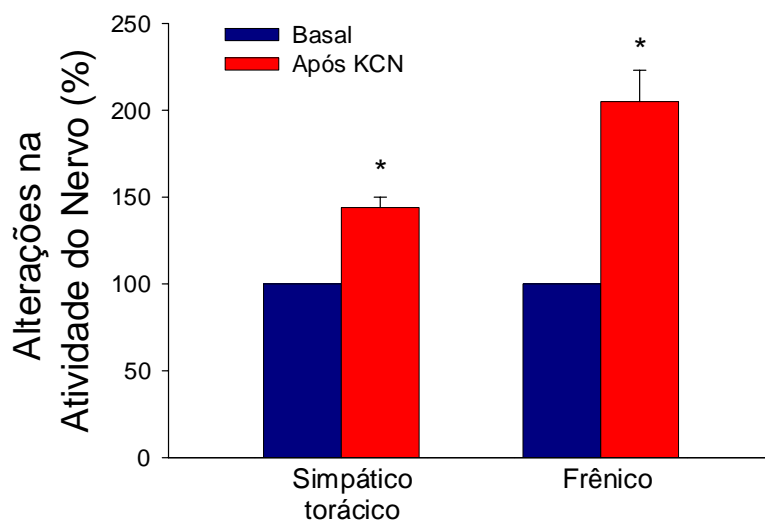


Figura 6: Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (n=7) e do nervo frênico (n=8) promovidas pela ativação dos quimiorreceptores com KCN (0,05 %/0,05 mL) na preparação WHBP. * Diferente do basal ($p < 0,05$).

4.2. Microinjeções de diferentes doses de L–glutamato no NTS caudal

A **figura 7** apresenta traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, mostrando o registro da frequência cardíaca (FC, bpm), da atividade integrada do nervo frênico (JANF, unidades arbitrárias), dos potenciais integrados (JANSt, unidades arbitrárias) e o registro original do nervo simpático torácico (ANSt, microvolts), em resposta à microinjeção de L–glutamato (50 mM) no NTS caudal. O traçado superior da figura mostra a redução na frequência cardíaca em resposta a microinjeção de L–glutamato. O segundo traçado mostra uma redução da atividade do nervo frênico, o que caracteriza uma bradipnéia (redução da frequência), em resposta a microinjeção de L–glutamato. O terceiro e quarto traçados representam a atividade do nervo simpático torácico integrada e o registro original, respectivamente, onde se observa um discreto aumento na atividade desse nervo em resposta à microinjeção do L–glutamato.

A microinjeção de diferentes doses de L–glutamato em seqüência aleatória (5, 25, 50, 250 e 500 mM) no NTS caudal promoveu bradicardia (-9 ± 3 , -28 ± 2 , -64 ± 4 , -103 ± 4 e -114 ± 4 bpm respectivamente, $n=9$), redução da frequência de despolarização do nervo frênico (0.24 ± 0.03 , 0.20 ± 0.02 , 0.08 ± 0.02 , 0.03 ± 0.02 e 0.00 ± 0.00 Hz respectivamente, $n=9$) e aumento na atividade do nervo simpático torácico de maneira dose dependente (0 ± 1 , 5 ± 1 , 10 ± 2 , 14 ± 2 e 22 ± 4 % respectivamente, $n=9$), como ilustrado nos painéis A, B e C da **Figura 8**. A microinjeção de salina (veículo) promoveu alterações desprezíveis na frequência cardíaca (-2 ± 2 bpm), na atividade do nervo frênico (0.34 ± 0.02 vs 0.33 ± 0.02 Hz) e na atividade do nervo simpático torácico (1 ± 1 %).

A avaliação das seqüências temporais da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta às microinjeções de diferentes doses de L–glutamato está ilustrada no

painel A da **figura 10**. Nas tabelas 4-6 do apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF, FC e ANSt em resposta a microinjeção de salina e das diferentes doses de L-glutamato no NTS caudal.

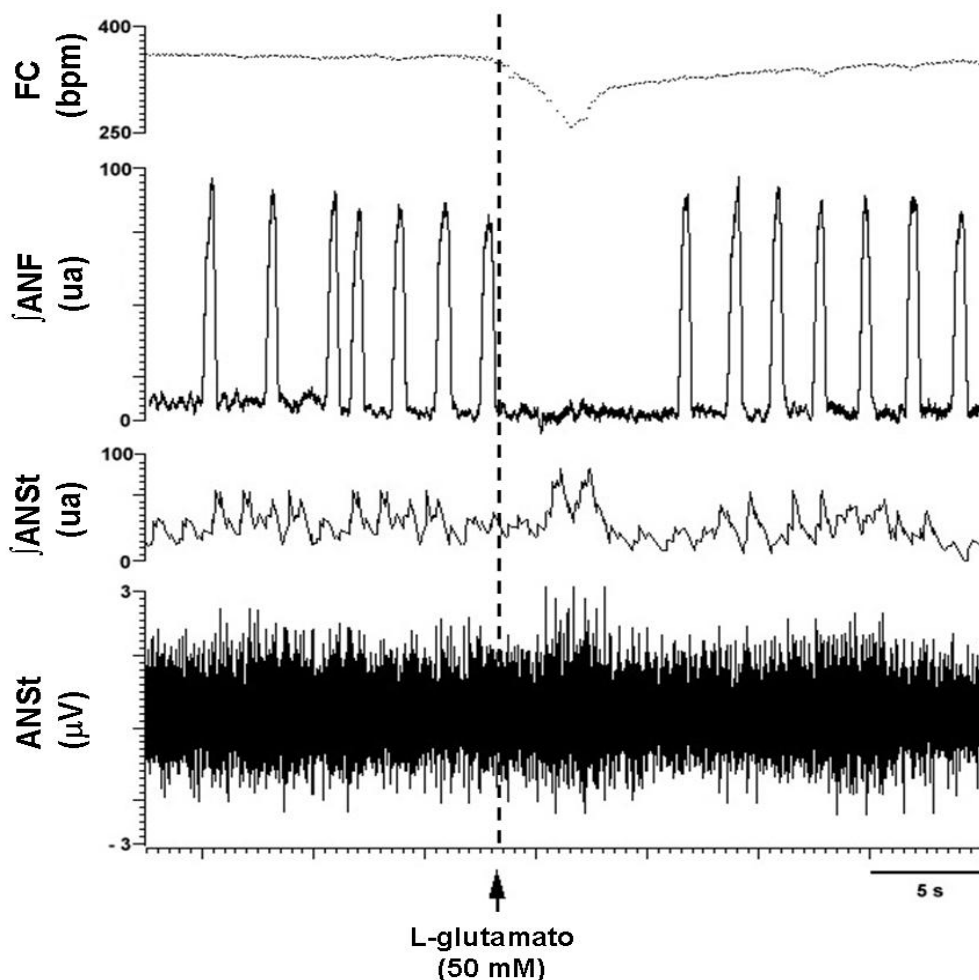


Figura 7: Traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, mostrando a frequência cardíaca (FC, bpm), a atividade integrada do nervo frênico (\int ANF, unidades arbitrárias), a atividade integrada do nervo simpático torácico (\int ANSt, unidades arbitrárias), o registro original do nervo simpático torácico (ANSt, μ V) e as alterações sobre esses parâmetros promovidas pela microinjeção de L-glutamato (50 mM) no NTS caudal.

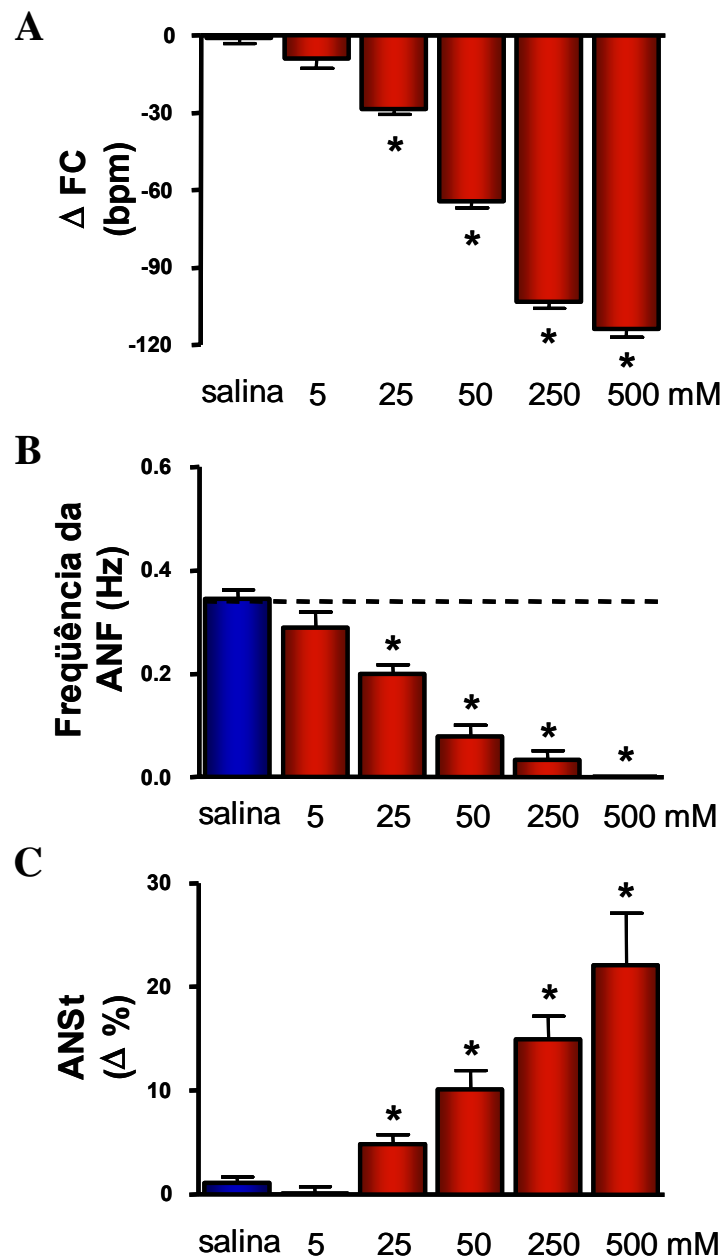


Figura 8: Alterações na frequência cardíaca (FC), na frequência de despolarização do nervo frênico (ANF) e na atividade do nervo simpático torácico (ANSt) decorrente da microinjeção de diferentes doses de L-glutamato (5, 25, 50, 250 e 500 mM) em seqüência aleatória no NTS caudal na preparação WHBP. A linha tracejada no painel B indica a frequência basal do nervo frênico (n = 9 para todas as doses).

4.3. Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a microinjeção de L-glutamato no NTS caudal antes e após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos com ácido quinurênico

A **figura 9** representa as alterações na FC, ANF e na ANSt em resposta a microinjeção de L-glutamato (50 mM) antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores ionotrópicos do L-glutamato com ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal em 6 preparações WHBP. A bradicardia promovida pela microinjeção do L-glutamato no NTS caudal foi significativamente reduzida aos 2 (de -83 ± 11 para -23 ± 8 bpm) e 10 minutos (de -83 ± 11 para -26 ± 5 bpm) após o antagonismo dos receptores ionotrópicos do L-glutamato com KYN. A microinjeção controle de L-glutamato no NTS caudal também promoveu uma redução da frequência da ANF [de $0,36 \pm 0,02$ (linha tracejada) para $0,07 \pm 0,03$ Hz, painel C] antes do antagonismo dos receptores ionotrópicos com o KYN. A microinjeção de L-glutamato 2 minutos após a microinjeção local de KYN no mesmo sítio do NTS promoveu um aumento da frequência da ANF quando comparada ao controle [de $0,36 \pm 0,02$ (linha tracejada) para $0,55 \pm 0,02$ Hz]. O L-glutamato microinjetado 10 minutos após o antagonista também produziu aumento da frequência da ANF, quando comparado ao controle [de $0,36 \pm 0,02$ (linha tracejada) para $0,65 \pm 0,02$ Hz]. Aos 30 e 45 minutos após o KYN, os padrões de respostas promovidas pelo L-glutamato foram semelhantes aos valores controle. O pequeno aumento na ANSt (7 ± 1 %) promovido pela microinjeção de L-glutamato no NTS caudal foi praticamente abolido aos 2 e 10 minutos após a microinjeção de KYN no mesmo sítio no NTS. Tanto a bradicardia quanto o aumento na ANSt em resposta a microinjeção de L-glutamato no NTS

caudal aos 30 e 45 minutos após o antagonismo com o KYN foram semelhantes aos valores controle.

A avaliação das seqüências temporais da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta à microinjeção de L-glutamato antes e após o antagonismo dos receptores ionotrópicos com o ácido quinurênico (250 mM) está ilustrada no painel B da **figura 10**. Nas tabelas 7-9 do apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF, FC e ANSt em resposta a microinjeção de L-glutamato antes e após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos com o ácido quinurênico no NTS caudal.

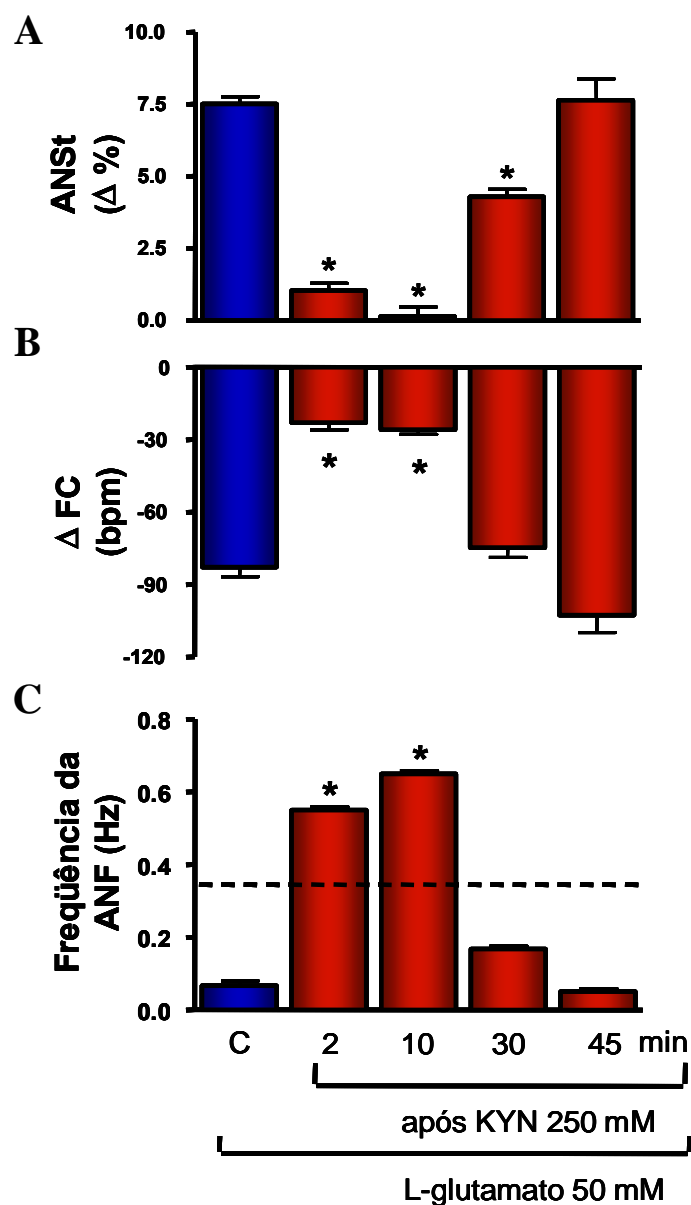


Figura 9: Alterações na frequência cardíaca (FC), na frequência de despolarização do nervo frênico (ANF) e na atividade do nervo simpático torácico (ANSt) decorrentes da microinjeção de L-glutamato (50 mM) antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores ionotrópicos do L-glutamato com o ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal na preparação WHBP. A linha tracejada no painel B indica a frequência basal do nervo frênico (n = 6).

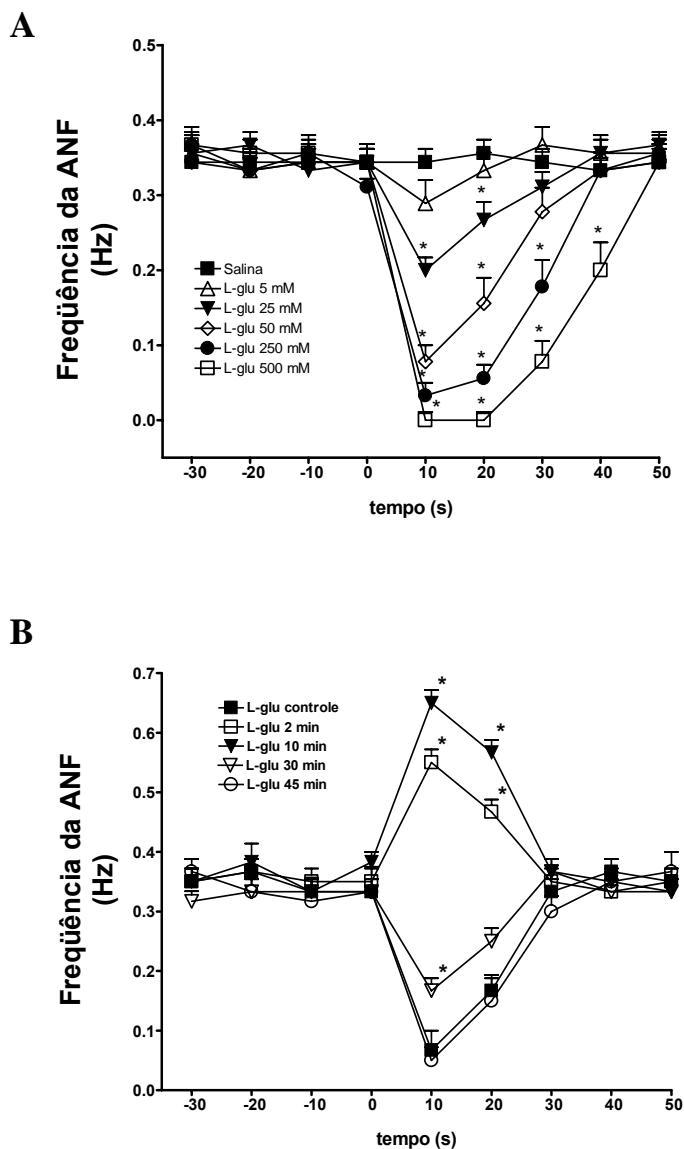


Figura 10: Avaliação de seqüências temporais da freqüência de despolarização do nervo frênico em resposta à microinjeção de doses crescentes de L–glutamato (A) e em resposta à microinjeção do L–glutamato (50 mM) antes e após a microinjeção do ácido quinurênico (250 mM) no NTS caudal (B).

4.4. Microinjeções de doses crescentes de *trans*-ACPD no NTS caudal

A **figura 11** apresenta traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, mostrando o registro da frequência cardíaca (FC, bpm), da atividade integrada do nervo frênico (JANF, unidades arbitrárias), dos potenciais integrados (JANSt, unidades arbitrárias) e o registro original do nervo simpático torácico (microvolts), em resposta à microinjeção de *trans*-ACPD (2,5 mM) no NTS caudal. O traçado superior da figura mostra a redução na frequência cardíaca em resposta a microinjeção de *trans*-ACPD. O segundo traçado mostra um aumento da atividade do nervo frênico, o que caracteriza um quadro de taquipnéia (aumento da frequência), em resposta a microinjeção de *trans*-ACPD. O terceiro e quarto traçados representam a atividade do nervo simpático torácico integrada e o registro original, respectivamente, nos quais não se observam alterações na atividade desse nervo em resposta à microinjeção do *trans*-ACPD.

A microinjeção de diferentes doses de *trans*-ACPD em seqüência aleatória (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 mM) no NTS caudal promoveu bradicardia (-4 ± 2 , -35 ± 4 , -46 ± 4 , -63 ± 10 e -102 ± 9 bpm respectivamente, $n=7$), aumento da frequência de despolarização do nervo frênico (0.44 ± 0.02 , 0.53 ± 0.04 , 0.60 ± 0.02 , 0.67 ± 0.03 e 0.74 ± 0.03 Hz respectivamente, $n=7$) de maneira dose dependente e não promoveu alterações significativas na atividade do nervo simpático torácico (0 ± 1 , 1 ± 1 , -1 ± 1 , 1 ± 1 e -1 ± 2 % respectivamente, $n=7$), como ilustrado nos painéis A, B e C da **Figura 12**. A microinjeção de salina (veículo) promoveu alterações desprezíveis na frequência cardíaca (-3 ± 2 bpm), na atividade do nervo frênico (0.37 ± 0.02 vs 0.36 ± 0.02 Hz) e na atividade do nervo simpático torácico (-1 ± 2 %). Nas tabelas 10-12 do apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF, FC e ANSt em resposta a microinjeção de salina e das diferentes doses de *trans*-ACPD no NTS caudal.

A avaliação das seqüências temporais da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta às microinjeções de doses crescentes de *trans*-ACPD está ilustrada no painel A da **figura 14**.

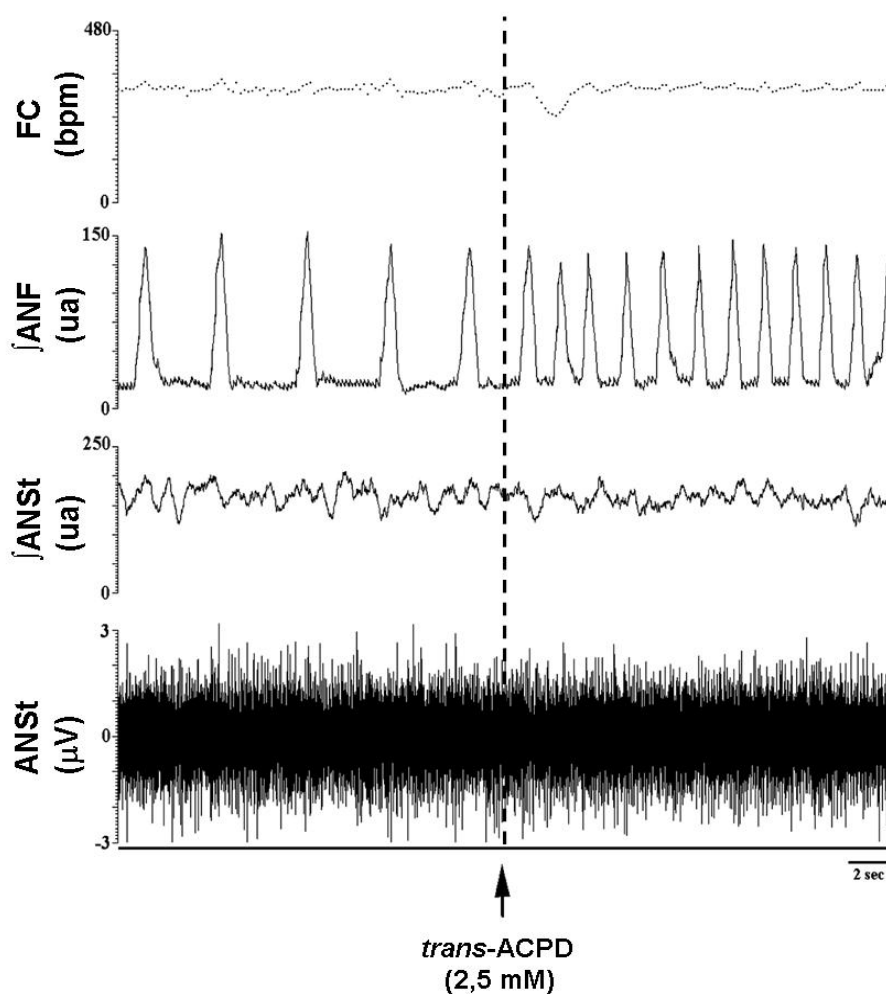


Figura 11: Traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, mostrando a frequência cardíaca (FC, bpm), a atividade integrada do nervo frênico (jANF, unidades arbitrárias), a atividade integrada do nervo simpático torácico (jANSt, unidades arbitrárias), o registro original do nervo simpático torácico (ANSt, microvolts) e as alterações sobre esses parâmetros promovidas pela microinjeção de *trans*-ACPD (2,5 mM) no NTS caudal.

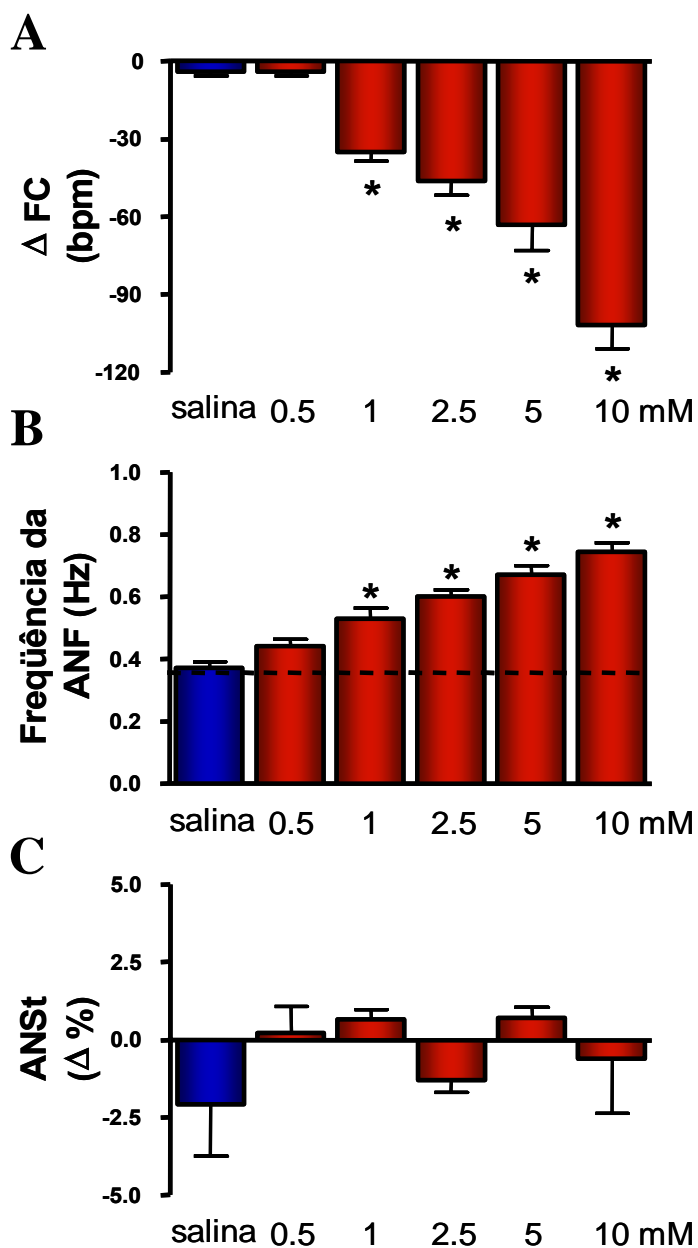


Figura 12: Alterações na frequência cardíaca (FC), na frequência de despolarização do nervo frênico (ANF) e na atividade do nervo simpático torácico (ANSt) decorrente da microinjeção de diferentes doses de *trans*-ACPD (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 mM) em seqüência aleatória no NTS caudal na preparação WHBP. A linha tracejada no painel B indica a frequência basal do nervo frênico (n = 7 para todas as doses).

4.5. Avaliação da frequência cardíaca e da atividade do nervo frênico em resposta a microinjeção de trans-ACPD no NTS caudal antes e após o antagonismo dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos com MCPG

A **figura 13** representa as alterações na FC e na ANF em resposta a microinjeção de *trans*-ACPD (2,5 mM) antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores metabotrópicos do L-glutamato com MCPG (100 mM) no NTS caudal em 5 preparações WHBP. A resposta de bradicardia promovida pela microinjeção de *trans*-ACPD no NTS caudal foi significativamente atenuada 2 (de -55 ± 2 para -7 ± 1 bpm), 10 (de -55 ± 2 para -5 ± 2 bpm) e 30 minutos (de -55 ± 2 para -25 ± 6 bpm) após o bloqueio dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos com MCPG. Aos 45 minutos, a resposta foi semelhante ao controle.

A microinjeção de *trans*-ACPD (2,5 mM) no NTS caudal promoveu aumento da ANF [de $0,37 \pm 0,03$ (linha tracejada) para $0,68 \pm 0,02$ Hz]. O aumento na ANF promovido pela microinjeção do *trans*-ACPD no NTS caudal foi praticamente abolido 2 [de $0,37 \pm 0,02$ (linha tracejada) para $0,36 \pm 0,02$ Hz] e 10 minutos [de $0,37 \pm 0,02$ (linha tracejada) para $0,34 \pm 0,02$ Hz] após o antagonismo dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos pelo MCPG microinjetado no mesmo sítio no NTS. Aos 45 minutos, o aumento na ANF estava de volta aos valores controle. Nas tabelas 13 e 14 do apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF e FC em resposta a microinjeção de *trans*-ACPD antes e após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos com o MCPG no NTS caudal.

A avaliação das seqüências temporais da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta à microinjeção de *trans*-ACPD antes e após o bloqueio dos receptores metabotrópicos com o MCPG (100 mM) está ilustrada no painel B da **figura 14**.

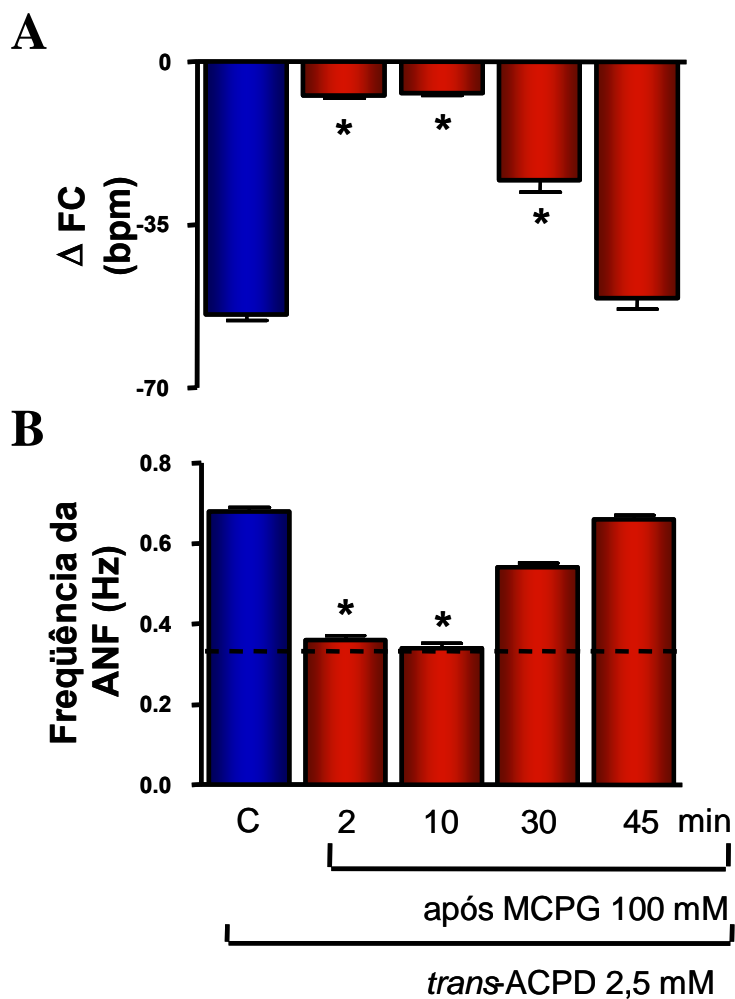


Figura 13: Alterações na frequência cardíaca (FC) e na atividade do nervo frênico (ANF) decorrentes da microinjeção de *trans*-ACPD (2,5 mM) antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o bloqueio dos receptores metabotrópicos do L-glutamato com o MCPG (100 mM) no NTS caudal na preparação WHBP. A linha tracejada no painel B indica a frequência basal do nervo frênico (n = 5).

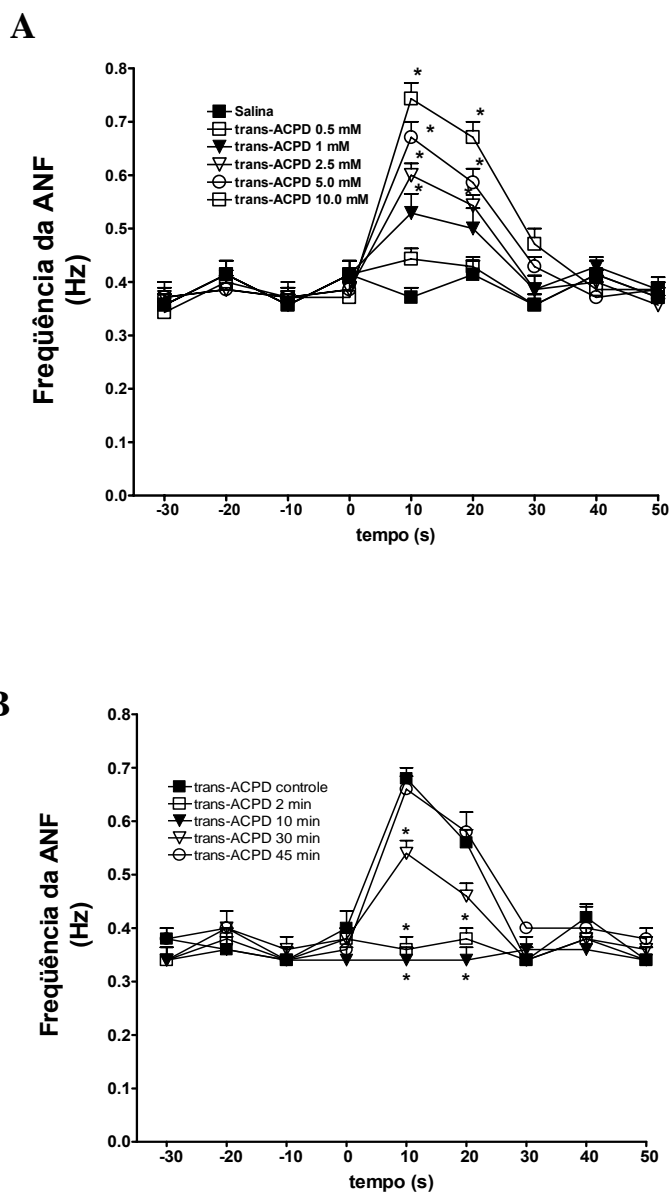


Figura 14: Avaliação de seqüências temporais da freqüência de despolarização do nervo frênico em resposta à microinjeção de doses crescentes de *trans*-ACPD (A) e em resposta à microinjeção do *trans*-ACPD (2,5 mM) antes e após a microinjeção do MCPG (100 mM) no NTS caudal (B).

4.6. Avaliação da frequência cardíaca e da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a microinjeção de L–glutamato no NTS caudal antes e após o duplo antagonismo dos receptores ionotrópicos com ácido quinurênico e metabotrópicos com MCPG

A **figura 15** mostra as alterações na FC (painel A) e na ANF (painel B) em resposta a microinjeção de L–glutamato (50 mM) antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo de ambos os receptores ionotrópicos e metabotrópicos com KYN (250 mM) e MCPG (100 mM), respectivamente, no NTS caudal. A microinjeção de L–glutamato promoveu bradicardia a qual foi significativamente atenuada aos 2 (de -76 ± 8 para -19 ± 5 bpm) e 10 minutos (de -76 ± 8 para -18 ± 3 bpm) após o duplo bloqueio. Essa atenuação foi similar àquela promovida pelo antagonismo dos receptores ionotrópicos com o KYN (Figura 9).

A microinjeção de L–glutamato promoveu redução da ANF (de $0,39\pm 0,03$ para $0,07\pm 0,03$ Hz) e aos 2 e 10 minutos após o duplo bloqueio, as alterações na ANF foram completamente abolidas (de $0,47\pm 0,03$ para $0,58\pm 0,04$ Hz e de $0,49\pm 0,03$ para $0,50\pm 0,06$ Hz, respectivamente). Aos 30 e 45 minutos após o duplo antagonismo (KYN + MCPG), a redução da ANF, em resposta a microinjeção do L–glutamato no NTS caudal, estava de volta aos valores controle. Nas tabelas 15 e 16 do apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF e FC em resposta a microinjeção de L–glutamato antes e após o bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos com o ácido quinurênico e o MCPG respectivamente, no NTS caudal.

A avaliação das seqüências temporais da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta à microinjeção de L–glutamato antes e após o duplo antagonismo dos

receptores ionotrópicos e metabotrópicos com o ácido quinurênico e com o MCPG está ilustrada na **figura 16**.

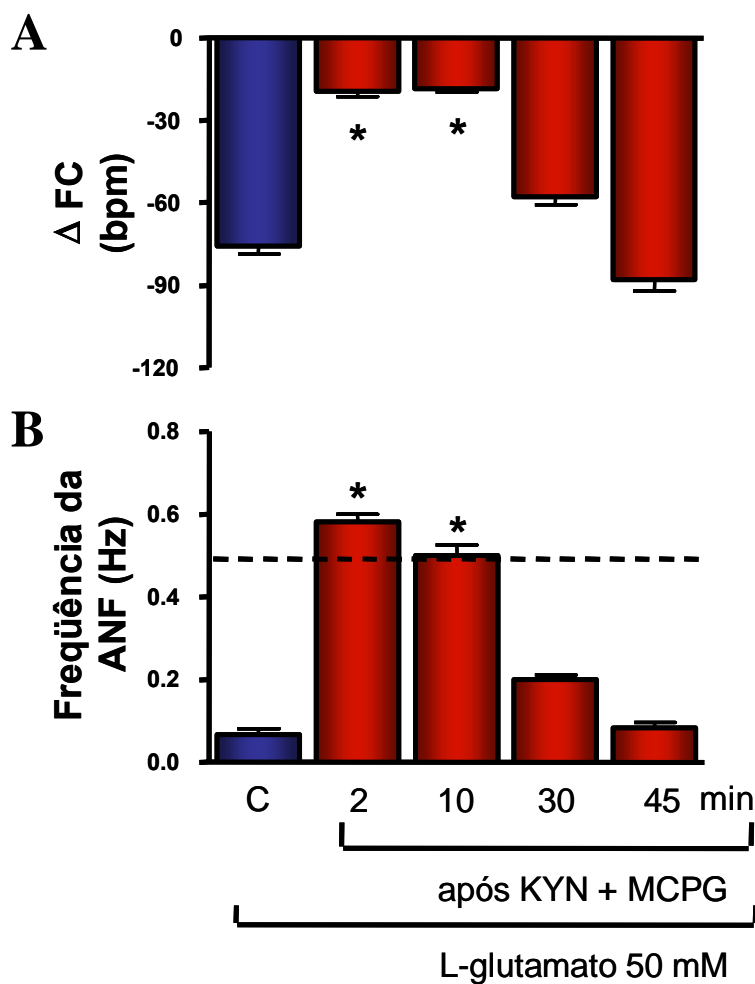


Figura 15: Alterações na frequência cardíaca (FC) e na atividade do nervo frênico (ANF) decorrentes da microinjeção de L-glutamato (50 mM) antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o duplo antagonismo dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos do L-glutamato com o KYN (250 mM) e o MCPG (100 mM) respectivamente, no NTS caudal na preparação WHBP. A linha tracejada no painel B indica a frequência basal do nervo frênico (n = 6).

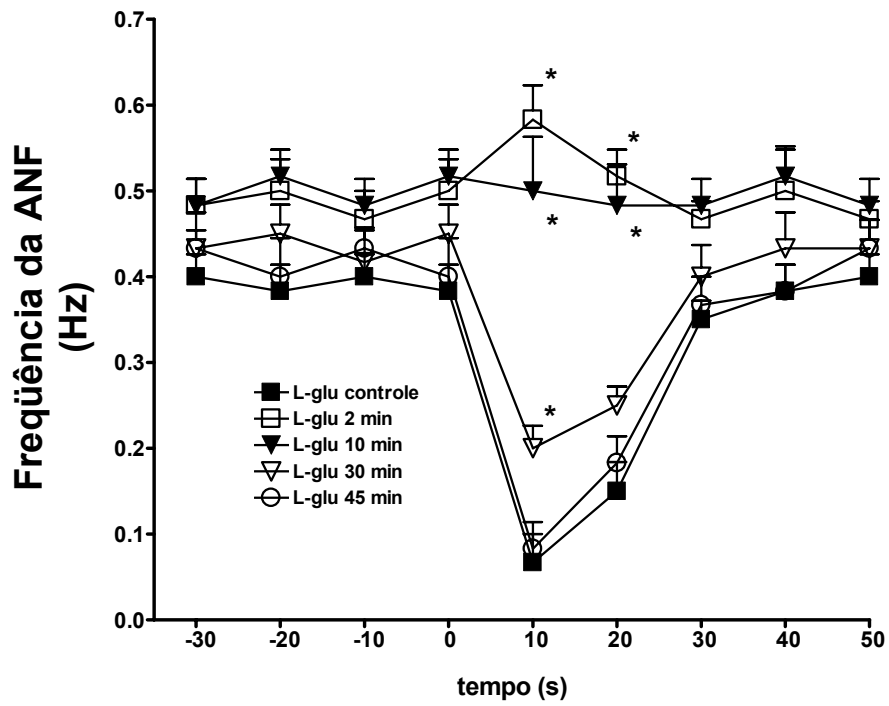


Figura 16: Avaliação de seqüências temporais da freqüência de despolarização do nervo frênico em resposta à microinjeção de L–glutamato (50 mM) antes e após a microinjeção de ácido quinurênico + MCPG no NTS caudal.

4.7. Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores ionotrópicos da glutamato com ácido quinurênico microinjetado bilateralmente no NTS caudal

A **Figura 17** ilustra um conjunto de traçados representativos das alterações na atividade do nervo simpático torácico, na frequência cardíaca e na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral do ácido quinurênico (250 mM) no NTS caudal. A ativação do quimiorreflexo (controle) promoveu um aumento na atividade do nervo simpático torácico [54 ± 3 % (**Figura 18**, painel A)]. A ativação do quimiorreflexo aos 2 (51 ± 2 %), 10 (51 ± 3 %), 30 (51 ± 3 %) e 45 minutos (52 ± 1 %) após a microinjeção bilateral do ácido quinurênico no NTS caudal promoveu aumentos da atividade simpática semelhantes à condição controle. Com relação à frequência cardíaca (**Figura 18**, painel B), a bradicardia promovida pela ativação do quimiorreflexo foi significativamente reduzida aos 2 (de -219 ± 17 para -50 ± 6 bpm), 10 (de -219 ± 17 para -65 ± 9 bpm) e 30 minutos (de -219 ± 17 para -114 ± 15 bpm) após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos pelo ácido quinurênico microinjetado bilateralmente no NTS caudal.

A ativação do quimiorreflexo na condição controle promoveu um aumento da frequência de despolarização do nervo frênico ($0,28 \pm 0,02$ Δ Hz). O painel C da **Figura 18** ilustra a variação da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta à ativação do quimiorreflexo antes e 2 ($0,30 \pm 0,04$ Δ Hz), 10 ($0,24 \pm 0,02$ Δ Hz), 30 ($0,25 \pm 0,02$ Δ Hz) e 45 minutos ($0,23 \pm 0,02$ Δ Hz) após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos pelo ácido quinurênico, o qual não alterou o aumento da frequência do nervo

frênico comparado à ativação controle do quimiorreflexo ($0,28 \pm 0,02 \Delta\text{Hz}$). A microinjeção do ácido quinurênico promoveu um pequeno aumento da frequência basal de despolarização do nervo frênico aos 2 e 10 minutos, o qual não foi estatisticamente diferente do controle ($P > 0,05$). A **Figura 23** (painel A) ilustra as alterações na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após a microinjeção do ácido quinurênico no NTS caudal em seqüências temporais. Nas tabelas 17-19 do apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF, FC e ANSt em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos com o ácido quinurênico no NTS caudal.

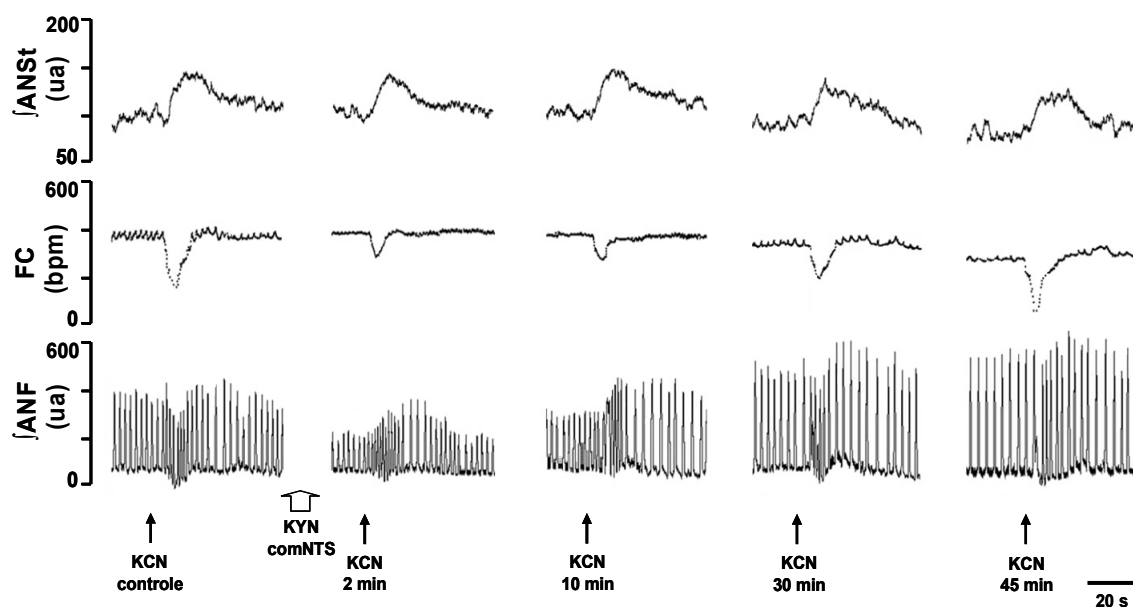


Figure 17: Traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, ilustrando as alterações na atividade integrada do nervo simpático torácico ($\int\text{ANSt}$), na frequência cardíaca (FC) e na frequência de despolarização do nervo frênico ($\int\text{ANF}$) promovidas pela ativação do quimiorreflexo (KCN 0,05 %/0,05 mL) antes e após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (250 mM) no NTS caudal.

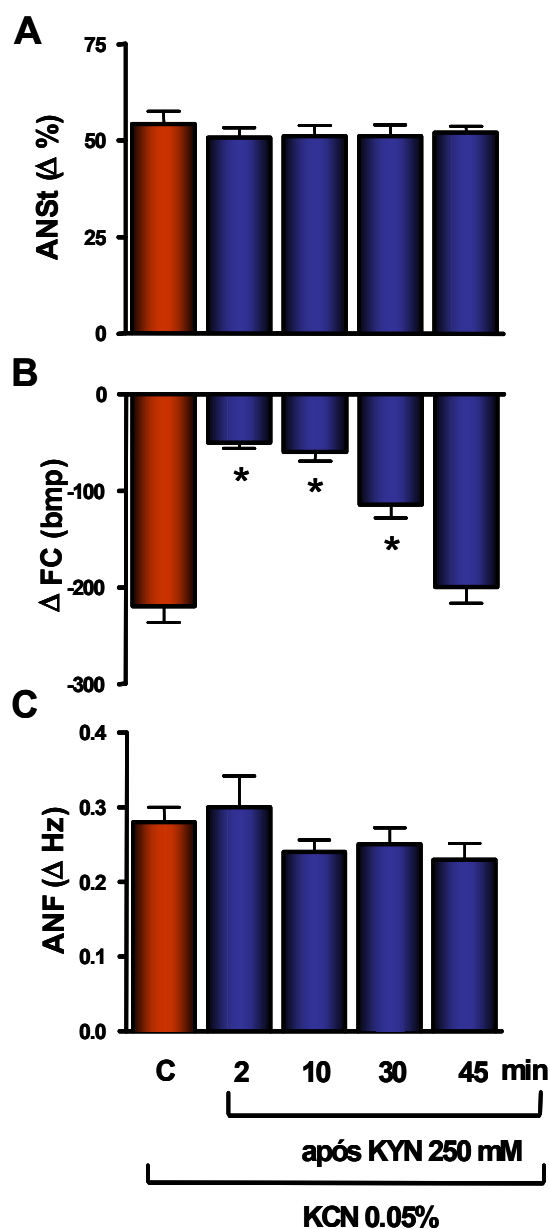


Figure 18: Alterações na ANSt (Δ %, painel A), frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) e no aumento da frequência de despolarização do nervo frênico (Δ Hz, painel C) em resposta a ativação do quimiorreflexo (KCN 0.05 %/0,05 mL) antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos pelo ácido quinurênico (KYN, 250 mM) microinjetado no NTS caudal (n=11). * Diferente quando comparado à ativação controle do quimiorreflexo ($p < 0,05$).

4.8. Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores metabotrópicos do glutamato com o MCPG microinjetado bilateralmente no NTS caudal

A **Figura 19** mostra um conjunto de traçados representativos que resumem as alterações na atividade do nervo simpático torácico, na frequência cardíaca e na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos pelo MCPG (100 mM) no NTS caudal. A ativação controle do quimiorreflexo promoveu um aumento na atividade simpática [48 ± 5 % (**Figura 20**, painel A)]. Ativações do quimiorreflexo 2 (54 ± 5 %), 10 (56 ± 5 %), 30 (52 ± 2 %) e 45 minutos (56 ± 6 %) após a microinjeção bilateral do MCPG no NTS caudal promoveram aumentos na atividade simpática semelhantes à condição controle. Com relação à frequência cardíaca (**Figura 20**, painel B), a bradicardia promovida pela ativação do quimiorreflexo 2 (-201 ± 17 bpm), 10 (-175 ± 27 bpm), 30 (-217 ± 22 bpm) e 45 minutos (-210 ± 22 bpm) após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos pelo MCPG microinjetado bilateralmente no NTS caudal não foi diferente em relação à resposta de bradicardia na condição controle (-206 ± 26 bpm).

A ativação controle do quimiorreflexo promoveu um aumento na frequência de despolarização do nervo frênico ($0,27 \pm 0,03$ Δ Hz). O painel C da **figura 20** ilustra o aumento da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes ($0,27 \pm 0,03$ Δ Hz) e aos 2 ($0,27 \pm 0,04$ Δ Hz), 10 ($0,27 \pm 0,05$ Δ Hz), 30 ($0,26 \pm 0,04$ Δ Hz) e 45 minutos ($0,27 \pm 0,03$ Δ Hz) após o antagonismo dos receptores

glutamatérgicos metabotrópicos pelo MCPG, o qual não promoveu nenhuma alteração no aumento da frequência de despolarização no nervo frênico comparado a ativação controle do quimiorreflexo ($0,27 \pm 0,03 \Delta\text{Hz}$). A microinjeção do MCPG não promoveu alterações na frequência basal de despolarização do nervo frênico. A **Figura 23** (painel B) ilustra as alterações na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o MCPG em seqüências temporais. Nas tabelas 20-22 do apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF, FC e ANSt em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos com o MCPG no NTS caudal.

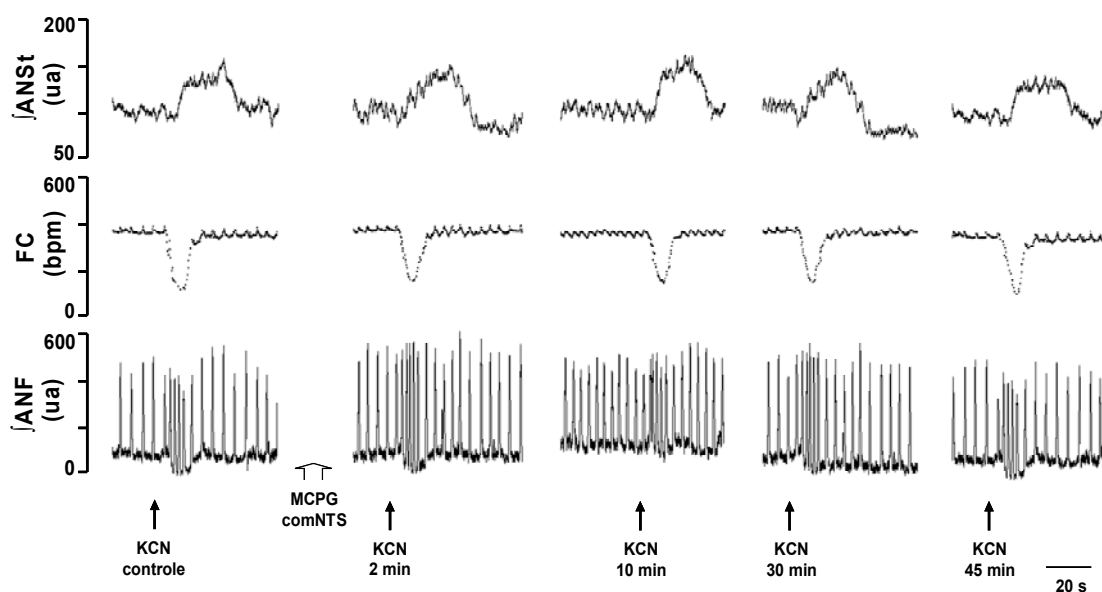


Figure 19: Traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, ilustrando as alterações na atividade integrada do nervo simpático torácico ($\int\text{ANSt}$), na frequência cardíaca (FC) e na frequência de despolarização do nervo frênico ($\int\text{ANF}$) promovidas pela ativação do quimiorreflexo (KCN 0,05 %/0,05 %) antes e após a microinjeção bilateral de MCPG (100 mM) no NTS caudal.

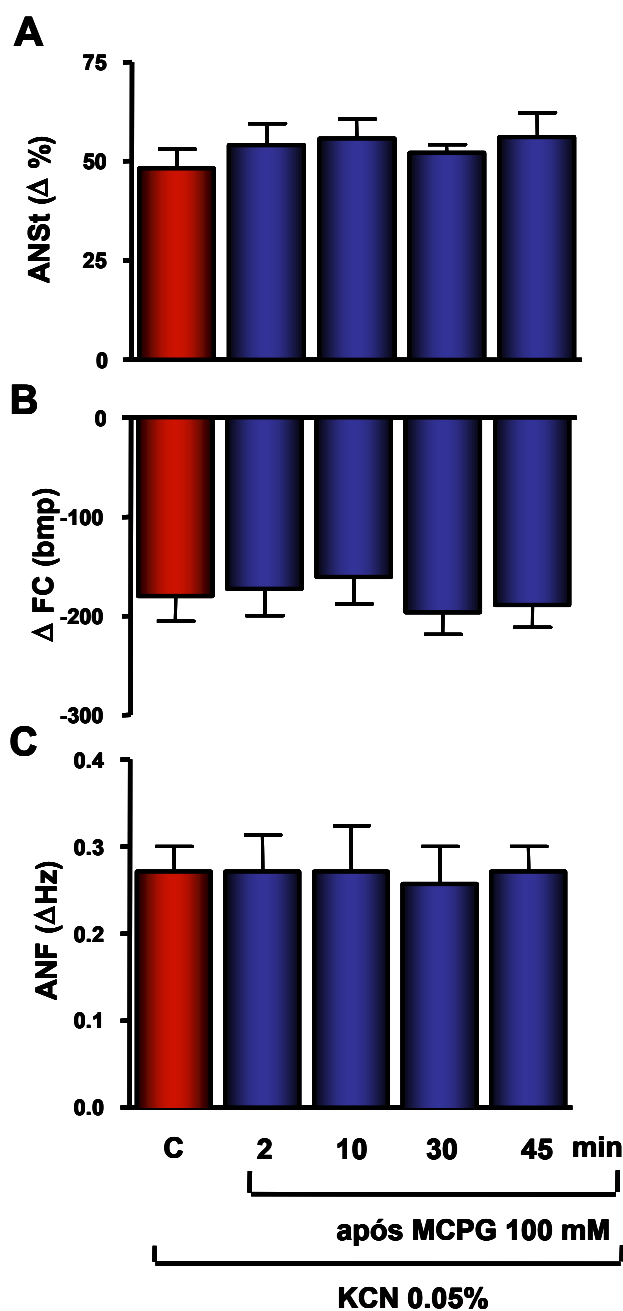


Figure 20: Alterações na ANSt (Δ %, painel A), frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) e na frequência de despolarização do nervo frênico (Δ Hz, painel C) em resposta a ativação do quimiorreflexo (KCN 0.05 %/0,05 mL) antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos pelo MCPG (100 mM) microinjetado no NTS caudal (n=7).

4.9. Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos com o ácido quinurênico combinado com o MCPG microinjetados bilateralmente no NTS caudal

A **Figura 21** mostra um conjunto de traçados de uma preparação representativa do grupo, ilustrando as alterações na atividade do nervo simpático torácico, na frequência cardíaca e na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos pelo ácido quinurênico e pelo MCPG respectivamente, microinjetados no NTS caudal. A ativação controle do quimiorreflexo promoveu um aumento da atividade simpática [$57\pm 6\%$ (**Figura 22**, painel A)] e as ativações subsequentes do quimiorreflexo 2 ($55\pm 3\%$), 10 ($51\pm 4\%$), 30 ($47\pm 4\%$) e 45 minutos ($49\pm 3\%$) após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico + MCPG no NTS caudal promoveram aumentos na atividade simpática de magnitude semelhantes à ativação controle ($57\pm 6\%$). A bradicardia promovida pela ativação do quimiorreflexo foi abolida aos 2 (de -192 ± 15 para -2 ± 1 bpm) e 10 minutos (de -192 ± 15 para -4 ± 2 bpm) após a microinjeção bilateral do ácido quinurênico + MCPG no NTS caudal (**Figura 22**, painel B).

A ativação controle do quimiorreflexo promoveu um aumento da frequência de despolarização do nervo frênico ($0,30\pm 0,03$ Δ Hz). O painel C da **Figura 22** ilustra o aumento da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e 2 ($0,20\pm 0,03$ Δ Hz), 10 ($0,22\pm 0,02$ Δ Hz), 30 ($0,18\pm 0,04$ Δ Hz) e 45 minutos ($0,28\pm 0,04$ Δ Hz) após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos pelo o ácido quinurênico e pelo MCPG respectivamente, o qual não

afetou o aumento da frequência de despolarização do nervo frênico comparados à ativação do quimiorreflexo controle ($0,30 \pm 0,03 \Delta\text{Hz}$). As microinjeções do ácido quinurênico e do MCPG, promoveram um aumento na frequência basal de despolarização do nervo frênico aos 2 e 10 minutos, o qual foi estatisticamente diferente dos valores basais na condição controle ($P < 0,05$) como mostrado na **Figura 23** (painel C). Essa figura ilustra também as alterações na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o ácido quinurênico + MCPG no NTS caudal em seqüências temporais. Nas tabelas 23-25 do apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF, FC e ANSt em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos com o ácido quinurênico e o MCPG respectivamente, no NTS caudal.

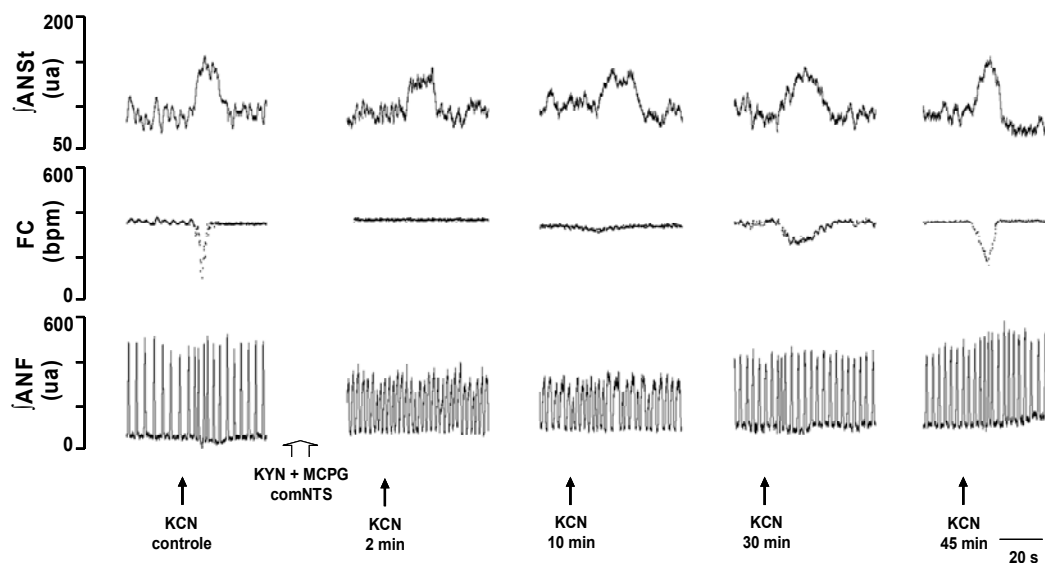


Figure 21: Traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, ilustrando as alterações na atividade integrada do nervo simpático torácico ($\int\text{ANSt}$), na frequência cardíaca (FC) e na frequência de despolarização do nervo frênico ($\int\text{ANF}$) promovidas pela

ativação do quimiorreflexo (KCN 0,05 %/0,05 mL) antes e após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico + MCPG no NTS caudal.

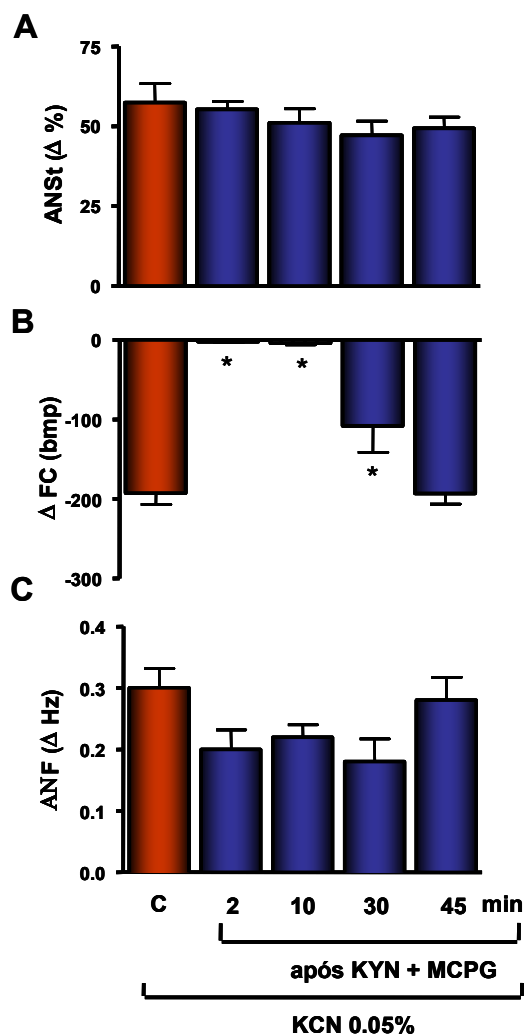


Figure 22: Alterações na ANSt (Δ %, painei A), frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) e na frequência de despolarização do nervo frênico (Δ Hz, painel C) em resposta a ativação do quimiorreflexo (KCN 0.05 %/0,05 mL) antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos pelo ácido quinurênico + MCPG microinjetados no NTS caudal (n=6). * Diferente quando comparado à ativação controle do quimiorreflexo ($p < 0,05$).

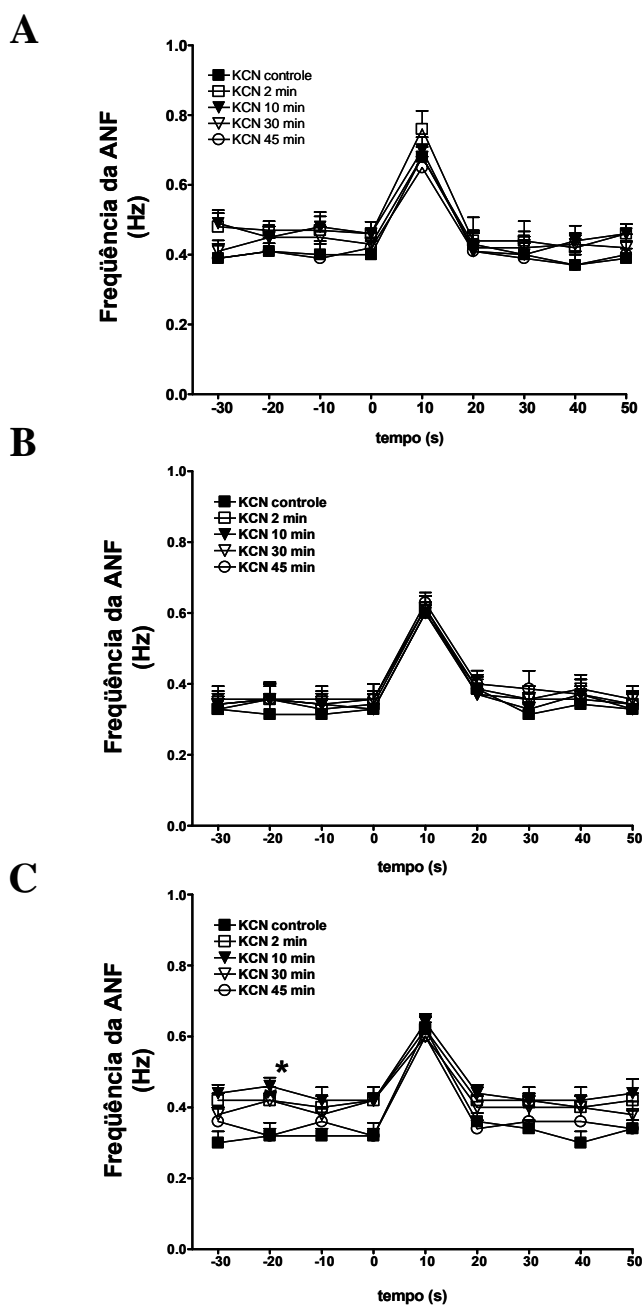


Figura 23. Alterações na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo (KCN 0,05 %/0,05 mL) antes e após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico 250 mM (painel A), MCPG 100 mM (painel B) e ácido quinurênico + MCPG (painel C) no NTS caudal. A escala de tempo representa os 40 segundos antes e os 50 segundos após a ativação do quimiorreflexo (tempo zero). * Diferente quando comparado à ativação do quimiorreflexo na condição controle ($p < 0,05$).

4.10. Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos com o ácido quinurênico e o MCPG microinjetados em seis sítios de microinjeção localizados no aspecto antero-posterior do NTS

A **Figura 24** mostra traçados de uma preparação representativa do grupo, ilustrando as alterações na atividade do nervo simpático torácico, na frequência cardíaca e na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos pelo ácido quinurênico e pelo MCPG respectivamente, microinjetados em seis sítios de microinjeção ao longo do NTS. A ativação controle do quimiorreflexo promoveu um aumento da atividade simpática [49 ± 2 % (**Figura 25**, painel A)] e as ativações subsequentes do quimiorreflexo aos 2 (45 ± 1 %), 10 (50 ± 2 %), 30 (53 ± 3 %) e 45 minutos (50 ± 3 %) após a microinjeção de ácido quinurênico + MCPG ao longo do NTS promoveram aumentos na atividade simpática de magnitude semelhantes à ativação controle (49 ± 2 %). Com relação à frequência cardíaca, (**Figura 25**, painel B), a bradicardia promovida pela ativação do quimiorreflexo foi atenuada aos 2 (de -240 ± 18 para -26 ± 4 bpm), 10 (de -240 ± 18 para -36 ± 8 bpm) e 30 minutos (de -240 ± 18 para -126 ± 26 bpm) após a microinjeção bilateral do ácido quinurênico + MCPG ao longo do NTS.

A ativação controle do quimiorreflexo promoveu um aumento da frequência de despolarização do nervo frênico. Após a microinjeção dos antagonistas MCPG e ácido quinurênico em seis pontos de microinjeção ao longo do NTS a atividade do nervo frênico cessou completamente e não foi possível avaliar as respostas decorrentes da ativação do

quimiorreflexo e a frequência basal de despolarização desse nervo. Esse bloqueio da atividade respiratória permaneceu ao longo de todo o experimento, isto é, ao longo dos 45 minutos. Nas tabelas 26 e 27 do apêndice estão apresentados os valores individuais da FC e ANSt em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos com o ácido quinurênico e o MCPG respectivamente, microinjetados em seis sítios ao longo do NTS.

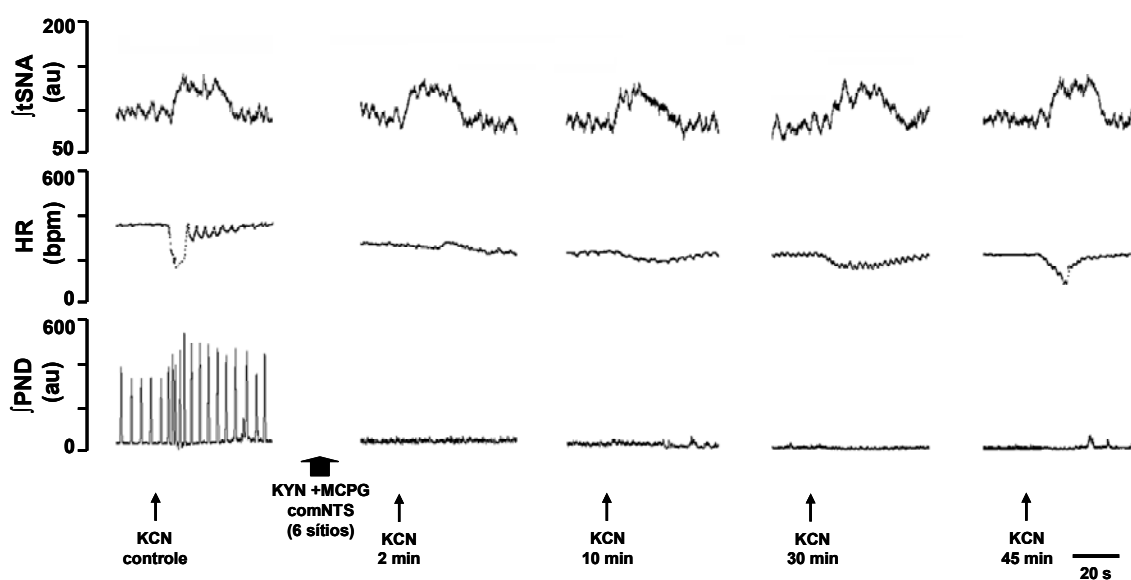


Figure 24: Traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, ilustrando as alterações na atividade integrada do nervo simpático torácico (\int ANSt), na frequência cardíaca (FC) e na frequência de despolarização do nervo frênico (\int ANF) promovidas pela ativação do quimiorreflexo (KCN 0,05 %/0,05 mL) antes e após a microinjeção de ácido quinurênico + MCPG em seis sítios ao longo do NTS.

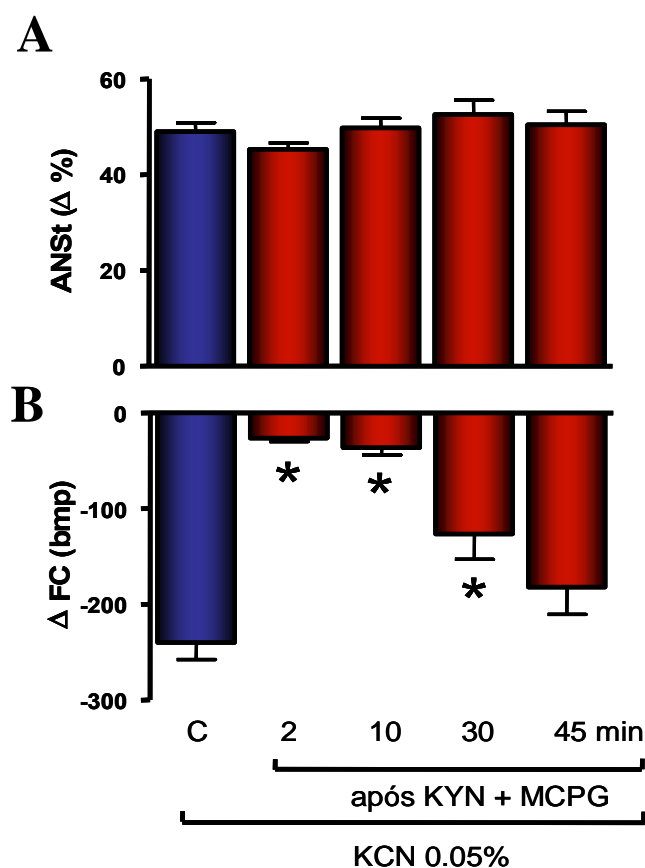


Figure 25: Alterações na ANSt (Δ %, painel A) e na frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) em resposta a ativação do quimiorreflexo (KCN 0.05 %/0,05 mL) antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos pelo ácido quinurênico + MCPG microinjetados em seis sítios ao longo do NTS (n=7). * Diferente quando comparado à ativação controle do quimiorreflexo ($p < 0,05$).

4.11. Microinjeções de diferentes doses α,β -metileno-ATP no NTS caudal

A **figura 26** apresenta traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, mostrando o registro da frequência cardíaca (FC, bpm), da atividade integrada do nervo frênico (\int ANF, unidades arbitrárias), dos potenciais integrados (\int ANSt, unidades arbitrárias) e o registro original do nervo simpático torácico (ANSt, microvolts), em resposta à microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM) no NTS caudal. O traçado superior da figura mostra a redução na frequência cardíaca em resposta a microinjeção de α,β -metileno-ATP. O segundo traçado mostra uma redução da atividade do nervo frênico, o que caracteriza uma bradipnéia (redução da frequência), em resposta a microinjeção de α,β -metileno-ATP. O terceiro e quarto traçados representam a atividade do nervo simpático torácico integrada e o registro original, respectivamente, nos quais se observa um aumento na atividade desse nervo em resposta à microinjeção do α,β -metileno-ATP.

A microinjeção de diferentes doses de α,β -metileno-ATP em seqüência aleatória (10, 25, 50, 100 e 200 mM) no NTS caudal promoveu bradicardia (-4 ± 2 , -18 ± 9 , -47 ± 14 , -57 ± 9 e -62 ± 10 bpm, respectivamente), redução da frequência de despolarização do nervo frênico (0.37 ± 0.04 , 0.31 ± 0.06 , 0.12 ± 0.05 , 0.06 ± 0.04 e 0.02 ± 0.02 Hz, respectivamente) e aumento na atividade do nervo simpático torácico de maneira dose dependente (3 ± 1 , 13 ± 7 , 23 ± 6 , 30 ± 6 e 32 ± 6 %, respectivamente), como ilustrado nos painéis A, B e C da **Figura 27**. A microinjeção de salina (veículo) promoveu alterações desprezíveis na frequência cardíaca (1 ± 1 bpm), na atividade do nervo frênico ($0,33\pm 0,02$ vs $0,35\pm 0,02$ Hz) e na atividade do nervo simpático torácico (2 ± 1 %).

A avaliação das seqüências temporais da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta às microinjeções de doses crescentes de α,β -metileno-ATP está

ilustrada na **figura 28**. Nas tabelas 28-30 do apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF, FC e ANSt em resposta a microinjeção de salina e das diferentes doses de α,β -metileno-ATP no NTS caudal.

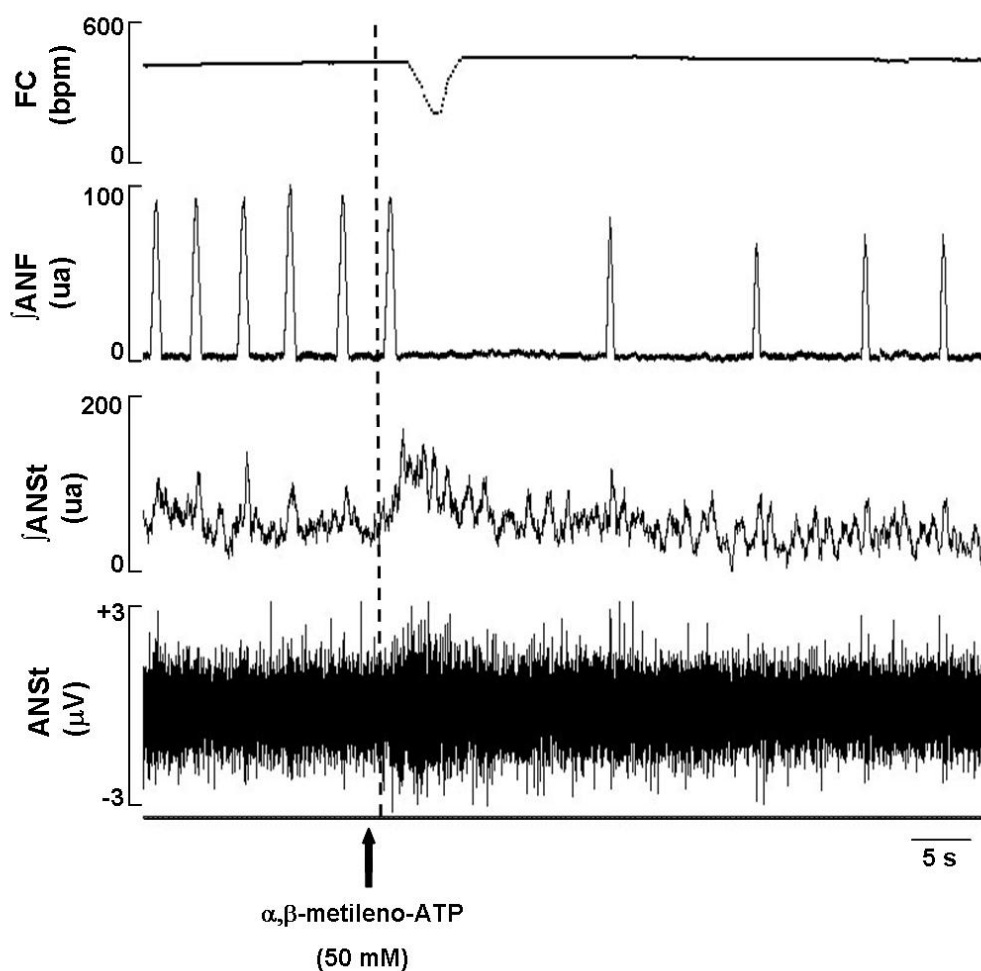


Figura 26: Traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, mostrando a frequência cardíaca (FC, bpm), a atividade integrada do nervo frênico (\int ANF, unidades arbitrárias), a atividade integrada do nervo simpático torácico (\int ANSt, unidades arbitrárias), o registro original do nervo simpático torácico (ANSt, μ V) e as alterações sobre esses parâmetros promovidas pela microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM) no NTS caudal.

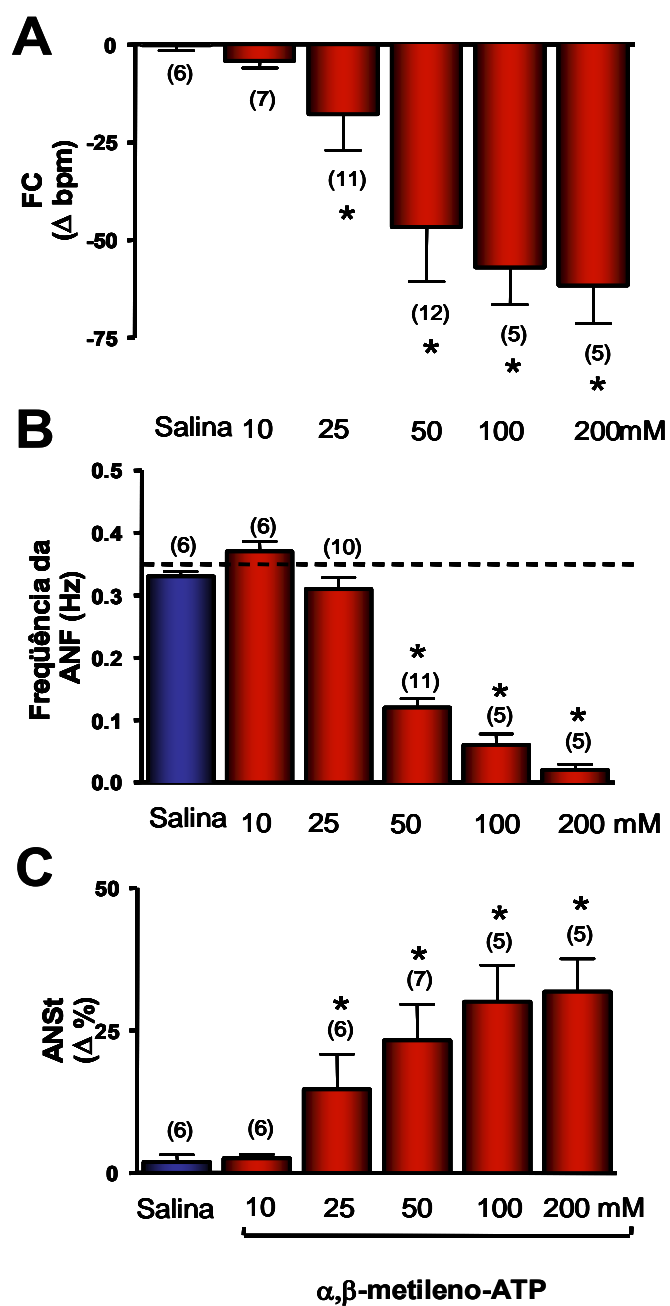


Figura 27: Alterações na frequência cardíaca (FC), na frequência de despolarização do nervo frênico (ANF) e na atividade do nervo simpático torácico (ANSt) decorrente da microinjeção de doses crescentes de α,β -metileno-ATP (10; 25; 50; 100 e 200 mM) em seqüência aleatória no NTS caudal na preparação WHBP. A linha tracejada no painel B indica a frequência basal do nervo frênico (n = nº de preparações).

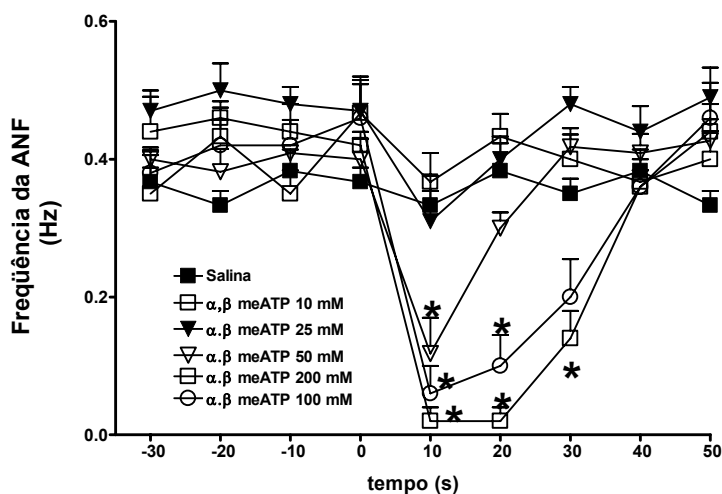


Figura 28: Avaliação de seqüências temporais da freqüência de despolarização do nervo frênico em resposta à microinjeção de doses crescentes de α,β -metileno-ATP 40 segundos antes e 50 segundos após a microinjeção indicada pelo tempo 0.

4.12. Avaliação da freqüência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a microinjeção de α,β -metileno-ATP no NTS caudal antes e após o bloqueio dos receptores purinérgicos com PPADS (10 mM)

A **figura 29** representa as alterações na FC, ANF e na ANSt em resposta a microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM) antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores purinérgicos com PPADS (10 mM) no NTS caudal em 6 preparações WHBP. A microinjeção do PPADS (10 mM) no NTS caudal não alterou os respostas promovidas pela microinjeção do α,β -metileno-ATP, como ilustrado nos painéis A-C. A avaliação temporal da freqüência de despolarização do nervo frênico em resposta à microinjeção de α,β -metileno-ATP antes e após o bloqueio dos receptores purinérgicos com o PPADS (10 mM) está ilustrada no painel A da **figura 31**. Nas tabelas 31-33 do apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF, FC e ANSt em resposta a

microinjeção de α,β -metileno-ATP antes e após o bloqueio dos receptores purinérgicos com o PPADS (10 mM) no NTS caudal.

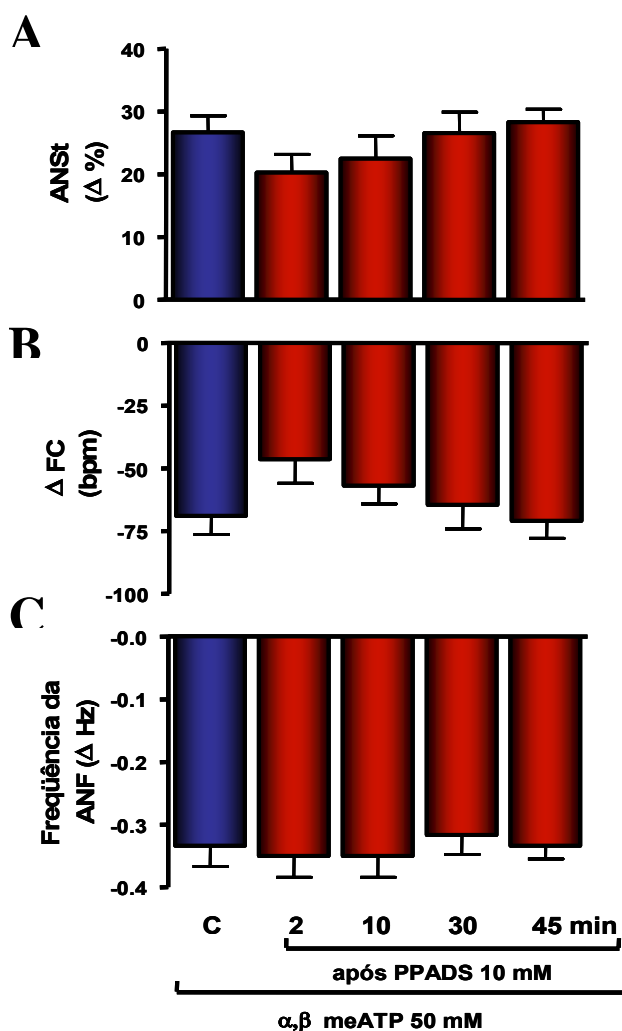


Figure 29: Alterações na ANSt (Δ %, painel A), frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) e na frequência de despolarização do nervo frênico (Δ Hz, painel C) em resposta a microinjeção do α,β -metileno-ATP (50 mM) antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o bloqueio dos receptores purinérgicos com o PPADS (10 mM) microinjetado no NTS caudal (n=6).

4.13. Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a microinjeção de α,β -metileno-ATP no NTS caudal antes e após o antagonismo dos receptores purinérgicos com PPADS (20 mM)

A **figura 30** representa as alterações na FC, ANF e na ANSt em resposta a microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM) antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores purinérgicos com PPADS (20 mM) no NTS caudal em 7 preparações WHBP. O significativo aumento na ANSt (30 ± 4 %) promovido pela microinjeção de α,β -metileno-ATP no NTS caudal foi atenuado 2 (10 ± 2 %), 10 (6 ± 2 %) e 30 minutos (13 ± 3 %) após a microinjeção de PPADS no mesmo sítio no NTS. Tanto a bradicardia quanto o aumento na ANSt em resposta a microinjeção de α,β -metileno-ATP no NTS caudal 45 minutos após o bloqueio com o PPADS foram semelhantes aos valores controle (painel A). A bradicardia promovida pela microinjeção do α,β -metileno-ATP no NTS caudal (painel B) foi significativamente reduzida aos 2 (de -76 ± 29 para -10 ± 9 bpm), 10 (de -76 ± 29 para -15 ± 4 bpm) e 30 minutos (de -76 ± 29 para -31 ± 3 bpm) após o antagonismo dos receptores purinérgicos com PPADS. A microinjeção controle de α,β -metileno-ATP no NTS caudal também promoveu redução da frequência da ANF ($-0,23\pm 0,03$ Δ Hz) antes do antagonismo dos receptores purinérgicos com o PPADS a qual foi atenuada aos 2 ($-0,11\pm 0,04$ Δ Hz), 10 ($-0,06\pm 0,05$ Δ Hz) e 30 minutos após a microinjeção local de PPADS no mesmo sítio do NTS (painel C). Aos 45 minutos após o PPADS, os padrões de respostas promovidas pelo α,β -metileno-ATP foram semelhantes aos valores controle.

A avaliação das seqüências temporais da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta à microinjeção de α,β -metileno-ATP antes e após o bloqueio dos

receptores purinérgicos com o PPADS (20 mM) está ilustrada no painel B da **figura 31**. Nas tabelas 34–36 do apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF, FC e ANSt em resposta a microinjeção de α,β -metileno-ATP antes e após o bloqueio dos receptores purinérgicos com o PPADS (20 mM) no NTS caudal.

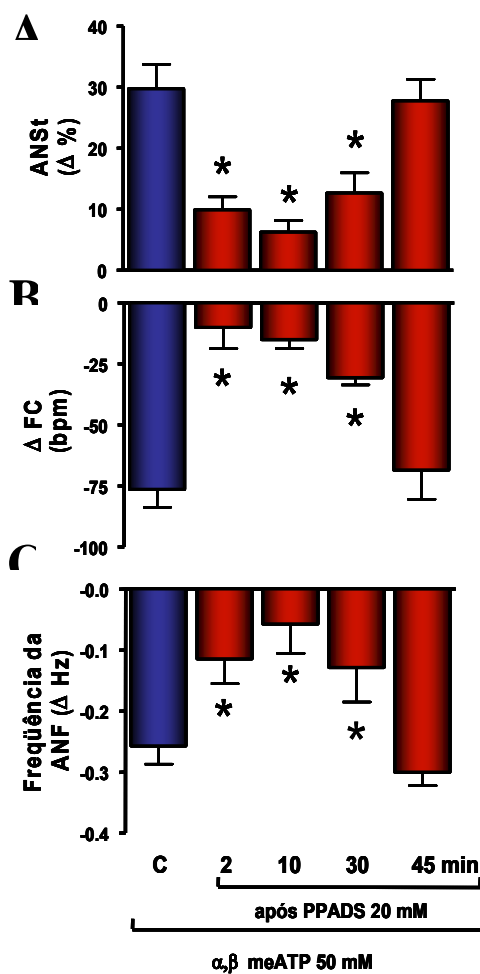


Figure 30: Alterações na ANSt (Δ %, painel A), frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) e na frequência de despolarização do nervo frênico (Δ Hz, painel C) em resposta a microinjeção do α,β -metileno-ATP (50 mM) antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o bloqueio dos receptores purinérgicos com o PPADS (20 mM) microinjetado no NTS caudal (n=7).

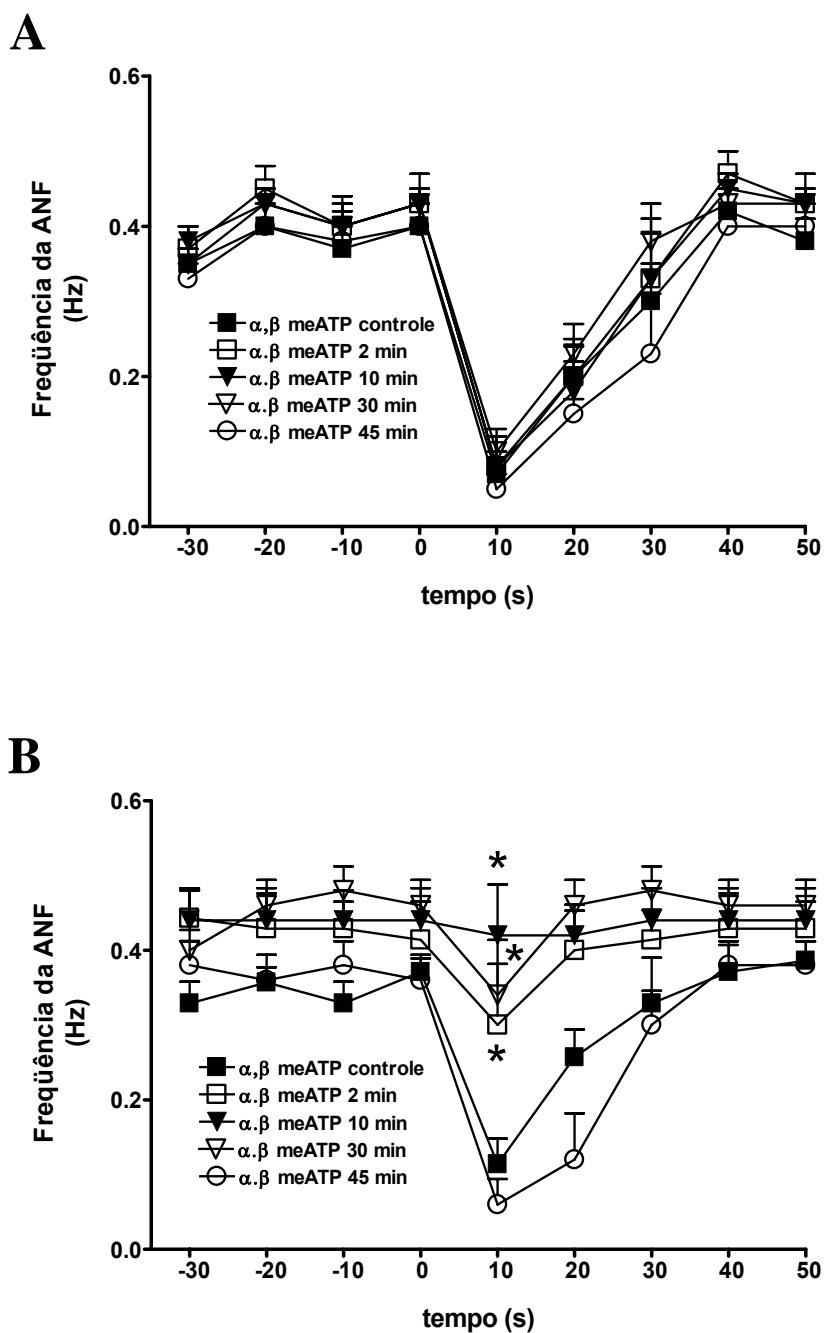


Figura 31: Avaliação das seqüências temporais da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta à microinjeção de α, β -metileno-ATP (50 mM) antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores purinérgicos com o PPADS (10 mM, painel A) e PPADS (20 mM, painel B) microinjetados no NTS caudal.

4.14. Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores purinérgicos com PPADS microinjetado bilateralmente no NTS caudal

A **Figura 32** ilustra um conjunto de traçados representativos das alterações na atividade do nervo simpático torácico, na frequência cardíaca e na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral do PPADS (20 mM) no NTS caudal. A ativação do quimiorreflexo (controle) promoveu um aumento na atividade do nervo simpático torácico [55 ± 2 % (**Figura 33**, painel A)]. A ativação do quimiorreflexo aos 2 (52 ± 4 %), 10 (48 ± 5 %), 30 (54 ± 2 %) e 45 minutos (51 ± 2 %) após a microinjeção bilateral do PPADS no NTS caudal promoveu aumentos da atividade simpática semelhantes à condição controle. A bradicardia promovida pela ativação do quimiorreflexo (**Figura 33**, painel B) também não foi afetada pelo antagonismo dos receptores purinérgicos com o PPADS microinjetado bilateralmente no NTS caudal.

A ativação do quimiorreflexo na condição controle promoveu um aumento da frequência de despolarização do nervo frênico ($0,25 \pm 0,03$ Δ Hz). O painel C da **Figura 33** ilustra a variação da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta à ativação do quimiorreflexo antes e aos 2 ($0,24 \pm 0,03$ Hz), 10 ($0,25 \pm 0,02$ Hz), 30 ($0,22 \pm 0,02$ Hz) e 45 minutos ($0,23 \pm 0,04$ Hz) após o antagonismo dos receptores purinérgicos pelo PPADS, o qual não alterou o aumento da frequência do nervo frênico comparado à ativação controle do quimiorreflexo ($0,25 \pm 0,02$ Hz). A **Figura 34** ilustra as alterações na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após a microinjeção do PPADS no NTS caudal em seqüências temporais. Nas tabelas 37–39 do

apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF, FC e ANSt em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores purinérgicos com o PPADS (20 mM) no NTS caudal.

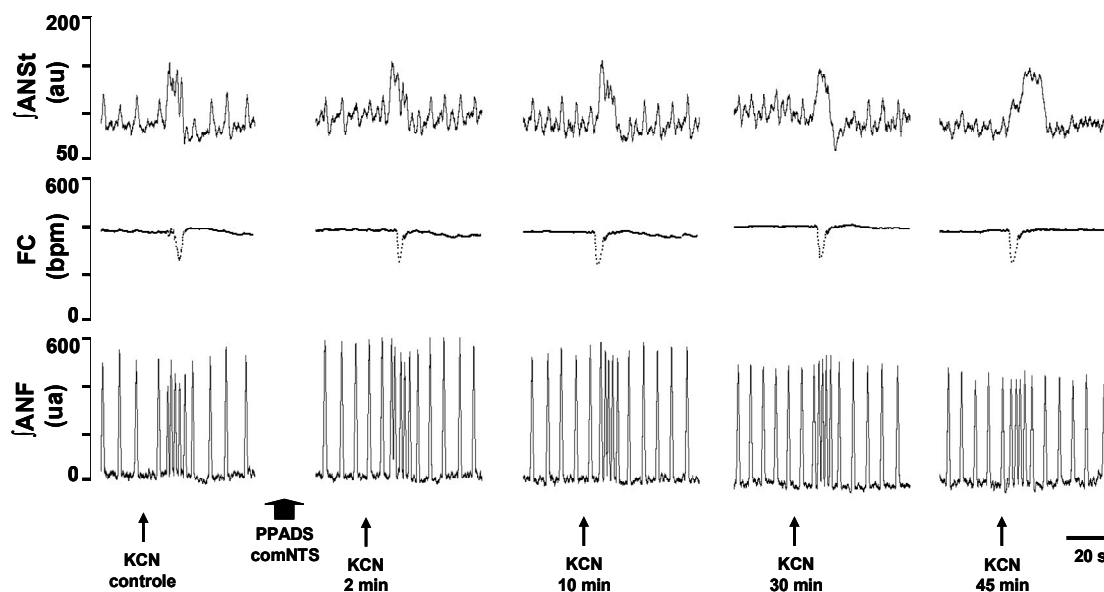


Figure 32: Traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, ilustrando as alterações na atividade integrada do nervo simpático torácico (\int ANSt), na frequência cardíaca (FC) e na frequência de despolarização do nervo frênico (\int ANF) promovidas pela ativação do quimiorreflexo (KCN 0,05 %/0,05 mL) antes e após a microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal.

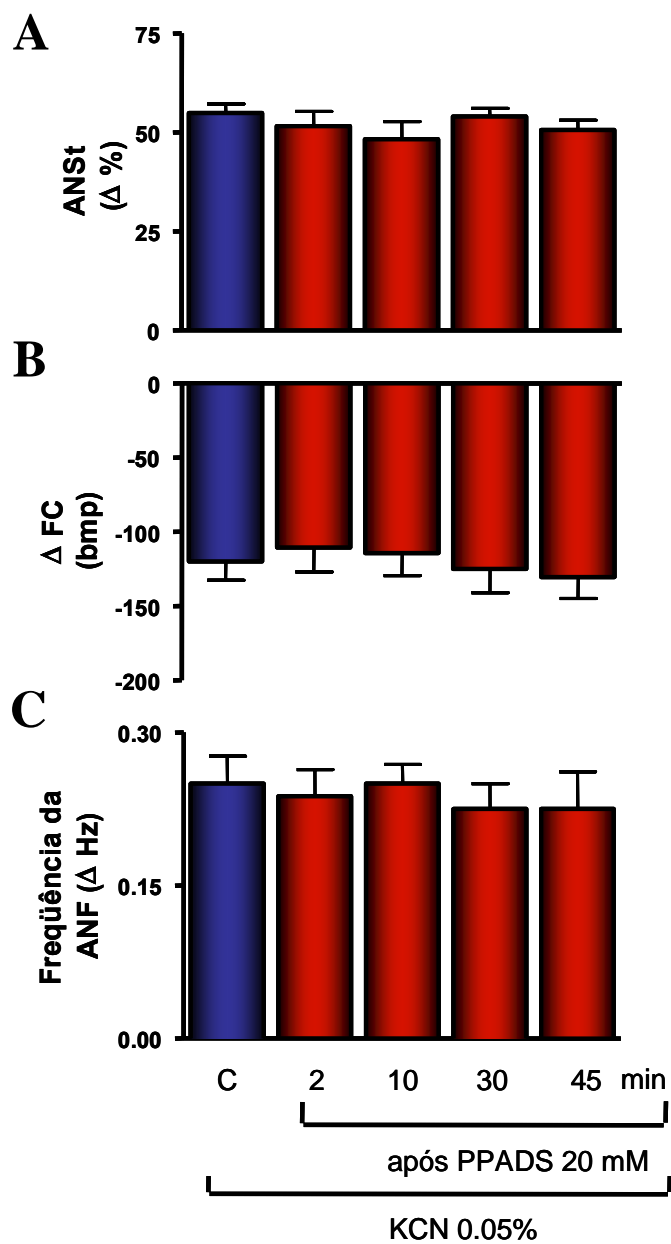


Figure 33: Alterações na ANSt (Δ %, painel A), frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) e na frequência de despolarização do nervo frênico (Δ Hz, painel C) em resposta a ativação do quimiorreflexo (KCN 0,05 %/0,05 mL) antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores purinérgicos pelo PPADS (20 mM) microinjetados no NTS caudal (n=8).

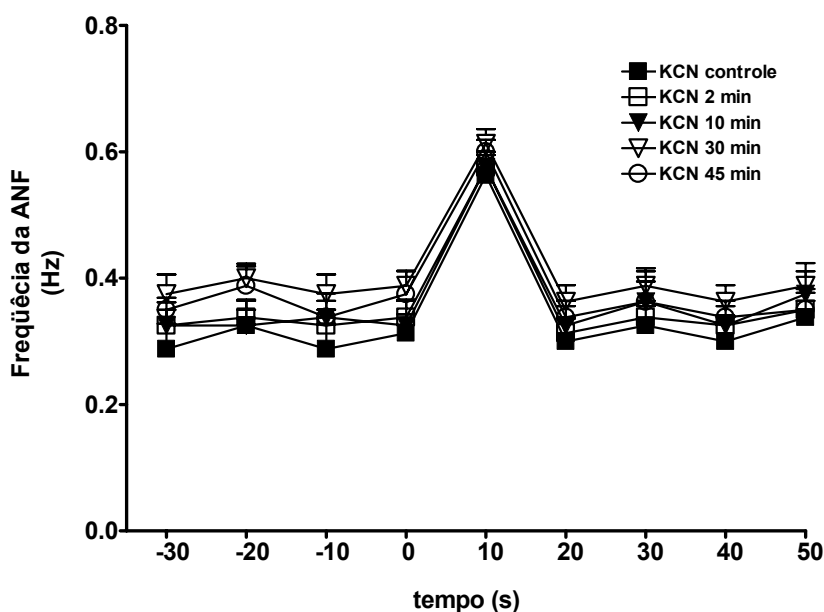


Figura 34: Avaliação das seqüências temporais da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta à ativação do quimiorreflexo com KCN (0,05 %/0,05 mL) antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores purinérgicos com o PPADS (20 mM) microinjetado bilateralmente no NTS caudal.

4.15. Avaliação da frequência cardíaca e da atividade dos nervos frênico e simpático torácico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos com o ácido quinurênico e dos receptores purinérgicos com o PPADS microinjetados bilateralmente no NTS caudal

A **Figura 35** mostra um conjunto de traçados de uma preparação representativa do grupo, ilustrando as alterações na atividade do nervo simpático torácico, na frequência cardíaca e na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos com o ácido quinurênico (250 mM) e dos receptores

purinérgicos com o PPADS (20 mM) microinjetados bilateralmente no NTS caudal. A ativação controle do quimiorreflexo promoveu um aumento da atividade simpática [52 ± 2 % (**Figura 36**, painel A)] o qual foi significativamente atenuado aos 2 (17 ± 1 %), 10 (18 ± 2 %) e 30 minutos (31 ± 2 %) após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico + PPADS no NTS caudal. A bradicardia promovida pela ativação do quimiorreflexo (**Figura 36**, painel B) foi atenuada aos 2 (de -151 ± 17 para -21 ± 3 bpm), 10 minutos (de -151 ± 17 para -17 ± 2 bpm) e 30 minutos (de -151 ± 17 para -37 ± 8 bpm) após a microinjeção bilateral do ácido quinurênico + PPADS no NTS caudal.

A ativação controle do quimiorreflexo promoveu um aumento da frequência de despolarização do nervo frênico ($0,24 \pm 0,02$ Δ Hz). O painel C da **Figura 36** ilustra o aumento da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e 2 ($0,20 \pm 0,02$ Δ Hz), 10 ($0,22 \pm 0,03$ Δ Hz), 30 ($0,20 \pm 0,04$ Δ Hz), 45 ($0,23 \pm 0,04$ Δ Hz) e 60 minutos ($0,21 \pm 0,05$ Δ Hz) após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e purinérgicos pelo o ácido quinurênico e pelo PPADS respectivamente, o qual não afetou o aumento da frequência de despolarização do nervo frênico comparados à ativação do quimiorreflexo controle ($0,24 \pm 0,02$ Δ Hz). A **Figura 37** ilustra as alterações na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o ácido quinurênico + PPADS no NTS caudal em seqüências temporais. Nas tabelas 40–42 do apêndice estão apresentados os valores individuais da ANF, FC e ANSt em resposta a ativação do quimiorreflexo antes e após o antagonismo dos receptores purinérgicos com o PPADS e dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos com o ácido quinurênico no NTS caudal.

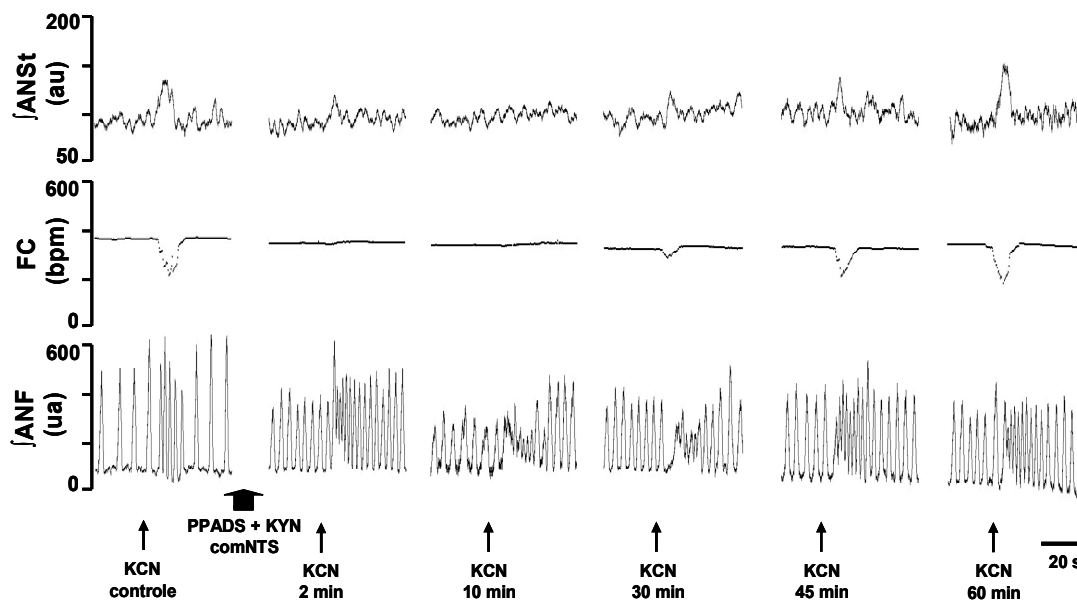


Figure 35: Traçados de uma preparação WHBP, representativa do grupo, ilustrando as alterações na atividade integrada do nervo simpático torácico ($[ANSt]$), na frequência cardíaca (FC) e na frequência de despolarização do nervo frênico ($[ANF]$) promovidas pela ativação do quimiorreflexo (KCN 0,05 %/0,05 mL) antes e após a microinjeção bilateral de PPADS + ácido quinurênico no NTS caudal.

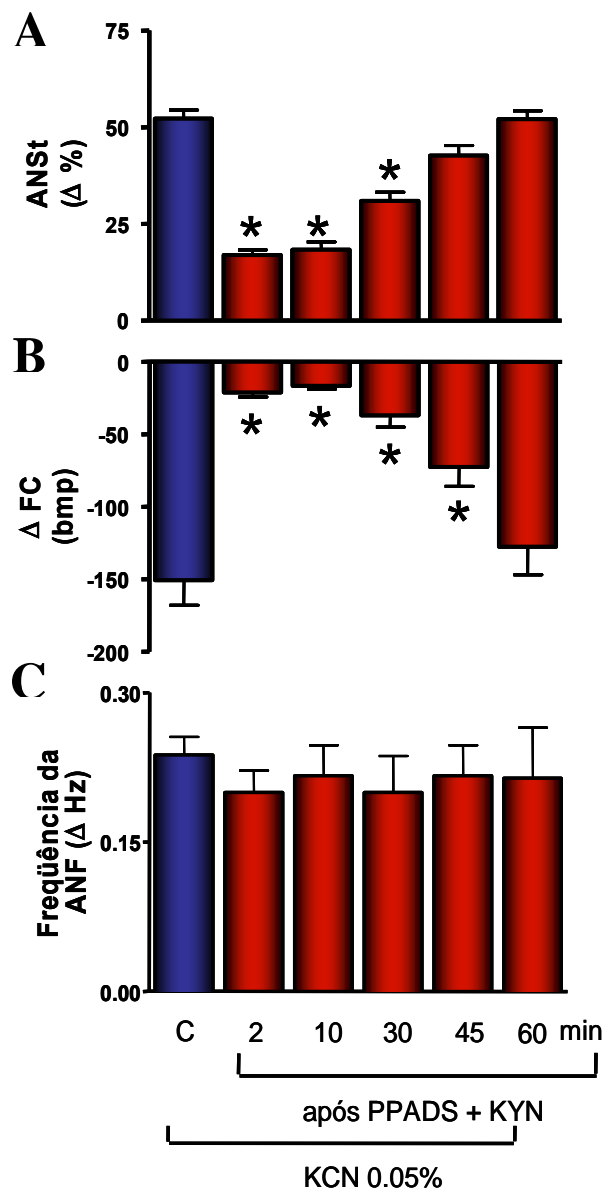


Figure 36: Alterações na ANSt (Δ %, painel A), frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) e na frequência de despolarização do nervo frênico (Δ Hz, painel C) em resposta a ativação do quimiorreflexo (KCN 0,05 %/0,05 mL) antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores purinérgicos pelo PPADS (20 mM) e ionotrópicos do glutamato pelo ácido quinurênico (KYN, 250 mM) microinjetados bilateralmente no NTS caudal (n=9). * Diferente quando comparado à ativação controle do quimiorreflexo ($p < 0,05$).

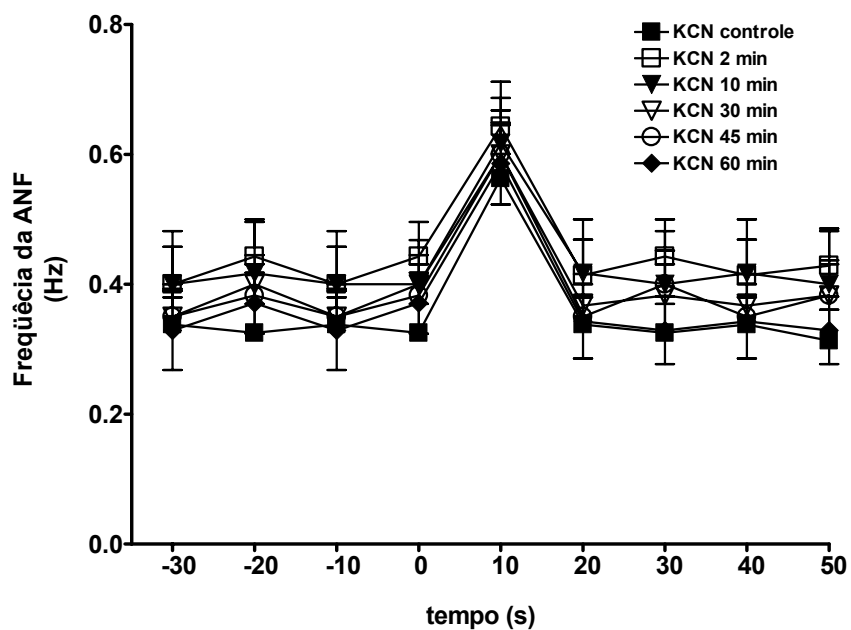


Figura 37: Avaliação das seqüências temporais da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta à ativação do quimiorreflexo com KCN (0,05 %/0,05 mL) antes e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após o antagonismo dos receptores purinérgicos com o PPADS (20 mM) e ionotrópicos do glutamato pelo ácido quinurênico (KYN, 250 mM) microinjetados bilateralmente no NTS caudal.

4.16. Análise Histológica

Apenas os animais que apresentaram histologia positiva para a região do NTS explorada foram utilizados para análise dos dados nos protocolos descritos acima. Na **figura 38** estão ilustrados exemplos de cortes histológicos nos quais as microinjeções foram feitas de maneira unilateral (painéis A e B) e bilateral (painéis C e D).

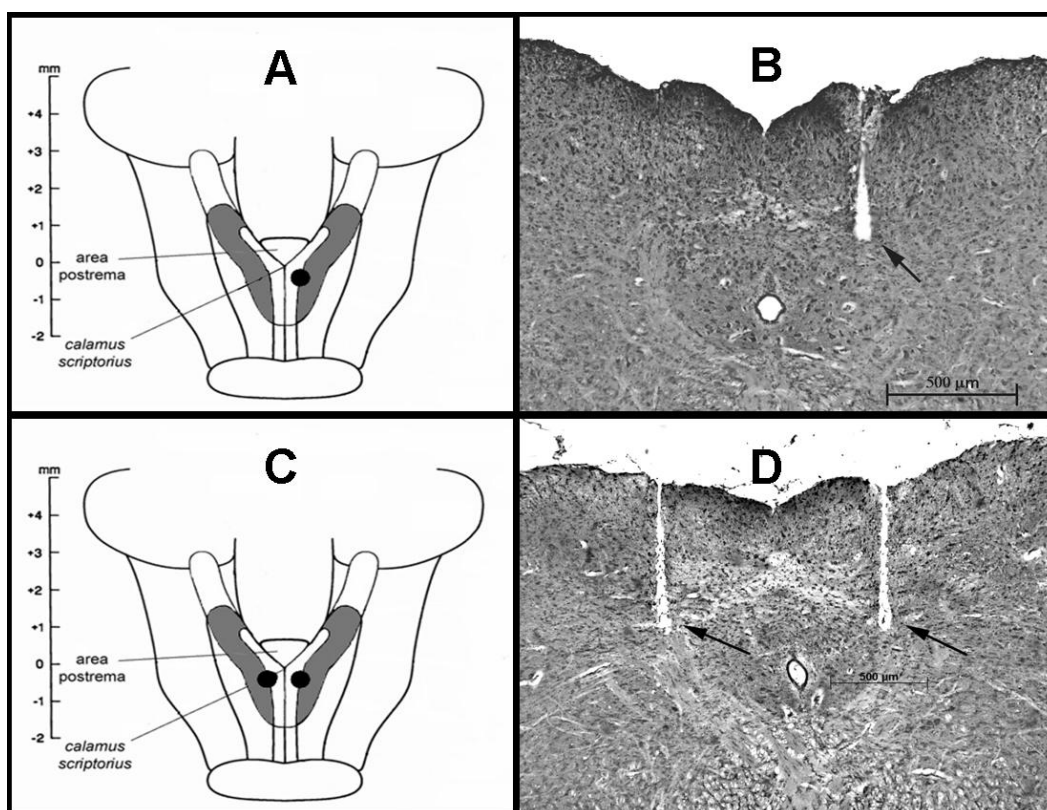


Figura 38. Cortes histológicos de duas preparações WHBP mostrando as microinjeções unilateral (painéis A e B) e bilateral (painéis C e D) no NTS caudal. Os painéis A e C ilustram desenhos esquemáticos de uma vista dorsal de parte do tronco cerebral dando destaque a região do NTS. Os círculos pretos representam os pontos de microinjeção. Os painéis B e D mostram seções transversais do troco cerebral de duas preparações WHBPs ilustrando os sítios de microinjeções no NTS caudal representados pelas setas pretas.

5. DISCUSSÃO

5.1. Considerações metodológicas

A realização de experimentos com microinjeções no núcleo do trato solitário (NTS) de ratos não-anestesiados apresenta uma série de vantagens, uma vez que o sistema nervoso central está livre dos efeitos adversos dos anestésicos. Por outro lado, experimentos realizados em animais anestesiados permitem o uso de micropipetas de vidro para as microinjeções, as quais propiciam a administração de volumes relativamente menores quando comparados às agulhas injetoras utilizadas nos experimentos com ratos não-anestesiados. Além disso, o índice de histologias positivas nas microinjeções realizadas no NTS de ratos anestesiados é significativamente maior, uma vez que o tronco cerebral está exposto e pode ser facilmente visualizado. Deve ser considerado que sob anestesia, a magnitude das respostas respiratórias e cardiovasculares promovidas pelas microinjeções no NTS ou pela ativação de diferentes reflexos pode variar bastante. Assim sendo, os resultados obtidos nesses dois modelos experimentais são quantitativamente diferentes e às vezes qualitativamente opostos, dependendo da espécie animal, do anestésico utilizado e do nível de anestesia (Machado e Bonagamba, 1992). Nesse sentido, microinjeções de L-glutamato no NTS de ratos anestesiados promove hipotensão e bradicardia que se assemelham a ativação do barorreflexo (Leone e Gordon, 1989; Talmam e cols., 1980 e Talman, 1989). Por outro lado, microinjeções de L-glutamato no mesmo sítio do NTS em ratos acordados promove respostas pressora e bradicárdica, similar àquelas promovidas pela ativação dos quimiorreceptores periféricos (Machado e Bonagamba, 1992; Colombari e cols., 1994 e Haibara e cols., 1995). Estudos eletrofisiológicos recentes do nosso laboratório (Accorsi-Mendonça e cols., 2006) mostraram que a uretana promoveu uma redução de 60% na frequência das correntes sinápticas espontâneas GABAérgicas em neurônios do NTS.

No presente estudo, utilizamos uma preparação decerebrada e perfundida artificialmente [preparação coração–tronco cerebral isolados (WHBP); Paton, 1996]. Essa preparação apresenta as vantagens dos dois modelos experimentais descritos acima, uma vez que a preparação mantém íntegros os reflexos cardiovasculares, possui um padrão respiratório motor eupnêico, está livre dos efeitos dos anestésicos e permite o registro simultâneo dos nervos frênico e simpático torácico, bem como a microinjeção de pequenos volumes de drogas no NTS. A visualização direta da superfície dorsal do tronco cerebral usando um microscópio para realizar as microinjeções no NTS é outra vantagem desse modelo experimental quando comparado ao rato não–anestesiado, no qual as microinjeções são realizadas após o prévio implante de cânulas–guia em direção ao NTS, o que se traduz em um índice relativamente baixo de histologias positivas. Por outro lado, a preparação apresenta algumas desvantagens como: a) baixa temperatura da solução de perfusão (32° C) promovendo uma redução no metabolismo, b) a ausência de áreas hipotalâmicas importantes, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), envolvidas na modulação da atividade eferente simpática, as quais são retiradas durante o procedimento de decerebração; e c) o nervo simpático registrado (nervo simpático torácico) não é o mais representativo quando se trata de resistência periférica. Assim, o registro de outros segmentos do nervo simpático como o esplâncnico, o lombar ou o renal poderiam ser mais representativos da atividade simpática devotada a resistência periférica total.

No presente estudo, utilizamos a preparação coração tronco–cerebral isolados (WHBP) para estudar a neurotransmissão glutamatérgica e purinérgica nos neurônios do NTS e sua possível participação nas vias do quimiorreflexo periférico. A preparação WHBP apresenta algumas vantagens quando comparada aos animais não–anestesiados, pois permite o registro dos potenciais dos nervos frênico e simpático, a microinjeção de

diferentes agonistas e antagonistas em diferentes sub-regiões do NTS, assim como avaliar o comportamento dos componentes respiratório (atividade do nervo frênico), autonômico simpático, representado pelo nervo simpático torácico e parassimpático, representado pela frequência cardíaca, em resposta à ativação dos diferentes reflexos cardiovasculares.

5.2. O quimiorreflexo na preparação WHBP

No primeiro protocolo, o objetivo foi avaliar as respostas autonômicas e respiratórias frente à estimulação dos quimiorreceptores periféricos. A estimulação, feita com KCN (0,05 %/0,05 mL), promoveu um aumento significativo na atividade dos nervos frênico e simpático, assim como uma resposta bradicárdica de grande magnitude como mostrado na figura 4. Além disso, quando comparamos qualitativamente as respostas cardiovasculares e respiratórias frente à ativação do quimiorreflexo na preparação WHBP com aquelas observadas em animais não-anestesiados (Franchini e Krieger, 1993; Haibara e cols., 1995, 1999; Machado e Bonagamba 2005) verificamos um padrão de respostas muito semelhante em ambos os casos. Portanto, a preparação WHBP se apresenta como um modelo experimental viável para estudarmos a neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS, como já havia sido documentado por Paton e cols. (2002).

5.3. O L-glutamato e os receptores de aminoácidos excitatórios no NTS caudal

A microinjeção de doses crescentes de L-glutamato no NTS caudal promoveu um padrão de respostas dose-dependente para as alterações na atividade do nervo simpático torácico (excitação simpática), na frequência cardíaca (bradicardia) e na atividade do nervo frênico (bradipnéia) como ilustrado na figura 8. As respostas de excitação simpática, bradicardia e redução na frequência de despolarização do nervo frênico produzidas pela

microinjeção de L–glutamato no NTS caudal na preparação WHBP estão de acordo com o estudo de Almado e Machado (2005), no qual a microinjeção de agonistas de L–glutamato (NMDA e AMPA) nesta mesma sub–região do NTS de ratos não–anestesiados promoveu resposta pressora, bradicardia e dispnéia.

As respostas autonômicas promovidas pela microinjeção de L–glutamato no NTS caudal no presente trabalho (simpato–excitação e bradicardia) foram semelhantes ao padrão de respostas promovido pela ativação do quimiorreflexo, entretanto com intensidade menor. A excitação simpática promovida pela microinjeção de L–glutamato no NTS caudal pode ter sido decorrente da ativação de neurônios do NTS que enviam projeções para o bulbo ventrolateral rostral (RVLM). Essas projeções excitatórias do NTS para o RVLM foram demonstradas por meio de estudos eletrofisiológicos realizados por Koshiya e Guyenet (1996a). De acordo com Dick e cols. (2004) e Guyenet (2006), a atividade simpática basal pode ser decomposta em pelo menos dois componentes: a) um componente tônico, que envolve neurônios do NTS que se projetam para os neurônios do RVLM e b) um componente respiratório que, além do NTS, envolve também áreas pontinas como o núcleo Kölliker–Fuse. Em nossos resultados, a ativação simpática ocorre concomitante à bradipnéia, o que reduz a influência da ventilação sobre a atividade simpática (redução do componente respiratório). Desse modo, o componente simpático que estaria sendo ativado seria o componente tônico. Estudos de Koshiya e Guyenet (1996b) mostraram que o bloqueio da atividade do nervo frênico pela microinjeção de muscimol (agonista GABA_A) no bulbo ventrolateral caudal (CVLM) promoveu uma mudança do padrão oscilatório da atividade simpática, uma vez que o componente respiratório foi bloqueado. Entretanto, a padrão tônico assumido pela atividade simpática foi capaz de responder à estimulação dos quimiorreceptores tanto com NaCN quanto com N₂.

Com relação à resposta bradicárdica à microinjeção de L-glutamato no NTS caudal, podemos sugerir que neurônios desta sub-região do NTS que enviam projeções para o núcleo ambíguo [NA, (Kalia & Sullivan, 1982)] uma vez excitados, promovem um aumento do tônus parassimpático para o coração pela estimulação de neurônios pré-ganglionares parassimpáticos. Ambos os receptores ionotrópicos e metabotrópicos do glutamato parecem estar envolvidos na bradicardia observada em nossos experimentos. Em um estudo anterior do nosso laboratório (Antunes e cols., 2004), foi documentado que tanto o NMDA quanto o *trans*-ACPD microinjetados no NTS promovem bradicardia. Além disso, o trabalho de Antunes e cols. (2004) mostrou que a resposta de bradicardia ao *trans*-ACPD foi bloqueada pelo AP-5 (um antagonista seletivo dos receptores do NMDA) indicando que a bradicardia promovida pela microinjeção do agonista metabotrópico (*trans*-ACPD) no NTS envolve a ativação dos receptores NMDA.

A bradipnéia promovida pela microinjeção de L-glutamato pode ter sido decorrente da excitação de neurônios do NTS que enviam projeções para áreas da região dorsolateral da ponte como os núcleos Kölliker-Fuse e Parabraquial, determinando a inibição de neurônios inspiratórios e a excitação de neurônios expiratórios, prolongando assim o intervalo entre as despolarizações do nervo frênico, como representado na figura 7, o que está de acordo com os resultados de Koshiya & Guyenet (1994) e Chamberlin & Saper (1994 e 1998). Além disso, Lipiski e col. (1977), por meio do registro do nervo frênico, mostrou que a aplicação iontoforética de aminoácidos excitatórios no NTS (grupo respiratório dorsal) promove um prolongamento da expiração pela estimulação do núcleo motor do frênico por uma via monossináptica. Ademais, o L-glutamato poderia atuar sobre neurônios expiratórios chamados “pump cells”, presentes no NTS e envolvidos no reflexo de Hering-Breuer (Bonham e McCrimmon, 1990 e Bonham e cols., 1993).

A microinjeção de L-glutamato após o antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos com o ácido quinurênico (250 mM) promoveu um aumento na frequência de despolarização do nervo frênico, ao invés de uma redução (Figuras 9 e 10). Assim, testamos a hipótese que o L-glutamato estaria atuando também em receptores metabotrópicos para promover o aumento na frequência de despolarização do nervo frênico. Nesse sentido, investigamos as alterações promovidas pela microinjeção de doses crescentes do agonista metabotrópico não seletivo do L-glutamato (*trans*-ACPD) no NTS caudal. Nesta sub-região do NTS, a microinjeção de *trans*-ACPD promoveu taquipnéia, bradicardia e não alterou a atividade simpática torácica. Nossos resultados indicaram que o L-glutamato no NTS caudal, atuando sobre neurônios envolvidos no controle respiratório, ativa principalmente receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Além da ativação dos receptores ionotrópicos, o L-glutamato ativa também receptores metabotrópicos produzindo um aumento na atividade do nervo frênico (taquipnéia). A taquipnéia foi bloqueada quando um antagonista de receptores metabotrópicos do L-glutamato (MCPG) foi associado ao ácido quinurênico (Figuras 15 e 16). O envolvimento dos receptores metabotrópicos na taquipnéia promovida pela microinjeção do L-glutamato após o antagonismo dos receptores ionotrópicos com o ácido quinurênico é confirmado também pelos resultados obtidos no protocolo experimental no qual foram microinjetadas doses crescentes de *trans*-ACPD no NTS caudal, as quais promoveram um aumento da frequência de despolarização do nervo frênico de maneira dose-dependente.

5.4. O ATP e os receptores purinérgicos no NTS caudal

Além do L-glutamato, avaliamos também a participação do ATP nas vias neurais envolvidas no processamento do quimiorreflexo no NTS caudal. Existem evidências na literatura sobre o envolvimento do ATP e dos receptores P2 no controle neural do sistema cardiovascular (Ergene e cols., 1994; Barraco e cols., 1996; Scislo e cols., 1997, de Paula e cols., 2004; Antunes e cols., 2005a). A microinjeção do ATP no NTS de ratos anestesiados produz hipotensão e bradicardia (Ergene e cols., 1994; Barraco e cols., 1996), as quais foram bloqueadas pelo suramin (um antagonista não seletivo dos receptores P2). Além disso, Scislo e cols. (1998) mostraram que a microinjeção de suramin no NTS bloqueou a bradicardia do barorreflexo, sugerindo a participação do ATP no controle reflexo da pressão arterial.

Em nossos experimentos, optamos por utilizar o α,β -metileno-ATP e não o ATP para estimular os receptores purinérgicos. Nosso principal argumento a favor do α,β -metileno-ATP em relação ao ATP é o fato de que esse agonista sintético do ATP é um composto estável e que não sofre a ação das ecto-nucleotidases resultando na degradação em adenosina como acontece com o ATP. Isso se faz importante no contexto do nosso estudo, pois sabemos que a adenosina, atuando nos receptores A1 e A2a, pode ativar neurônios relacionados ao controle autonômico no NTS o que dificultaria a avaliação das respostas ao ATP (Scislo & O'Leary, 2000; de Paula & Machado, 2001).

Nesse sentido, a microinjeção de doses crescentes de α,β -metileno-ATP no NTS caudal na preparação WHBP produziu aumento na atividade simpática, bradicardia e redução na frequência de despolarização do nervo frênico (figura 27), um padrão de respostas muito semelhante àquele promovido pela microinjeção do L-glutamato (figura 8).

O aumento dose-dependente da atividade simpática em resposta ao α,β -metileno-ATP no NTS caudal está de acordo com os estudos de de Paula e cols. (2004) e Antunes e cols. (2005a) nos quais os autores mostraram que o ATP microinjetado no NTS caudal de ratos acordados promoveu aumento da pressão arterial de maneira dose-dependente, o qual foi mediado por um aumento da atividade simpática, uma vez que a injeção intravenosa de prazosin aboliu essa resposta. Nossos resultados sugerem que a microinjeção de α,β -metileno-ATP no NTS ativaria neurônios de última ordem do NTS, os quais enviariam suas projeções diretamente para neurônios da região do RVLM. Essa hipótese é baseada nos estudos de Scislo e cols. (2001), que sugeriram a existência de receptores purinérgicos P2X em neurônios de última ordem do NTS e que se projetam diretamente para neurônios pré-ganglionares simpáticos do RVLM e desta área para a coluna intermediolateral da medula espinhal.

Com relação à bradicardia promovida pela microinjeção do α,β -metileno-ATP no NTS caudal, nossos resultados também estão de acordo com os estudos de de Paula e cols. (2004) e Antunes e cols. (2005a) realizados em ratos acordados. Além disso, Kitchen e cols. (2006) demonstraram que tanto o bloqueio dos receptores muscarínicos por meio da atropina (2mg/Kg i.v.) quanto o bloqueio dos receptores β_1 -adrenérgicos por meio do atenolol (2mg/Kg i.v.) atenuou a bradicardia promovida pela ativação dos receptores P2X com o α,β -metilenoATP no NTS. Esses resultados sugerem que essa bradicardia é mediada por dois mecanismos distintos que se somam: a) aumento do tônus parassimpático para o coração e b) uma redução do tônus simpático para o coração.

Além das alterações autonômicas, avaliamos também as alterações na atividade do nervo frênico frente à microinjeção de doses crescentes de α,β -metileno-ATP no NTS

caudal. A microinjeção unilateral do α,β -metileno-ATP promoveu uma redução na frequência de despolarização do nervo frênico de maneira dose-dependente (figura 27). Apesar de várias evidências existentes na literatura referentes a participação do ATP e dos receptores P2 com o controle central da respiração, existem poucos trabalhos que avaliaram as respostas respiratórias promovidas pela microinjeção do α,β -metileno-ATP no NTS caudal. Estudos de Gourine e cols. (2005), Gourine (2005) e Prabhakar (2006), por exemplo, demonstraram a participação do ATP como neurotransmissor no corpúsculo carotídeo e também na região ventral do bulbo (grupo respiratório ventral). Estudos do nosso laboratório (Antunes e cols., 2005b) utilizando a preparação WHBP mostraram que o ATP microinjetado no NTS caudal promoveu aumento da atividade do nervo frênico. Entretanto, como já discutido anteriormente, as respostas observadas por Antunes e col. (2005b) podem ter sido decorrentes da metabolização do ATP em adenosina e esta purina teria desencadeado o aumento da frequência de despolarização do nervo frênico. Por outro lado, no presente estudo, utilizamos o α,β -metileno-ATP o qual, por ser uma agonista mais estável, não é degradado em adenosina, sugerindo que a resposta sobre a atividade do nervo frênico frente à ativação dos receptores P2 no NTS é de redução na sua frequência de despolarização. Nossos resultados estão de acordo com os estudos de Phillips e cols. (1997), nos quais os autores mostraram que a microinjeção de α,β -metileno-ATP, atuando sobre os receptores P2, no NTS ao nível do *calamus scriptorius*, promoveu diminuição do volume corrente e da frequência respiratória.

5.5. O quimiorreflexo e os receptores de aminoácidos excitatórios no NTS

Uma vez caracterizadas todas as repostas promovidas pela ativação dos receptores glutamatérgicos no NTS caudal, assim como o bloqueio dessas repostas com o objetivo de estabelecer as doses dos antagonistas glutamatérgicos a serem utilizadas nos experimentos subsequentes, nosso próximo passo foi a realização dos experimentos nos quais o quimiorreflexo foi ativado antes e após o bloqueio dos receptores glutamatérgicos no NTS caudal por meio dos antagonistas (ácido quinurênico e MCPG) utilizados nos protocolos anteriores. Nesse sentido, como nos experimentos com os agonistas, aqui realizamos três protocolos distintos: a) o bloqueio apenas dos receptores ionotrópicos do glutamato por meio do ácido quinurênico, b) o bloqueio dos receptores metabotrópicos por meio da microinjeção do MCPG e c) o bloqueio simultâneo (receptores ionotrópicos e metabotrópicos do glutamato) por meio da combinação do ácido quinurênico e do MCPG. Realizamos também um protocolo no qual foram feitas as microinjeções de ácido quinurênico com o MCPG em seis sítios no sentido rostro-caudal ao longo do NTS com o objetivo de atingir todas as regiões do NTS e assim bloquear todas as possíveis sinapses das vias neurais do quimiorreflexo no NTS.

Com relação à resposta simpato-excitatória promovida pela ativação do quimiorreflexo na preparação WHBP, nossos resultados mostraram que o bloqueio de todos os subtipos de receptores ionotrópicos e metabotrópicos do glutamato, por meio da microinjeção dos antagonistas ácido quinurênico e MCPG no NTS caudal, não alterou o aumento significativo da atividade simpática torácica, confirmando estudos prévios do nosso laboratório realizados em ratos não-anestesiados (Haibara e cols., 1995, 1999; Machado & Bonagamba, 2005). Além disso, o bloqueio ao longo de todo o NTS também não alterou o aumento da atividade simpática em resposta ao quimiorreflexo. Uma das

principais contribuições do presente estudo foi a avaliação do papel do L-glutamato e dos seus receptores na neurotransmissão do componente simpato–excitatório do quimiorreflexo no NTS com a vantagem do registro direto da atividade eferente simpática, ao passo que os estudos anteriores (Haibara e cols., 1995, 1999; Machado & Bonagamba, 2005) avaliaram o componente simpato–excitatório do quimiorreflexo frente ao antagonismo dos receptores glutamatérgicos no NTS caudal de maneira indireta por meio do registro da pressão arterial.

Estudos existentes na literatura realizados em ratos anestesiados documentaram que a resposta pressora à ativação do quimiorreflexo foi reduzida significativamente por meio do bloqueio dos receptores ionotrópicos do glutamato na mesma sub–região do NTS explorada no presente estudo (Zhang & Mifflin, 1993; Vardhan e cols., 1993). Entretanto, os estudos conduzidos sob anestesia podem comprometer as respostas do quimiorreflexo, uma vez que estudos do nosso laboratório documentaram que a anestesia pela uretana altera as respostas à microinjeção de L-glutamato no NTS (Machado & Bonagamba, 1992) e a neurotransmissão GABAérgica em neurônios do NTS (Acorsi–Mendonça e cols., 2006).

Estudos de Haibara e cols. (1995, 1999), realizados em ratos não–anestesiados, mostraram que os antagonistas dos receptores ionotrópicos do glutamato como o DNQX e o ácido quinurênico produzem alterações significativas na linha de base da pressão arterial, provavelmente pelo bloqueio de receptores de neurônios envolvidos na via simpato–inibitória do barorreflexo. Assim, Haibara e cols. (1999) verificaram que a magnitude da resposta pressora à ativação do quimiorreflexo após a microinjeção do ácido quinurênico no NTS intermediário e caudal foi significativamente reduzida, o que poderia ser explicado, pelo menos em parte, pela elevação na linha de base da pressão arterial média. Além disso, Machado e Bonagamba (2005) conduziram um estudo no qual foi realizada a microinjeção de ácido quinurênico em diferentes sítios no NTS caudal e intermediário. Após a

microinjeção do ácido quinurênico, os autores promoveram a ativação do quimiorreflexo associada à infusão periférica de nitroprussiato de sódio (um doador de óxido nítrico) com o objetivo de manter a pressão arterial basal próxima aos valores observados antes da microinjeção do antagonista no NTS. Assim, os autores demonstraram que o antagonismo dos receptores glutamatérgicos no NTS não afetou a magnitude da resposta pressora do quimiorreflexo, sugerindo que outros neurotransmissores além do glutamato poderiam estar envolvidos na neurotransmissão do componente simpato–excitatório do quimiorreflexo no NTS.

Os resultados apresentados mostraram que apenas o bloqueio dos diferentes subtipos de receptores glutamatérgicos no NTS caudal, assim como ao longo de todo o NTS, não afetou o aumento da atividade simpática torácica em resposta a ativação do quimiorreflexo. Considerando que: a) as doses dos antagonistas utilizadas em nossos experimentos foram efetivas em bloquear as respostas promovidas pela microinjeção do L–glutamato no NTS caudal, b) o NTS caudal é o sub–núcleo do NTS responsável pela a integração e o processamento das respostas do quimiorreflexo (Chitravanshi e cols., 1994; Chitravanshi & Sapru, 1995; Sapru, 1996; Colombari e cols., 1996; Sato e cols., 2003), e c) a lesão eletrolítica do NTS caudal aboliu a bradicardia e principalmente a resposta pressora promovida pela ativação do quimiorreflexo (Colombari e cols., 1996), podemos sugerir que outros neurotransmissores além do glutamato poderiam estar envolvidos na neurotransmissão do componente simpato–excitatório do quimiorreflexo no NTS.

Com relação à resposta de bradicardia promovida pela ativação do quimiorreflexo, estudos anteriores do nosso laboratório documentaram que o componente parassimpato–excitatório do quimiorreflexo é mediado por receptores ionotrópicos do glutamato do

subtipo NMDA no NTS (Haibara e cols., 1995, 1999). Os resultados do presente trabalho são consistentes com os estudos anteriores, pois o ácido quinurênico quase aboliu a bradicardia promovida pela ativação dos quimiorreceptores periféricos. Além da participação dos receptores ionotrópicos do glutamato na neurotransmissão do componente parassimpático do quimiorreflexo, nossos resultados mostram que os receptores metabotrópicos do glutamato também participam dessa neurotransmissão, uma vez que a resposta bradicárdica foi apenas atenuada pelo ácido quinurênico e foi completamente abolida quando o ácido quinurênico foi associado ao antagonista metabotrópico MCPG.

5.6. O quimiorreflexo e os receptores purinérgicos no NTS

Com o objetivo de estabelecer uma dose de antagonista a ser utilizada nos experimentos com o quimiorreflexo, avaliamos as respostas autonômicas e respiratórias ao α,β -metileno-ATP antes e após diferentes doses do antagonista purinérgico PPADS microinjetado unilateralmente no NTS caudal. Nossos resultados mostraram que a dose de 20 mM de PPADS foi efetiva em atenuar mais de 50% da magnitude das respostas promovidas pela microinjeção do α,β -metileno-ATP (figura 30). Uma vez estabelecida a dose do antagonista efetiva na redução das respostas autonômicas e respiratórias à microinjeção do α,β -metileno-ATP, iniciamos os experimentos nos quais avaliamos a participação dos receptores purinérgicos na neurotransmissão dos componentes simpato-excitatório, parassimpato-excitatório e respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal. O antagonismo dos receptores purinérgicos por meio da microinjeção bilateral de PPADS no NTS caudal não afetou as respostas autonômicas e respiratórias promovidas pela ativação do quimiorreflexo (Figuras 33 e 34). Assim como observado nos resultados com o bloqueio dos receptores glutamatérgicos, apenas o bloqueio dos receptores purinérgicos não alterou

as respostas promovidas pela ativação do quimiorreflexo no NTS caudal, sugerindo que o ATP, não seria o único neurotransmissor envolvido no processamento e na integração dessas respostas no NTS.

5.7. O quimiorreflexo e o bloqueio dos receptores de aminoácidos excitatórios e purinérgicos no NTS

Levando em consideração os resultados discutidos até aqui, começamos a considerar uma possível interação entre o L-glutamato e o ATP no processamento das vias do quimiorreflexo no NTS caudal. Existe na literatura uma série de estudos documentando uma possível co-transmissão entre o L-glutamato e o ATP em diversas áreas no sistema nervoso central. Yao & Lawrence (2005) documentaram a existência de uma interação entre ATP, L-glutamato e noradrenalina no locus coeruleus de ratos anestesiados modulando o sistema cardiovascular. Além disso, Gu & Macdermott (1997) mostraram que os receptores P2X se localizam pré-sinápticamente nos terminais de axônios de neurônios excitatórios podendo levar a liberação de glutamato em culturas de neurônios da medula espinhal. Em um estudo subsequente, Nakatsuka & Gu (2001) por meio de registros eletrofisiológicos mostraram que o α,β -metileno-ATP promove a liberação de L-glutamato em fatias da lâmina V do corno dorsal da medula espinhal de ratos.

Com relação ao NTS, o estudo de Kato e Shigetomi (2001) foi o primeiro a demonstrar que o ATP levava a liberação de glutamato em registros na configuração “whole-cell patch-clamp” em neurônios de segunda ordem em fatias da porção caudal do NTS. Nesse estudo os autores mostraram que o ATP após ser degradado em adenosina atua nos receptores A1 pré-sinápticos inibindo a liberação do glutamato. Por outro lado, o efeito direto do ATP atuando pré-sinápticamente nos receptores P2X estimula a liberação do

glutamato. Posteriormente, Shigetomi e Kato (2004), por meio da técnica de patch-clamp em fatias do NTS caudal, mostraram que o α,β -metileno-ATP leva a liberação de glutamato por um mecanismo dependente de canais de Ca^{+2} . No mesmo ano, Jin e cols. (2004) mostraram, por meio de estudos eletrofisiológicos, que a ativação dos receptores purinérgicos P2 pelo α,β -metileno-ATP no NTS promove a liberação de glutamato.

Os dados discutidos até aqui indicam que são muitas as evidências a favor de uma possível interação entre o glutamato e o ATP no NTS. No caso do nosso estudo, testamos a hipótese de que essa interação poderia acontecer no processamento dos componentes simpato-excitatório, parassimpato-excitatório e respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal. Para tal, realizamos uma série de experimentos nos quais as respostas autonômicas e respiratórias decorrentes da ativação do quimiorreflexo foram avaliadas antes e após a combinação do ácido quinurênico com o PPADS ambos microinjetados bilateralmente no NTS caudal. Com esses experimentos conseguimos bloquear a resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo como ilustrado nas figuras (35 e 36).

Nossos resultados relacionados ao bloqueio da componente simpato-excitatório do quimiorreflexo pela combinação da microinjeção dos antagonistas glutamatérgico (ácido quinurênico) e purinérgico (PPADS) no NTS caudal estão de acordo com os resultados recentemente obtidos em nosso laboratório em ratos não-anestesiados e ainda não publicados. Nesses estudos foram feitas as microinjeções de ácido quinurênico e de PPADS nas porções intermediária e caudal do NTS associada à infusão periférica do nitroprussiato de sódio para a normalização da pressão arterial durante a ativação do quimiorreflexo. A combinação do ácido quinurênico com o PPADS no NTS foi efetiva na redução significativa da resposta pressora do quimiorreflexo. Esses resultados em conjunto mostram

que a neurotransmissão do componente simpato–excitatório do quimiorreflexo no NTS envolve o L–glutamato e ATP.

Com base nos nossos resultados podemos sugerir que o processamento do componente simpato–excitatório do quimiorreflexo no NTS pode envolver populações de neurônios diferentes que se projetam para diferentes centros integrativos no sistema nervoso central, responsáveis pela modulação da atividade eferente simpática, como o RVLM, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o núcleo parabraquial (PBN) (Haibara e cols., 2002; Guyenet, 2000 e 2006; Koshyia & Guyenet, 1996a; Reddy e cols., 2005). Essas diferentes populações de neurônios presentes no NTS utilizariam como neurotransmissores o L–glutamato e o ATP. Assim, apenas um dos neurotransmissores seria suficiente para a manutenção da resposta simpato–excitatória do quimiorreflexo e a única maneira de abolir essa resposta seria o bloqueio simultâneo dos receptores desses dois neurotransmissores. Os mecanismos intrínsecos dessa interação entre o L–glutamato e o ATP, ao nível celular e sináptico no NTS, responsáveis por promoverem a simpato–excitação durante a ativação do quimiorreflexo ainda precisam ser esclarecidos e faz–se necessária a utilização de técnicas de eletrofisiologia e imunohistoquímica.

5.8. O componente respiratório do quimiorreflexo

Com relação às respostas respiratórias da ativação do quimiorreflexo, nossos resultados mostraram que a ativação do quimiorreflexo na preparação WHBP produziu aumento da frequência de despolarização do nervo frênico. A magnitude do aumento na frequência de despolarização do nervo frênico não foi afetada pelo bloqueio dos receptores de aminoácidos excitatórios com o ácido quinurênico, o MCPG ou ácido quinurênico com o MCPG, o que está de acordo com os estudos realizados por Haibara e cols. (1995)

mostrando que o AP-5, um antagonista seletivo para os receptores NMDA, microinjetado no NTS caudal não afetou o aumento da frequência respiratória promovido pela ativação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados. Além disso, existem evidências na literatura que durante situações de hipóxia o L-glutamato é liberado no NTS e que o mesmo participa da neurotransmissão da atividade respiratória, uma vez que a microinjeção prévia de MK-801 ou ácido quinurênico no NTS caudal reduziu o volume corrente sem afetar o aumento da frequência respiratória promovido pela hipóxia *in vivo* (Misusawa e cols., 1994). Nossos resultados corroboram esses achados, uma vez que não conseguimos bloquear o aumento da frequência de despolarização do nervo frênico promovido pela ativação do quimiorreflexo.

Os experimentos nos quais realizamos a microinjeção de ácido quinurênico com o MCPG em seis sítios de microinjeção no sentido rostro-caudal do NTS, a atividade basal do nervo frênico foi completamente abolida durante os 45 minutos do experimento. Além da cessação da atividade no nervo frênico na condição basal, a ativação do quimiorreflexo durante esse bloqueio não foi capaz de restabelecer o padrão de disparo desse nervo. Estudos eletrofisiológicos e imunohistoquímicos de Takakura e cols. (2006) mostraram que os neurônios do NTS envolvidos no componente respiratório do quimiorreflexo enviam projeções para o núcleo retrotrapezóide (RTN) e essa projeção é predominantemente glutamatérgica. Esses autores também demonstraram que a microinjeção de muscimol no RTN aboliu o disparo do nervo frênico, o qual não foi restabelecido pela estimulação dos corpúsculos carotídeos com NaCN. Além disso, a microinjeção de muscimol na coluna respiratória ventral também aboliu o disparo basal do nervo frênico, mas não afetou o aumento do disparo dos neurônios do RTN em resposta a hipóxia. Esses dados sugerem que a resposta respiratória da ativação dos quimiorreceptores periféricos envolve neurônios do

NTS que enviam projeções diretamente para o RTN de maneira independente dos centros geradores da atividade respiratória localizados na coluna respiratória ventral. Nesse sentido, nossos resultados sugerem que a microinjeção de ácido quinurênico com o MCPG ao longo de todo o NTS bloqueou a neurotransmissão nesses neurônios que se projetam para o RTN, abolindo tanto a atividade basal do nervo frênico quanto a resposta respiratória à ativação do quimiorreflexo.

Além do bloqueio dos receptores glutamatérgicos, realizamos o bloqueio dos receptores purinérgicos e também o bloqueio simultâneo dos receptores glutamatérgicos com o ácido quinurênico e os receptores purinérgicos com o PPADS microinjetados bilateralmente no NTS caudal. Em ambos os casos (PPADS ou PPADS com o ácido quinurênico) o aumento da frequência de despolarização do nervo frênico em resposta a ativação do quimiorreflexo não foi afetado por esses antagonistas.

O fato de não termos conseguido bloquear o aumento da frequência de despolarização do nervo frênico com as microinjeções dos antagonistas glutamatérgicos e purinérgicos no NTS caudal pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato de que a resposta respiratória à hipóxia é um dos componentes mais importantes do quimiorreflexo e que a geração e a integração da atividade respiratória no sistema nervoso central são bastante complexas e envolvem diferentes núcleos no bulbo e na ponte (Koshiya & Guyenet, 1996b; Teppema e cols., 1997; Rybak e cols., 1997). Existem evidências neuroanatômicas na literatura mostrando que apesar da maioria das aferências dos quimiorreceptores periféricos fazerem suas sinapses na porção caudal do NTS, algumas dessas fibras aferentes vão além do NTS e fazem sinapses diretamente na região do grupo respiratório ventral (Finley & Katz, 1992), sugerindo que essas projeções para a região do grupo respiratório ventral influenciariam diretamente os neurônios envolvidos na

modulação da resposta respiratória à hipóxia. A compreensão desse importante componente do quimiorreflexo requer estudos mais refinados de eletrofisiologia para identificar os núcleos, assim como os neurotransmissores envolvidos nesse processamento.

5.9. Considerações finais

O presente estudo aponta para a participação em conjunto do L-glutamato e do ATP na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal. Nossos resultados abrem novas perspectivas para o melhor entendimento dos mecanismos celulares envolvidos nessa neurotransmissão. A compreensão desses complexos mecanismos poderá contribuir para o entendimento de algumas situações fisiopatológicas que se caracterizam pelo aumento da atividade simpática como a apnéia obstrutiva do sono e a hipertensão arterial.

6. RESUMO

A ativação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados promove aumento da pressão arterial (decorrente de um aumento da atividade eferente simpática), bradicardia e taquipnéia. O objetivo do presente estudo foi avaliar principalmente a participação do L-glutamato e do ATP na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal. Para isso, utilizamos a preparação coração-tronco cerebral isolados (WHBP) de ratos, a qual nos permitiu avaliar o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo por meio do registro direto da atividade eferente simpática. A preparação WHBP também nos permitiu avaliar os componentes parassimpato-excitatório e respiratório do quimiorreflexo por meio dos registros da frequência cardíaca e do nervo frênico respectivamente. A ativação do quimiorreflexo com KCN (0,05 %/0,05 mL) promoveu aumento da atividade simpática torácica, bradicardia e aumento da atividade do nervo frênico. A microinjeção de doses crescentes de L-glutamato (5, 25, 50, 250 e 500 mM) no NTS caudal promoveu aumento da atividade simpática, bradicardia e redução da frequência de despolarização do nervo frênico de maneira dose-dependente. O mesmo padrão de respostas foi observado após a microinjeção de doses crescentes de α,β -metileno-ATP (10, 25, 50, 100 e 200 mM) no NTS caudal. A microinjeção de doses crescentes do *trans*-ACPD (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 mM), uma agonista não-seletivo dos receptores metabotrópicos do glutamato, no NTS caudal promoveu aumento da frequência de despolarização do nervo frênico e bradicardia de maneira dose-dependente, sem afetar a atividade simpática. As respostas promovidas pelo L-glutamato, ATP e *trans*-ACPD foram significativamente atenuadas pelos seus respectivos antagonistas: ácido quinurênico (250 mM), PPADS (20 mM) e MCPG (100 mM). A microinjeção de salina como controle de veículo promoveu alterações desprezíveis nos

parâmetros avaliados. O aumento da atividade simpática promovido pela ativação do quimiorreflexo não foi afetado pela microinjeção bilateral de ácido quinurênico (51 ± 2 vs $54\pm 3\%$, $n=11$), MCPG (54 ± 5 vs $48\pm 5\%$, $n=7$), ácido quinurênico + MCPG (55 ± 3 vs $57\pm 6\%$, $n=6$) ou PPADS (52 ± 4 vs $55\pm 2\%$, $n=8$) no NTS caudal. No entanto, a microinjeção bilateral de ácido quinurênico combinada com o PPADS no NTS caudal atenuou significativamente o aumento da atividade simpática promovido pela ativação do quimiorreflexo (17 ± 1 vs $52\pm 2\%$, $n=9$). Nossos resultados mostram que o L-glutamato e o ATP participam da neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal e que o aumento da atividade simpática em resposta ao quimiorreflexo é atenuado apenas se ambos os receptores glutamatérgicos e purinérgicos forem bloqueados. A compreensão dos mecanismos celulares por meio dos quais esses dois neurotransmissores atuam no NTS caudal poderá contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na geração e na modulação da atividade eferente simpática no sistema nervoso central, especialmente em situações de hipóxia e hipertensão arterial.

7. SUMMARY

Chemoreflex activation in awake rats produces increase in arterial pressure (due to an increase in the sympathetic activity), bradycardia and tachypnea. The aim of the present study was to evaluate the role of L–glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympatho–excitatory component of the chemoreflex at the caudal NTS. For this purpose, we used the working heart–brainstem preparation (WHBP) of rats, which allowed us to evaluate the sympatho–excitatory component of the chemoreflex performing direct sympathetic nerve recordings. The WHBP also allowed us to evaluate the parasympathetic and respiratory components of the chemoreflex performing heart rate and phrenic nerve activity recordings respectively. Chemoreflex activation with KCN (0.05 %/0.05 mL) produced an increase in the thoracic sympathetic nerve activity, bradycardia and increase in the frequency of the phrenic nerve activity (PNA). The microinjection of increasing doses of L–glutamate (5, 25, 50, 100 and 500 mM) into the caudal NTS produced increase in the tSNA, bradycardia and decrease in the frequency of the PNA in a dose dependent manner. The same pattern of responses was observed when increasing doses of α,β –methylene–ATP (10, 25, 50, 100 and 200 mM) were microinjected into the caudal NTS. Increasing doses of *trans*–ACPD (0.5, 1, 2.5, 5 and 10 mM), a non selective metabotropic glutamate receptor agonist, microinjected into the caudal NTS produced an increase in the PNA, bradycardia in a dose dependent manner without affecting the tSNA. The responses produced by L–glutamate, ATP and *trans*–ACPD were significantly attenuated by their respective antagonists: Kynurenic acid (250 mM), PPADS (20 mM) and MCPG (100 mM). The microinjection of saline, as a vehicle control, produced negligible changes in the parameters evaluated. The increase in the tSNA in response to chemoreflex activation was not affected by the bilateral

microinjection of kynurenic acid (51 ± 2 vs $54\pm 3\%$, $n=11$), MCPG (54 ± 5 vs $48\pm 5\%$, $n=7$), kynurenic acid + MCPG (55 ± 3 vs $57\pm 6\%$, $n=6$) or PPADS (52 ± 4 vs $55\pm 2\%$, $n=8$) into the caudal NTS. However, the bilateral microinjection of kynurenic acid combined with PPADS into the caudal NTS significantly attenuated the increase in the tSNA in response to chemoreflex activation (17 ± 1 vs $52\pm 2\%$, $n=9$). Our results show that L-glutamate and ATP are involved in the neurotransmission of the sympatho-excitatory component of the chemoreflex into the caudal NTS and that the increase in the tSNA in response to chemoreflex activation is only attenuated if both glutamatergic and purinergic receptors are blocked. The comprehension of the cellular mechanism in which these two neurotransmitters act into the NTS might contribute to the better understanding of the mechanism underlying the generation and modulation of the efferent sympathetic nerve activity in the central nervous system, specially under critical conditions such as hypoxia and hypertension.

8. REFERÊNCIAS

Accorsi–Mendonca D, Leao RM, Aguiar JF, Varanda WA & Machado BH. Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of solitary tract (NTS) of rat brainstem slices. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, (in press), 2006.

Almado CEL & Machado BH. Respiratory and autonomic responses to microinjection of NMDA and AMPA into the commissural subnucleus of the NTS of awake rats. *Brain Res.*, v. 1063, n.1, p.59–68, 2005.

Antunes VR, Bonagamba LGH & Machado BH. NMDA receptor antagonism blocks the cardiovascular responses to microinjection of trans-ACPD into the NTS of awake rats. *Exp. Physiol.*, v.89, n.3, p.279–86, 2004.

Antunes VR, Bonagamba LGH & Machado BH. Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. *Brain Res.*, v. 1032, n1–2, p.85–93, 2005a.

Antunes VR, Braga VA & Machado BH. Autonomic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate or caudal nucleus tractus solitarius in the working heart–brainstem preparation of the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, v.32 p.467–472, 2005b.

Barraco RA, O'Leary DS, Ergene E, Scislo TJ. Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns. *J Auton Nerv Syst.*, v.59, n.3, p.113–24, 1996.

Bernthal T. Chemoreflex control of vascular reactions through the carotid body. *Am. J. Physiol.*, v.121, n.1, p.1–19, 1938.

Biscoe TJ, Sampson SR & Purves MJ. Stimulus response curves of single carotid body chemoreceptor afferent fiber. *Nature*, v.215, p.654–655, 1967.

Biscoe TJ, Bradley GW & Purves MJ. The relation between carotid body chemoreceptor activity and carotid sinus pressure in the cat. *J. Physiol.*, v.203, p.40, 1969.

Biscoe TJ & Dundren MR. Monitoring pO₂ by the carotid chemoreceptor. *News in Physiol. Sci.*, v.5, p.229–233, 1990.

Bonham AC & McCrimmon DR. Neurons in a discrete region of the nucleus tractus solitarius are required for the Breuer–Hering reflex in rat. *J. Physiol.*, v.427 p.261–80, 1990.

Bonham AC, Coles SK & McCrimmon DR. Pulmonary stretch receptor afferents activate excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarii in rats. *J. Physiol.*, v.464, p.725–45, 1993.

Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.*, v. 24, n.3 p.509–581, 1972.

Chamberlin NL & Saper CB. Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. *J Neurosci.*, v.14, n.11, p.6500–6510, 1994.

Chamberlin NL & Saper CB. A brainstem network mediating apneic reflexes in the rat. *J Neurosci.*, v.18, n.15, p.6048–6056, 1998.

Chen BC, Lee CM & Lin WW. Inhibition of ecto-ATPase by PPADS, suramin and reactive blue 2 in endothelial cell, C6 glioma cells and RW 264.7 macrophages. *Br. J. Pharmacol.*, v.119, p.1628–1634, 1996.

Chitravanshki VC, Kachroo A & Sapru HN. A midline area in the nucleus commissuralis of NTS mediates the phrenic nerve responses to carotid chemoreceptor stimulation. *Brain Res.*, v.662, p.127–132, 1994.

Chitravanshki VC & Sapru HN. Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. *Am. J. Physiol.*, v.268, p.851–858, 1995.

Ciriello J, Hochstenbach SL & Roder S. Central projections of baroreceptor afferent fiber in the rat. Nucleus of the Solitary Tract. Edited by Robin A. Barraco, CRC Press, London, p.35–50, 1994.

Colombari E, Bonagamba LGH & Machado BH. Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. *Am J Physiol.*, v.266, n.3, p.730–738, 1994.

Colombari E, Menani JV & Talman WT. Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into medial NTS of awake rats, *Am. J. Physiol. Reg. Integ. Comp. Physiol.*, v. 270, n.39, p.R1220–R1225, 1996.

de Paula PM & Machado BH. Antagonism of adenosine A₁ receptors in the NTS does not affect the chemoreflex in awake rats. *Am J Physiol.*, v.281, n.6, p.R2072–2078, 2001.

de Paula PM, Antunes VR, Bonagamba LGH & Machado BH. 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.R1164–71, 2004.

Dick TE, Hsieh YH, Morrison S, Coles SK & Prabhakar N. Entrainment pattern between sympathetic and phrenic nerve activities in the Sprague–Dawley rat: Hypoxia evoked sympathetic activity during expiration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, v.286, n.6, p.R1121–R1128, 2004.

Ergene E, Dunbar JC, O'Leary DS & Barraco RA. Activation of P₂-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius mediate depressor responses. *Neurosci Lett.*, v.174, n.2, p.188–192, 1994.

Finley JC, Katz DM. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.*, v. 572, n.1–2, p.108–116, 1992.

Franchini KG & Krieger EM. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptors stimulation by intravenous KCN. *J. Auton. Nerv. Syst.*, v.42, p.63–70, 1993.

González C, López-López RJ, Obeso A, Pérez-García MT & Roecher A. Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in carotid body. *Respiration Physiol.*, v.102, p.137–147, 1995.

Gordon FJ & Talman WT. Role of excitatory amino acids and their receptors in bulbospinal control of cardiovascular function. *In: Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation*, Edited by Kunos, G. & Ciriello, J., Birkhauser, Boston, pp. 209–225, 1992.

Gourine AV, Llaudet E, Dale N & Spyer KM. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature*. v.436, n.7047, p.108–11, 2005.

Gourine AV. On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. *J Physiol*. v.568, n.3, p.715–24, 2005.

Gu JG, MacDermott AB. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature*. v.389, n.6652, p.749–53, 1997.

Guyenet PG. Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. *Respir Physiol.*, v.121, n.2–3, p.147–162, 2000.

Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci.*, v.7, n.5, p.335–346, 2006.

Haibara AS, Colombari E, Chianca-Jr DA, Bonagamba LGH & Machado BH. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am. J. Physiol.*, v.269, p.H1421–H1427, 1995.

Haibara AS, Bonagamba LGH & Machado BH. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. *Am. J. Physiol.*, v.276, p.R69–R80, 1999.

Haibara AS, Tamashiro E, Oliván MV, Bonagamba LG & Machado BH. Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Auton Neurosci.*, v.101, n.1–2, p.60–67, 2002.

Housley GD & Sinclair JD. Localization by kainic acid lesion of neurones transmitting the carotid chemoreceptor stimulus for respiration in rat. *J. Physiol.*, v.406, p.99–114, 1988.

Jin YH, Bailey TW, Li BY, Schild JH & Andresen MC. Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius. *J Neurosci.*, v.24, n.20, p.4709–4717, 2004.

Kalia M & Sullivan JM. Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *J Comp Neurol.*, v.211, n.3, p.248–265, 1982.

Kato F & Shigetomi E. Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J. Physiol.*, v.530, n.3, p.1311–1328, 2001.

Kitchen AM, O'Leary DS & Scislo TJ. Sympathetic and parasympathetic component of bradycardia triggered by stimulation of NTS P2X receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v.290, n.2, p.H807–812, 2006.

Koshiya N & Guyenet P. Role of the pons in the carotid sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol.*, v.267, n.2, p.R508–R518, 1994.

Koshiya N & Guyenet P. NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.*, v.270, p.R1273–R1278, 1996a.

Koshiya N & Guyenet P. Tonic sympathetic chemoreflex after blockade of respiratory rhythmogenesis in the rat. *J. Physiol.*, v.491, n.3, p.859–869, 1996b.

Leone C & Gordon FJ. Is L–glutamate a neurotransmitter of baroreceptor information in the nucleus of the tractus solitarius? *J Pharmacol Exp Ther.*, v.250, n.3, p.953–962, 1989.

Lipiski J, Macallen RM & Spyer KM. The carotid chemoreceptor input to the respiratory neurones of the nucleus of tractus solitarius. *J. Physiol.*, v.267, p.797, 1977.

Llewellyn–Smith IJ & Burnstock G. Ultrastructural localization of P2X3 receptors in rat sensory neurons. *Neuroreport.* v.9, n.11, p.2545–2550, 1998.

Loewy AD. Central autonomic pathways. *Central Regulation of Autonomic Functions.* New York, Oxford University Press, pp 88–103, 1990.

Machado BH & Bonagamba LGH. Microinjection of L–glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res.*, v.576, p.131–138, 1992.

Machado BH & Bonagamba LGH. Antagonism of glutamate receptors in the intermediate and caudal NTS of awake rats produced no changes in the hypertensive response to chemoreflex activation. *Auton Neurosc.*, v.117, p.25–32, 2005.

Mifflin SW. Arterial chemoreceptors input to nucleus tractus solitarius. *Am. J. Physiol.*, v.263, p.R368–R375, 1992.

Mtui EP, Anwar M, Gomez R, Reis DJ & Ruggiero DA. Projections from the nucleus tractus solitarii to the spinal cord. *J Comp Neurol.*, v.337, n.2, p.231–252, 1993.

Mizusawa A, Ogawa H, Kikuchi Y, Hida W, Kurosawa O, Okabe S, Takishima T & Shirato K. In vivo release of glutamate in nucleus tractus solitarii of the rat during hypoxia. *J. Physiol.*, v.478, p.55–65, 1994.

Nakatsuka T & Gu JG. ATP P2X receptor-mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J Neurosci.*, v.21, n.17, p.6522–6531, 2001.

Paton, J.F. A working heart–brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods*, v.65, n.1, p.63–68, 1996.

Paton JF, de Paula PM, Spyer KM, Machado BH & Boscan P. Sensory afferent selective role of P₂ receptors in the nucleus tractus solitarii for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. *J Physiol.*, v.543, p.995–1005, 2002.

Phillis JW, Scislo TJ & O’Leary DS. Purines and the nucleus tractus solitarius: effects on cardiovascular and respiratory function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v.24, p.738–742, 1997.

Potts JT, Spyer KM & Paton JF. Somatosympathetic reflex in a working heart–brainstem preparation of the rat. *Brain Res Bull.*, v.53, n.1, p.59–67, 2000.

Prabhakar NR. O₂ sensing at the mammalian carotid body: why multiple O₂ sensors and multiple transmitters? *Exp Physiol.*, v.91, n.1, p.17–23, 2006.

Reddy MK, Patel KP & Schultz HD. Differential role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in modulating the sympathoexcitatory component of peripheral and central chemoreflexes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, v.289, n.3, p.R789–797, 2005.

Ruggiero DA, Pickel VM, Milner TA, Anwar M, Otake K, Mtui EP & Park DH. Viscerosensory processing in nucleus tractus solitarii. Structural and neurochemical substrate. In Barraco IRA (ed.): *Nucleus of the Solitary Tract*, p.1–34, 1994.

Rybak IA, Paton JF & Schwaber JS. Modeling neural mechanisms for genesis of respiratory rhythm and pattern. III. Comparison of model performances during afferent nerve stimulation. *J Neurophysiol.*, v.77, n.4, p.2027–2039, 1997.

Sapru HN. Carotid chemoreflex. Neural pathways and transmitters. *Adv Exp Med Biol* v.410, p.357–364, 1996.

Sato MA, Schoorlemmer GHM, Menani JV, Lopes OU & Colombari E. Recovery of high blood pressure after chronic lesions of the commissural NTS in SHR. *Hypertension*, v.42, p.713–718, 2003.

Scislo TJ, Augustyniak RA, Barraco RA, Woodbury DJ & O’Leary DS. Activation of P_{2X}-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius elicits differential inhibition of lumbar and renal sympathetic nerve activity. *J. Auton. Nerv. System*, v.62, p.103–110, 1997.

Scislo TJ, Ergene E & O’Leary DS. Impaired arterial baroreflex regulation of heart rate after blockade of P₂-purinoceptors in nucleus tractus solitarius. *Brain Res. Bull.*, v.47, n.1, p.67–67, 1998a.

Scislo TJ & O’Leary DS. Differential control of renal vs adrenal sympathetic nerve activity by NTS and A_{2A} and P_{2X} purinoceptors. *Am J Physiol.*, v.275, p.H2130–2139, 1998b.

Scislo TJ & O'Leary DS. Differential role of ionotropic glutamatergic mechanism in responses to NTS P_{2X} and A_{2A} receptor stimulation. *Am J Physiol.*, v.278, p.H2057–2068, 2000.

Scislo TJ, Kitchen AM, Augustyniak RA, & O'Leary DS. Differential patterns of sympathetic responses to selective stimulation of nucleus tractus solitarius purinergic receptor subtypes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v.28, p.120–124, 2001.

Scislo TJ & O'Leary DS. Mechanisms mediating regional sympathoactivatory responses to stimulation of NTS A(1) adenosine receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v.283, n.4, p.H1588–H1599, 2002.

Shigetomi E & Kato F. Action potential-independent release of glutamate by Ca²⁺ entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci.*, v.24, n.12, p.3125–35, 2004.

Spyer, K.M. The central nervous organization of reflex circulatory control. In: *Central Regulation of Autonomic Functions*, edited by Arthur D. Loewy and K.M. Spyer, New York Oxford, 1990.

Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL & Guyenet PG. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol.*, v.572, n.2, p.503–523, 2006.

Talman WT, Perrone MH & Reis DJ. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. *Science*, v.209, n.4458, p.813–815, 1980.

Talman WT. Kynurenic acid microinjected into the nucleus tractus solitarius of rat blocks the arterial baroreflex but not responses to glutamate. *Neurosci Lett.*, v.102, n.2–3, p.247–252, 1989.

Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A & Olivier C. Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol.*, v.388, n.2, p.169–190, 1997.

Vardhan A, Kachroo A, & Sapru HN. Excitatory amino acid receptor in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. *Am. J. Physiol.*, v.264, p.R41–R50, 1993.

Yao ST, Barden JA, & Lawrence AJ. On the immunohistochemical distribution of ionotropic P2X receptors in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Neuroscience*, v.108, n.4, p.673–685, 2001.

Yao ST & Lawrence AJ. Purinergic modulation of cardiovascular function in the rat locus coeruleus. *Br J Pharmacol.*, v.145, n.3, p.342–52, 2005.

Zhang W & Mifflin SW. Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptor reflexes in rats. *Am J Physiol.*, v.265, p.H770–H773, 1993.

9. APÊNDICE

Tabela 1 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt) promovidas pela ativação dos quimiorreceptores com KCN (0,05%) na preparação WHBP em relação ao basal (antes do KCN).

Preparação WHBP N°	Atividade do nervo simpático (ANSt)	
	(%) basal	(%) após KCN
1	100	124,9
2	100	148,5
3	100	177,3
4	100	148,1
5	100	144,3
6	100	139,6
7	100	126,7
Média±epm	100±0	144±6

Tabela 2 – Alterações percentuais na atividade do nervo frênico (ANF) promovidas pela ativação dos quimiorreceptores com KCN (0,05%) na preparação WHBP em relação ao basal (antes do KCN).

Preparação WHBP N°	Atividade do nervo frênico (ANF)	
	(%) basal	(%) após KCN
1	100	258,68
2	100	260,13
3	100	147,41
4	100	251,79
5	100	146,33
6	100	145,34
7	100	220,37
8	100	207,41
Média±epm	100±0	205±18

Tabela 3 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela ativação dos quimiorreceptores com KCN (0,05 %) na preparação WHBP.

Preparação WHBP N°	Frequência cardíaca (bpm)	
	basal	Δ FC após KCN
1	461	-380
2	444	-378
3	425	-324
4	436	-362
5	331	-265
6	306	-215
7	246	-180
8	366	-252
Média\pmepm	377\pm27	-295\pm27

Tabela 4 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Hz) promovidas pela microinjeção de doses crescentes de L-glutamato (1, 5, 25, 100, 500 mM) no NTS caudal na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

Preparação WHBP (n°)	Salina	L-glu 5 mM	L-glu 25 mM	L-glu 50 mM	L-glu 250 mM	L-glu 500 mM
1	0,40	0,20	0,20	0,10	0,00	0,00
2	0,40	0,50	0,20	0,20	0,00	0,00
3	0,30	0,30	0,30	0,10	0,10	0,00
4	0,30	0,30	0,20	0,00	0,10	0,00
5	0,40	0,20	0,20	0,00	0,00	0,00
6	0,30	0,30	0,10	0,00	0,00	0,00
7	0,30	0,30	0,20	0,10	0,10	0,00
8	0,40	0,20	0,20	0,10	0,00	0,00
9	0,30	0,30	0,20	0,10	0,00	0,00
Média\pmepm	0,34\pm0,02	0,24\pm0,03	0,20\pm0,02	0,08\pm0,02	0,03\pm0,02	0,00\pm0,00

Tabela 5 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela microinjeção de doses crescentes de L–glutamato (5, 25, 50, 250, 500 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

Preparação WHBP (n°)	Salina	L–glu 5 mM	L–glu 25 mM	L–glu 50 mM	L–glu 250 mM	L–glu 500 mM
1	-3	17	-28	-57	-107	-103
2	5	-14	-20	-70	-96	-115
3	-2	-7	-24	-65	-92	-122
4	-9	-11	-39	-67	-99	-104
5	1	-13	-28	-56	-109	-128
6	-4	-7	-27	-58	-100	-113
7	-7	-20	-29	-78	-115	-110
8	2	-14	-29	-64	-108	-121
9	-6	-14	-33	-65	102	-112
Média\pmepm	-2\pm2	-9\pm3	-28\pm2	-64\pm4	-103\pm4	-114\pm4

Tabela 6 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, Δ %) promovidas pela microinjeção de doses crescentes de L–glutamato (5, 25, 50, 250, 500 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

Preparação WHBP (n°)	Salina	L–glu 5 mM	L–glu 25 mM	L–glu 50 mM	L–glu 250 mM	L–glu 500 mM
1	1	1	7	21	22	33
2	2	-1	7	12	9	12
3	2	-2	4	6	14	18
4	0	2	2	4	16	37
5	0	2	4	10	5	13
6	1	1	9	12	17	21
7	0	-2	3	7	25	21
8	1	0	2	9	11	23
9	2	2	7	13	10	19
Média\pmepm	1\pm1	0\pm1	5\pm1	10\pm2	14\pm2	22\pm4

Tabela 7 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Hz) promovidas pela microinjeção de L–glutamato (50 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

WHBP	Microinjeção de L–glutamato (50 mM)				
	Controle	2 min após KYN	10 min após KYN	30 min após KYN	45 min após KYN
1	0,10	0,60	0,70	0,20	0,10
2	0,20	0,60	0,60	0,20	0,10
3	0,10	0,50	0,70	0,20	0,00
4	0,00	0,60	0,60	0,10	0,00
5	0,00	0,50	0,70	0,20	0,00
6	0,00	0,50	0,60	0,10	0,10
Média±epm	0,07±0,03	0,55±0,02*	0,65±0,02*	0,17±0,02*	0,05±0,02

*diferente em relação à resposta controle à microinjeção controle de L–glutamato ($p \leq 0,05$).

Tabela 8 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela microinjeção de L–glutamato (50 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Δ FC promovidas pela microinjeção de L–glutamato (50 mM)				
	Controle	2 min após KYN	10 min após KYN	30 min após KYN	45 min após KYN
1	-91	-7	-12	-107	-30
2	-51	-30	-56	-94	-124
3	-70	0	-25	-23	-74
4	-32	-9	-9	-112	-139
5	-91	-13	-13	-96	-129
6	-144	-79	-31	-96	-161
7	-100	-23	-36	-	-
Média±epm	-83±11	-23±8*	-26±5*	-75±11	-103±19

*diferente em relação à resposta controle à microinjeção controle de L–glutamato ($p \leq 0,05$).

Tabela 9 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, $\Delta\%$) promovidas pela microinjeção de L–glutamato (50 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Microinjeção de L–glutamato (50 mM)				
	Controle	2 min após KYN	10 min após KYN	30 min após KYN	45 min após KYN
1	7	2	2	5	5
2	9	0	0	5	10
3	7	1	0	4	8
4	6	1	-2	3	9
5	6	2	1	3	7
6	8	-1	-1	4	8
Média\pmepm	7\pm1	1\pm1*	0\pm1*	4\pm1	8\pm2

*diferente em relação à resposta controle à microinjeção controle de L–glutamato ($p \leq 0,05$).

Tabela 10 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Hz) promovidas pela microinjeção de doses crescentes de *trans*–ACPD (0,5, 1, 2,5, 5, 10 mM) no NTS na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

Preparação WHBP (n°)	Salina	<i>trans</i> –ACPD 0,5 mM	<i>trans</i> –ACPD 1 mM	<i>trans</i> –ACPD 2,5 mM	<i>trans</i> –ACPD 5 mM	<i>trans</i> –ACPD 10 mM
1	0,40	0,40	0,40	0,50	0,60	0,60
2	0,30	0,40	0,70	0,70	0,80	0,80
3	0,40	0,50	0,50	0,60	0,60	0,70
4	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,70
5	0,40	0,40	0,60	0,60	0,70	0,80
6	0,40	0,50	0,50	0,60	0,70	0,80
7	0,40	0,50	0,50	0,60	0,60	0,80
Média\pmepm	0,37\pm0,02	0,44\pm0,02	0,53\pm0,04	0,60\pm0,02	0,67\pm0,03	0,74\pm0,03

Tabela 11 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela microinjeção de doses crescentes de *trans*-ACPD (0,5, 1, 2,5, 5, 10 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

Preparação WHBP (n°)	Salina	<i>trans</i>-ACPD 0,5 mM	<i>trans</i>-ACPD 1 mM	<i>trans</i>-ACPD 2,5 mM	<i>trans</i>-ACPD 5 mM	<i>trans</i>-ACPD 10 mM
1	-1	0	-24	-39	-95	-84
2	-7	-7	-34	-50	-89	-135
3	-4	-6	-28	-38	-40	-105
4	-5	-3	-31	-56	-45	-92
5	-9	-4	-49	-68	-34	-94
6	3	-7	-48	-25	-51	-102
7	-1	-4	-31	-53	-88	-105
Média\pmepm	-3\pm2	-4\pm2	-35\pm4	-46\pm4	-63\pm10	-102\pm9

Tabela 12 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, Δ %) promovidas pela microinjeção de doses crescentes de *trans*-ACPD (0,5, 1, 2,5, 5, 10 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

Preparação WHBP (n°)	Salina	<i>trans</i>-ACPD 0,5 mM	<i>trans</i>-ACPD 0,5 mM	<i>trans</i>-ACPD 0,5 mM	<i>trans</i>-ACPD 0,5 mM	<i>trans</i>-ACPD 0,5 mM
1	-1	1	1	-2	2	3
2	-4	-1	2	-1	1	-1
3	1	1	1	-2	1	-4
4	2	1	0	0	1	0
5	-1	2	0	-1	-1	-1
6	-4	-2	1	1	1	4
7	-2	-1	1	-4	1	-7
Média\pmepm	-1\pm2	0\pm1	1\pm1	-1\pm1	1\pm1	-1\pm1

Tabela 13 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Hz) promovidas pela microinjeção de *trans*-ACPD (2,5 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de MCPG (100 mM) no NTS caudal na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

WHBP	Microinjeção de <i>trans</i> -ACPD (2,5 mM)				
	Controle	2 min após MCPG	10 min após MCPG	30 min após MCPG	45 min após MCPG
1	0,60	0,30	0,30	0,60	0,60
2	0,70	0,40	0,30	0,50	0,70
3	0,70	0,40	0,30	0,60	0,70
4	0,70	0,40	0,40	0,50	0,60
5	0,70	0,30	0,40	0,50	0,70
Média±epm	0,68±0,02	0,36±0,02*	0,34±0,02*	0,54±0,02	0,66±0,02

*diferente em relação à resposta controle à microinjeção controle de *trans*-ACPD ($p \leq 0,05$).

Tabela 14 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela microinjeção de *trans*-ACPD (2,5 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de MCPG (100 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Microinjeção de <i>trans</i> -ACPD (2,5 mM)				
	Controle	2 min após MCPG	10 min após MCPG	30 min após MCPG	45 min após MCPG
1	-57	-8	0	-14	-68
2	-50	-2	-11	-14	-51
3	-55	-8	-5	-26	-49
4	-64	-7	-5	-45	-50
5	-48	-11	-5	-28	-34
Média±epm	-55±3	-7±1*	-5±2*	-25±6*	-51±5

*diferente em relação à resposta controle à microinjeção controle de *trans*-ACPD ($p \leq 0,05$).

Tabela 15 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Hz) promovidas pela microinjeção de L–glutamato (50 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) e MCPG (100 mM) no NTS caudal na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

WHBP	Microinjeção de L–glutamato (50 mM)				
	Controle	2 min após KYN+MCPG	10 min após KYN+MCPG	30 min após KYN+MCPG	45 min após KYN+MCPG
1	0,10	0,50	0,30	0,20	0,10
2	0,20	0,70	0,60	0,20	0,20
3	0,10	0,50	0,70	0,30	0,10
4	0,00	0,70	0,60	0,20	0,00
5	0,00	0,50	0,40	0,20	0,00
6	0,00	0,60	0,40	0,10	0,10
Média±epm	0,07±0,03	0,58±0,04*	0,50±0,06*	0,20±0,03	0,08±0,03

*diferente em relação à resposta controle à microinjeção controle de L–glutamato ($p \leq 0,05$).

Tabela 16 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela microinjeção de L–glutamato (50 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) e MCPG (100 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Δ FC promovidas pela microinjeção de L–glutamato (50 mM)				
	Controle	2 min após KYN+MCPG	10 min após KYN+MCPG	30 min após KYN+MCPG	45 min após KYN+MCPG
1	-95	-29	-12	-71	-87
2	-57	-4	-24	-21	-47
3	-51	-10	-25	-61	-87
4	-88	-36	-10	-62	-127
5	-90	-11	-24	-68	-98
6	-73	-26	-16	-63	-82
Média±epm	-76±8	-19±5*	-18±3*	-58±8	-88±11

*diferente em relação à resposta controle à microinjeção controle de L–glutamato ($p \leq 0,05$).

Tabela 17 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Δ Hz) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

WHBP	Injeção de KCN (0,05 %)				
	Controle	2 min após KYN	10 min após KYN	30 min após KYN	45 min após KYN
1	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
2	0,30	0,50	0,30	0,20	0,20
3	0,30	0,30	0,30	0,30	0,20
4	0,20	0,10	0,20	0,30	0,20
5	0,30	0,20	0,20	0,30	0,20
6	0,30	0,40	0,30	0,20	0,20
7	0,20	0,30	0,20	0,10	0,20
8	0,30	0,30	0,20	0,30	0,20
9	0,40	0,50	0,30	0,30	0,30
10	0,30	0,20	0,30	0,30	0,40
Média\pmepm	0,28\pm0,02	0,30\pm0,04	0,24\pm0,02	0,25\pm0,02	0,23\pm0,02

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

Tabela 18 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Δ FC promovidas pela injeção de KCN (0,05%)				
	Controle	2 min após KYN	10 min após KYN	30 min após KYN	45 min após KYN
1	-271	-34	-22	-95	-226
2	-179	-65	-35	-138	-122
3	-257	-47	-62	-145	-248
4	-189	-87	-62	-144	-273
5	-168	-70	-70	-119	-217
6	-352	-58	-119	-195	-238
7	-197	-65	-124	-123	-319
8	-154	-60	-32	-34	-166
9	-289	-49	-89	-198	-189
10	-250	-20	-32	-57	-98
11	-156	-49	-28	-77	-158
12	-198	-26	-37	-69	-155
13	-193	-20	-57	-89	-181
Média\pmepm	-219\pm17	-50\pm6*	-65\pm9*	-114\pm15	-204\pm17

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05% ($p \leq 0,05$).

Tabela 19 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, $\Delta\%$) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Injeção de KCN (0,05%)				
	Controle	2 min após KYN	10 min após KYN	30 min após KYN	45 min após KYN
1	48	45	53	57	49
2	43	48	60	51	53
3	48	51	47	42	52
4	61	49	48	44	48
5	68	65	68	67	62
6	50	50	44	45	51
7	43	42	45	46	49
8	63	59	52	62	56
9	65	49	43	45	49
Média\pmepm	54\pm3	51\pm2	51\pm3	51\pm3	52\pm1

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05% ($p \leq 0,05$).

Tabela 20 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Δ Hz) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de MCPG (100 mM) no NTS caudal na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

WHBP	Injeção de KCN (0,05%)				
	Controle	2 min após MCPG	10 min após MCPG	30 min após MCPG	45 min após MCPG
1	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
2	0,20	0,30	0,10	0,10	0,30
3	0,30	0,40	0,30	0,20	0,20
4	0,20	0,10	0,40	0,40	0,30
5	0,30	0,20	0,40	0,30	0,30
6	0,20	0,20	0,10	0,20	0,20
7	0,30	0,30	0,20	0,20	0,20
Média\pmepm	0,27\pm0,03	0,27\pm0,04	0,27\pm0,05	0,26\pm0,04	0,27\pm0,03

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

Tabela 21 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de MCPG (100 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	ΔFC promovidas pela injeção de KCN (0,05%)				
	Controle	2 min após MCPG	10 min após MCPG	30 min após MCPG	45 min após MCPG
1	-150	-150	-160	-212	-240
2	-80	-50	-90	-80	-80
3	-157	-186	-56	-240	-164
4	-177	-158	-157	-175	-172
5	-157	-153	-164	-185	-193
6	-257	-268	-236	-253	-252
7	-280	-242	-260	-230	-223
Média\pmepm	-206\pm26	-201\pm17	-175\pm27	-217\pm22	-210\pm22

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

Tabela 22 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, Δ %) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de MCPG (100 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Injeção de KCN (0,05%)				
	Controle	2 min após MCPG	10 min após MCPG	30 min após MCPG	45 min após MCPG
1	61	78	51	56	47
2	49	60	60	48	51
3	65	63	55	60	55
4	27	46	52	45	28
5	51	52	44	48	71
6	44	48	46	56	64
7	40	33	83	52	77
Média\pmepm	48\pm5	54\pm5	56\pm5	52\pm2	56\pm6

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

Tabela 23 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Δ Hz) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) e MCPG (100 mM) no NTS caudal na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

WHBP	Injeção de KCN (0,05%)				
	Controle	2 min após KYN+MCPG	10 min após KYN+MCPG	30 min após KYN+MCPG	45 min após KYN+MCPG
1	0,30	0,20	0,20	0,30	0,30
2	0,40	0,30	0,20	0,30	0,40
3	0,20	0,20	0,30	0,20	0,30
4	0,30	0,20	0,20	0,10	0,20
5	0,30	0,10	0,20	0,10	0,20
Média\pmepm	0,30\pm0,03	0,20\pm0,03	0,22\pm0,02	0,18\pm0,04	0,28\pm0,04

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

Tabela 24 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) e MCPG (100 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Δ FC promovidas pela injeção de KCN (0,05%)				
	Controle	2 min após KYN+MCPG	10 min após KYN+MCPG	30 min após KYN+MCPG	45 min após KYN+MCPG
1	-163	-2	0	-57	-162
2	-156	-1	-2	-69	-190
3	-233	0	-5	-240	-233
4	-210	-3	0	-86	-213
5	-200	-5	-12	-88	-167
Média\pmepm	-192\pm15	-2\pm1*	-4\pm2*	-108\pm33	-193\pm14

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

Tabela 25 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, $\Delta\%$) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) e MCPG (100 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Injeção de KCN (0,05 %)				
	Controle	2 min após KYN+MCPG	10 min após KYN+MCPG	30 min após KYN+MCPG	45 min após KYN+MCPG
1	73	60	58	39	51
2	68	59	56	55	47
3	42	47	34	51	39
4	56	59	54	56	50
5	47	51	54	35	60
Média\pmepm	57\pm6	55\pm3	51\pm4	47\pm4	49\pm3

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

Tabela 26 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) e MCPG (100 mM) em seis sítios ao longo do NTS na preparação WHBP.

WHBP	Δ FC promovidas pela injeção de KCN (0,05 %)				
	Controle	2 min após KYN+MCPG	10 min após KYN+MCPG	30 min após KYN+MCPG	45 min após KYN+MCPG
1	-272	-28	-23	-147	-164
2	-277	-37	-14	-34	-100
3	-277	-14	-76	-232	-309
4	-193	-3	-37	-51	-170
5	-181	-34	-48	-97	-202
6	-193	-25	-24	-154	-250
7	-284	-11	-31	-170	-179
Média\pmepm	-240\pm18	-26\pm4*	-36\pm8*	-126\pm26*	-182\pm29

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

Tabela 27 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, $\Delta\%$) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) e MCPG (100 mM) em seis sítios ao longo do NTS na preparação WHBP.

WHBP	Injeção de KCN (0,05 %)				
	Controle	2 min após KYN+MCPG	10 min após KYN+MCPG	30 min após KYN+MCPG	45 min após KYN+MCPG
1	48	49	43	51	46
2	51	42	52	60	52
3	41	42	56	63	53
4	50	47	49	50	58
5	45	43	53	45	42
6	51	43	42	41	41
7	57	51	53	59	61
Média\pmepm	49\pm2	45\pm1	50\pm2	53\pm3	50\pm3

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

Tabela 28 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Hz) promovidas pela microinjeção de doses crescentes de α,β -metileno-ATP (10, 25, 50, 100, 200 mM) no NTS caudal na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

Preparação WHBP (n°)	Salina	α,β -metileno-ATP 10 mM	α,β -metileno-ATP 25 mM	α,β -metileno-ATP 50 mM	α,β -metileno-ATP 100 mM	α,β -metileno-ATP 200 mM
1	0,40	0,50	0,60	0,30	0,00	0,00
2	0,30	0,30	0,00	0,10	0,10	0,10
3	0,30	0,30	0,20	0,00	0,00	0,00
4	0,40	0,50	0,70	0,30	0,20	0,00
5	0,30	0,30	0,20	0,50	0,00	0,00
6	0,30	0,30	0,20	0,00	–	–
7	–	–	0,30	0,00	–	–
8	–	–	0,20	0,00	–	–
9	–	–	0,40	0,10	–	–
10	–	–	0,30	0,00	–	–
Média\pmepm	0,33\pm0,02	0,37\pm0,04	0,31\pm0,07	0,12\pm0,05	0,06\pm0,04	0,02\pm0,02

Tabela 29 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela microinjeção de doses crescentes de α,β -metileno-ATP (10, 25, 50, 100, 200 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

Preparação WHBP (n°)	Salina	α,β -metileno-ATP 10 mM	α,β -metileno-ATP 25 mM	α,β -metileno-ATP 50 mM	α,β -metileno-ATP 100 mM	α,β -metileno-ATP 200 mM
1	0	-1	-26	-62	-89	-78
2	-	-13	-2	-70	-63	-49
3	-1	1	-105	-18	-31	-39
4	1	-1	-22	-136	-51	-91
5	3	-1	-2	-17	-51	-51
6	-2	-6	-2	-13	-	-
7	-2	-8	-3	-119	-	-
8	3	-	8	0	-	-
9	-	-	-12	19	-	-
10	-	-	-23	-10	-	-
11	-	-	-7	-76	-	-
12	-	-	-	-59	-	-
Média\pmepm	1\pm1	-4\pm2	-18\pm9	-47\pm14	-57\pm9	-62\pm10

Tabela 30 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, $\Delta\%$) promovidas pela microinjeção de doses crescentes de α,β -metileno-ATP (10, 25, 50, 100, 200 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

Preparação WHBP (n°)	Salina	α,β -metileno-ATP 10 mM	α,β -metileno-ATP 25 mM	α,β -metileno-ATP 50 mM	α,β -metileno-ATP 100 mM	α,β -metileno-ATP 200 mM
1	4	3	10	14	55	51
2	7	-3	18	13	24	16
3	3	1	-8	43	21	34
4	1	2	7	14	24	24
5	0	5	36	13	26	32
6	-2	0	24	48	-	-
7	-	-	-	28	-	-
Média\pmepm	2\pm1	3\pm1	13\pm7	23\pm6	30\pm6	32\pm6

Tabela 31 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Hz) promovidas pela microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de PPADS (10 mM) no NTS caudal na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

WHBP	Microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM)				
	Controle	2 min após PPADS	10 min após PPADS	30 min após PPADS	45 min após PPADS
1	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00
3	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10
5	0,10	0,10	0,10	0,20	0,00
6	0,20	0,20	0,20	0,10	0,10
Média±epm	0,07±0,03	0,08±0,04	0,08±0,04	0,10±0,03	0,05±0,02

Tabela 32 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de PPADS (10 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM)				
	Controle	2 min após PPADS	10 min após PPADS	30 min após PPADS	45 min após PPADS
1	-70	-22	-53	-107	-90
2	-74	-60	-47	-40	-51
3	-94	-79	-39	-56	-60
4	-40	-50	-65	-49	-56
5	-58	-50	-48	-69	-79
6	-77	-17	-89	-66	-89
Média±epm	-69±28	-46±19	-57±23	-65±10	-71±7

Tabela 33 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, $\Delta\%$) promovidas pela microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de PPADS (10 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM)				
	Controle	2 min após PPADS	10 min após PPADS	30 min após PPADS	45 min após PPADS
1	25	21	37	34	36
2	22	30	25	31	23
3	31	24	24	29	25
4	33	23	22	33	24
5	17	10	11	14	29
6	32	14	16	19	32
Média\pmepm	27\pm3	20\pm3	22\pm4	27\pm3	28\pm2

Tabela 34 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Hz) promovidas pela microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de PPADS (20 mM) no NTS caudal na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

WHBP	Microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM)				
	Controle	2 min após PPADS	10 min após PPADS	30 min após PPADS	45 min após PPADS
1	0,00	0,10	0,20	0,20	0,00
2	0,00	0,20	0,20	0,30	0,10
3	0,10	0,50	0,30	0,40	0,20
4	0,20	0,70	0,70	0,60	0,00
5	0,20	0,20	0,50	0,40	0,00
6	0,20	0,20	0,30	0,20	0,10
7	0,10	0,20	0,30	0,10	0,00
Média\pmepm	0,11\pm0,03	0,30\pm0,08*	0,42\pm0,07*	0,34\pm0,07*	0,06\pm0,03

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de α,β -metileno-ATP ($p \leq 0,05$).

Tabela 35 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de PPADS (20 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM)				
	Controle	2 min após PPADS	10 min após PPADS	30 min após PPADS	45 min após PPADS
1	-66	-43	-22	-38	-86
2	-63	-11	-10	-26	-21
3	-62	22	-1	-30	-117
4	-100	3	-23	-23	-51
5	-103	11	-29	-45	-89
6	-55	-25	-12	-26	-65
7	-85	-27	-8	-26	-50
Média\pmepm	-76\pm29	-10\pm9*	-15\pm4*	-31\pm3*	-68\pm12

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de α,β -metileno-ATP ($p \leq 0,05$).

Tabela 36 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, $\Delta\%$) promovidas pela microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM), antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção de PPADS (20 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM)				
	Controle	2 min após PPADS	10 min após PPADS	30 min após PPADS	45 min após PPADS
1	32	14	4	4	23
2	10	19	7	3	13
3	38	11	4	9	28
4	23	7	5	10	20
5	26	1	1	20	31
6	37	7	5	15	38
7	41	11	17	28	40
Média\pmepm	30\pm4	10\pm2*	6\pm2*	13\pm3*	28\pm4

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de α,β -metileno-ATP ($p \leq 0,05$).

Tabela 37 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Δ Hz) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

WHBP	Injeção de KCN (0,05 %)				
	Controle	2 min após PPADS	10 min após PPADS	30 min após PPADS	45 min após PPADS
1	0,20	0,20	0,20	0,20	0,10
2	0,20	0,30	0,30	0,20	0,20
3	0,30	0,30	0,30	0,20	0,20
4	0,20	0,20	0,20	0,10	0,10
5	0,40	0,30	0,30	0,30	0,30
6	0,30	0,30	0,30	0,30	0,40
7	0,20	0,10	0,20	0,30	0,30
8	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Média\pmepm	0,25\pm0,03	0,24\pm0,03	0,25\pm0,02	0,22\pm0,02	0,23\pm0,04

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

Tabela 38 – Alterações na frequência cardíaca (Δ FC bpm) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Δ FC promovidas pela injeção de KCN (0,05 %)				
	Controle	2 min após PPADS	10 min após PPADS	30 min após PPADS	45 min após PPADS
1	-148	-75	-40	-102	-82
2	-109	-90	-119	-128	-109
3	-137	-189	-177	-218	-201
4	-177	-173	-133	-150	-151
5	-134	-99	-151	-119	-168
6	-69	-108	-100	-115	-133
7	-81	-55	-77	-60	-99
8	-103	-95	-117	-108	-100
Média\pmepm	-120\pm13	-111\pm16	-114\pm15	-125\pm16	-130\pm14

Tabela 39 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, $\Delta\%$) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Injeção de KCN (0,05 %)				
	Controle	2 min após PPADS	10 min após PPADS	30 min após PPADS	45 min após PPADS
1	57	61	52	54	42
2	47	43	49	40	52
3	56	50	62	56	56
4	43	46	44	55	53
5	59	62	60	59	55
6	62	57	49	59	40
7	60	61	51	54	60
8	56	32	21	54	47
Média\pmepm	55\pm2	52\pm4	48\pm5	54\pm2	51\pm2

Tabela 40 – Alterações na frequência da atividade do nervo frênico (ANF, Δ Hz) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) e ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal na preparação WHBP avaliadas nos 10 segundos após a microinjeção (pico da resposta).

WHBP	Injeção de KCN (0,05 %)					
	Controle	2 min após PPADS + KYN	10 min após PPADS + KYN	30 min após PPADS + KYN	45 min após PPADS + KYN	60 min após PPADS + KYN
1	0,20	0,20	0,20	0,30	0,30	0,30
2	0,30	0,20	0,30	0,20	0,10	0,40
3	0,30	0,20	0,30	0,20	0,20	0,20
4	0,20	0,20	0,20	0,30	0,20	0,10
5	0,20	0,30	0,20	0,10	0,20	0,30
6	0,20	0,10	0,10	0,20	0,30	0,40
7	0,30	0,20	–	–	–	0,20
Média\pmepm	0,24\pm0,02	0,20\pm0,02	0,22\pm0,03	0,20\pm0,04	0,23\pm0,04	0,21\pm0,05

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

Tabela 41 – Alterações na frequência cardíaca (ΔFC bpm) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) e ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Injeção de KCN (0,05 %)					
	Controle	2 min após PPADS + KYN	10 min após PPADS + KYN	30 min após PPADS + KYN	45 min após PPADS + KYN	60 min após PPADS + KYN
1	-86	-21	-8	-22	-26	-69
2	-133	-7	-21	-38	-53	-127
3	-112	-26	-13	-14	-30	-85
4	-128	-13	-10	-17	-20	-38
5	-158	-13	-13	-30	-85	-103
6	-194	-25	-28	-39	-112	-168
7	-99	-29	-21	-21	-115	-205
8	-214	-35	-13	-79	-110	-149
9	-231	-21	-22	-73	-101	-202
Média\pmepm	-151\pm17	-21\pm3*	-17\pm2*	-37\pm8*	-72\pm13	-127\pm20

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

Tabela 42 – Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, $\Delta\%$) promovidas pela injeção de KCN (0,05 %/0,05 mL) no sistema de perfusão, antes (controle) e aos 2, 10, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) e ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal na preparação WHBP.

WHBP	Injeção de KCN (0,05 %)					
	Controle	2 min após PPADS + KYN	10 min após PPADS + KYN	30 min após PPADS + KYN	45 min após PPADS + KYN	60 min após PPADS + KYN
1	45	17	15	18	40	56
2	54	13	14	27	61	64
3	44	14	18	29	36	42
4	57	16	17	36	42	55
5	65	26	29	37	48	55
6	46	20	12	34	42	50
7	53	13	12	40	42	52
8	53	16	25	27	36	44
9	55	18	23	30	38	51
Média\pmepm	52\pm2	17\pm1*	18\pm2*	31\pm2*	43\pm3	52\pm2

*diferente em relação à resposta controle à injeção controle de KCN 0,05 % ($p \leq 0,05$).

10. PUBLICAÇÃO

Article submitted to: *Journal of Physiology*

INVOLVEMENT OF L-GLUTAMATE AND ATP IN THE NEUROTRANSMISSION OF THE SYMPATHOEXCITATORY COMPONENT OF THE CHEMOREFLEX IN THE COMMISSURAL NTS OF AWAKE RATS AND IN THE WORKING HEART BRAINSTEM PREPARATION

Valdir A. Braga, Renato N. Soriano, Alex L. Braccialli, Patrícia M. de Paula¹, Leni G.H. Bonagamba, Julian F.R. Paton² and Benedito H. Machado.

Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo-USP, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil, ¹Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, São Paulo State University-UNESP, 14801-903, Araraquara, SP, Brazil, ²Department of Physiology, Bristol Heart Institute, School of Medical Sciences, University of Bristol, Bristol BS8 2TD, UK.

Running Head: Chemoreflex and P2 and EAA receptors in the NTS of unanesthetized rats

ABSTRACT

Peripheral chemoreflex activation with potassium cyanide (KCN) in awake rats or in the working heart brainstem preparation (WHBP) produces: a) pressor response and sympathoexcitation; b) bradycardia; and c) tachypnoea and increase in the frequency of phrenic nerve activity. Our major aim was to evaluate the neurotransmitters involved in the mediation of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex within the NTS. In previous studies the reflex bradycardia, but not the pressor response, was reduced by antagonism of either NMDA or P2 receptors within the NTS. The present study evaluated mainly the possible dual role of both purinergic P2 and ionotropic glutamate receptors in the NTS in processing the sympathoexcitatory component (pressor response) of the peripheral chemoreceptor in awake rats as well as in the WHBP. Simultaneous blockade of ionotropic glutamate receptors and P2 receptors by sequential microinjections of kynurenic acid (KYN, 2 nmol/50 nL) and pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS, 0.25 nmol/50 nL) into the intermediate and caudal commissural NTS in awake rats produced a significant reduction in the pressor (+38±3 vs +8±3 mmHg) and bradycardic responses (-172±18 vs -16±13 bpm; n=13) but no significant changes in the tachypneic response (from 120±17 to 270±30 cpm in the control vs from 120±15 to 240±21 cpm after double antagonism) to chemoreflex activation in awake rats. The sequential microinjection of the vehicle (saline) produced no significant changes in the pressor and bradycardic responses to chemoreflex activation in awake rats. Microinjection of KYN (2 nmol/20 nL) and PPADS (1.6 nmol/20 nL) into the caudal commissural NTS of the WHBP significantly attenuated the increase in thoracic sympathetic activity (+52±2 vs +17±1 %) and the bradycardic response (-151±17 vs -21±3 bpm) but produced no significant changes in the increase of the frequency of phrenic nerve discharge (+0.24±0.02 vs +0.20±0.02 Hz). The data indicate that combined microinjection of PPADS and KYN into the intermediate and caudal commissural NTS in awake rats or the bilateral microinjection of both antagonists into the caudal commissural NTS in the WHBP are required to produce significant reduction in the sympathoexcitatory response (pressor response) to peripheral chemoreflex activation. We conclude that glutamatergic and purinergic mechanisms are part of the complex neurotransmission system of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex at the caudal commissural NTS level. The absence of changes in the increase in respiratory frequency in awake rats and in the frequency of phrenic nerve discharge in the WHBP suggest that the respiratory component of the chemoreflex is not dependent on EAA and P2 receptors in the caudal commissural NTS.

Keywords: Nucleus tractus solitarii, adenosine 5-triphosphate (ATP), α,β -methylene ATP, Pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS), kynurenic acid, sympathetic activity.

INTRODUCTION

The peripheral chemoreceptor afferents make their first synapses in the nucleus tractus solitarius (NTS) and terminate mainly in the caudal aspect of the commissural NTS (Chitravanshi et al. 1994; Chitravanshi and Sapru, 1995; Mifflin, 1992; Paton et al., 2001). Activation of the peripheral chemoreceptors by intravenous injection of cyanide produces bradycardia, increase in arterial pressure due to sympathetic activation and tachypnea in rats (Franchini and Krieger, 1992, 1993; Haibara et al., 1995; Boscan and Paton, 2001). The activation of the peripheral chemoreflex by injection of NaCN or KCN in the perfusion system of the working heart brainstem preparation (WHBP) produces a large increase in the thoracic sympathetic nerve activity, bradycardia and increase in the frequency of phrenic nerve activity (Paton et al., 2002; Antunes et al., 2005a; Braga and Machado, 2006).

Studies by Haibara et al. (1995) in awake rats showed that the bradycardic response to chemoreflex stimulation was mediated by N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, because it was reduced in a dose-dependent manner by bilateral microinjection of DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP-5), a selective NMDA receptor antagonist, into the intermediate NTS, suggesting that the parasympathetic component of the peripheral chemoreflex involves L-glutamate acting on NMDA receptors at the level of the NTS. In contrast, it was observed no effect on the pressor response to chemoreflex activation (sympathoexcitatory component) after antagonism of NMDA receptors in the NTS. In previous studies, we also demonstrated that microinjection of 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX, a selective non-NMDA receptor antagonist) or kynurenic acid (a non-selective ionotropic glutamate receptor antagonist) into the intermediate and caudal aspects of the commissural NTS of awake rats produced only a partial reduction of the pressor response to chemoreflex activation in awake rats (Haibara et al., 1999; Machado and Bonagamba, 2005). In a recent study performed in the WHBP, the antagonism of ionotropic and metabotropic

glutamate receptors in the caudal commissural NTS also failed to reduce the sympathoexcitation elicited by peripheral chemoreceptors activation (Braga and Machado, 2006), providing additional support to our previous studies performed in awake rats (Haibara et al., 1995, 1999; Machado and Bonagamba, 2005) that the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex involves neurotransmitters other than solely L-glutamate in the NTS.

A potential role for ATP as a neurotransmitter/neuromodulator was suggested by Burnstock (1972) and immunohistochemical studies have demonstrated the presence of all six P2X receptors in the NTS (Yao et al., 2000) with a predominance of P2X₂ and P2X₃ receptors (Vulchanova et al., 1997; Llewellyn-Smith and Burnstock, 1998). Several functional studies have indicated that ATP, at the level of the NTS and ventrolateral medulla, is involved in cardio-respiratory regulation (Ergene et al., 1994; Barraco et al., 1996; Phillis et al., 1997; Scislo et al., 1997, 1998; de Paula et al., 2004; Antunes et al., 2005a, Antunes et al., 2005b). In a previous study, using the WHBP, we documented that the bradycardic response to chemoreflex activation with cyanide was attenuated by microinjection of a non-selective P2 receptors antagonist (suramin) into the intermediate and caudal NTS, a finding that support the hypothesis regarding the involvement of P2 receptors in the neurotransmission of the parasympathetic component of the chemoreflex (Paton et al., 2002). However, the neurotransmitters in the NTS involved in mediation of the chemoreflex sympathoexcitation were not evaluated in that previous WHBP study. In experiments performed in awake rats we documented that microinjection of ATP into the caudal commissural NTS produced a cardiovascular and respiratory pattern of responses similar to those produced by chemoreflex activation, i.e. bradycardia, pressor response and tachypnea (de Paula et al., 2004; Antunes et al., 2005b). Therefore, the involvement of P2 receptors in the processing of the chemoreflex in the NTS is an important question that remains to be answered. In the present study this matter was

explored in both awake rats and in the WHBP. Considering previous findings that a) ATP is an important neuromodulator of visceral reflex function in the NTS (de Paula et al., 2004; Antunes et al., 2005b); b) microinjection of ATP into the NTS of awake rats produces a pattern of cardiovascular responses that resembles the response to chemoreflex activation with KCN (Scislo and O'Leary, 1998; de Paula et al., 2004; Antunes et al., 2005b); c) the blockade of glutamate ionotropic and metabotropic receptors in the NTS produced no major changes in the pressor (awake) or in the sympathoexcitation (WHBP) in response to chemoreflex activation (Haibara et al., 1999; Machado and Bonagamba, 2005; Braga and Machado, 2006); and d) activation of presynaptic P2X receptors in the NTS triggered a Ca^{2+} -dependent release of glutamate (Shigetomi and Kato, 2004), we evaluated the effect of: 1) antagonism of P2 receptors in the NTS on the pressor response (awake) and on the sympathoexcitatory response (WHBP); and 2) sequential and combined antagonism of P2 receptor and ionotropic glutamate receptor in the intermediate and caudal commissural NTS on the pressor and respiratory responses to chemoreflex activation in awake rats and also the effect of this double antagonism on the sympathoexcitatory and on the increase in the frequency of the phrenic nerve discharge in response to chemoreflex activation in the WHBP.

In the present study we used awake rats and the WHBP because these two experimental models are free of the anesthetic effects, which may preclude a physiological evaluation of the neurotransmission at the NTS level (Machado and Bonagamba, 1992; Acorssi-Mendonça et al., 2006). The WHBP was also selected because it does not have the confounding influence of a change in baseline arterial pressure, and hence baroreflex involvement, because the perfusion pressure is determined by the perfusion pump and also because it allows the sympathetic nerve activity component which is technically challenging in conscious rats. Therefore, similar experimental protocols performed in these two experimental models make the data interpretation even more consistent.

METHODS

Experimental approaches were performed in accordance with the guidelines set by the Brazilian Committee for Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Institutional Ethics Committee on Animal Experimentation of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

I - Awake rats

Experiments were performed on adult male Wistar rats weighing 290-310 g. Four days before experiments, rats under tribromoethanol anaesthesia (250 mg/kg, i.p., Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA) were placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf, Tujunga, CA, USA). Frequent toe pinching was used to assess the depth of anaesthesia. As soon as a flexor reflex was evident, anaesthesia was supplemented (tribromoethanol, 250 mg/kg, i.p.). Using the approach described originally by Michelini and Bonagamba (1988), we implanted guide cannulae in direction to the NTS. Three guide cannulae were employed: two were implanted above the intermediate NTS [0.5 mm lateral to midline and 0.5 mm rostral to the *calamus scriptorius CS*] and one implanted above the caudal aspect of the commissural NTS (on the midline and 0.5 mm caudal to CS). These cannulae allowed sequential microinjections of excitatory amino acid receptors antagonist kynurenic acid (KYN) and P2 receptors antagonist (PPADS) into the intermediate (bilaterally) and caudal (midline) commissural NTS. All guide cannulae were implanted in accordance with the coordinates of the atlas by Paxinos and Watson (1998). To implant each guide cannula in the group that received three cannulae, we made a small window in the skull and introduced a 15-mm long stainless steel guide cannula (22-gauge) perpendicularly through the window at the following coordinates: 14.0 mm (intermediate NTS) or 14.5 mm (caudal commissural NTS) caudal to the bregma, 0.5 mm (intermediate NTS) or 0.0 mm (caudal commissural NTS) lateral to the midline, and 7.8 mm below the skull surface referenced to bregma (intermediate and caudal

commissural NTS). The tip of each guide cannula was positioned in the cerebellum 1.0 mm above the dorsal surface of the brainstem. The guide cannulae were fixed to the skull with methacrylate and watch screws and then closed with a mandrill until injections were made.

Arterial and venous catheters

One day before experiments, with the rats under tribromoethanol anaesthesia, a small incision (0.5 cm long) was performed to isolate the femoral artery and vein. A catheter (PE-10 connected to PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery for measurement of pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP), and heart rate (HR). A second catheter was inserted into the femoral vein for systemic administration of potassium cyanide (KCN) and a third catheter was inserted into the contralateral femoral vein for sodium nitroprusside (SNP) infusion to normalize MAP. The catheters were tunneled subcutaneously and exteriorized through the back of the neck. The arterial cannula was connected to a pressure transducer on the experimental day. PAP and MAP were measured with a pressure transducer (model CDX III, Cobe Laboratories, Lakewood, CO, USA) connected to a physiological recorder (Narcotrace 80, Narco Bio-Systems, Austin, TX, USA). Heart rate was derived from the interval between arterial pressure pulses with a biotachometer coupler (Narco Bio-Systems, model 7302). Mean arterial pressure and heart rate were recorded 24 h after the implant of the catheters when the rats were completely recovered from the surgical and anaesthetic procedures. All cannulae were suspended enabling animals to move freely.

For the intravenous infusion of sodium nitroprusside ($3 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}/\text{min}^{-1}$) to normalize the MAP after microinjection of kynurenic acid and PPADS into the NTS, a third catheter was inserted into the contralateral femoral vein and, on the day of the experiment, it was connected to a syringe mounted on an infusion pump (Ati-Orion Sage Model 361, Boston, MA, USA).

Microinjections into the nucleus tractus solitarius

Microinjections into the intermediate and caudal commissural NTS were performed in conscious unrestrained rats in accordance with previous studies from our laboratory (Machado and Bonagamba, 1992, 2005; Colombari et al., 1994, 1997; Haibara et al., 1995, 1999). The needle (33-gauge, Small Parts, Miami Lakes, FL, USA) used for microinjection into the NTS was 1.5 mm longer than the guide cannula and was connected by PE-10 tubing to a 1- μl syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). After removal of the guide cannula occluder, the needle used for microinjection of drugs into the NTS was carefully inserted into the guide cannula and manual injection was initiated 30 sec later without any restriction or manipulation of the rats. The first microinjection was initially performed on one side, the needle was withdrawn and repositioned on the contralateral side, and then a second microinjection was performed and the same procedure was repeated for the third cannula in the group of rats that received three guide-cannulae. The time interval for microinjections into the three NTS sites was ~ 1.5 min and the volume of each microinjection was 50 nL. In the vehicle control group, chemoreflex responses were evaluated before and after the microinjection of saline (50 nL) into the intermediate and caudal commissural NTS. In the experimental protocols involving microinjection of α, β -methylene ATP into the NTS, microinjections were performed before and after microinjection of PPADS into the same site in the NTS. The microinjection of 50 nL were performed into the NTS at a period no longer than 10 sec.

Chemoreflex activation

The chemoreflex was activated by intravenous injection of KCN (40 $\mu\text{g}/\text{rat}$; Merck, Darmstadt, Germany) in accordance with the procedures described by Franchini and Krieger (1993) and previously validated for our experimental conditions (Haibara et al., 1995, 1999; Barros et al., 2002; Machado and Bonagamba, 2005). The changes in MAP and

HR were quantified using peak response values. The cardiovascular responses to chemoreflex activation were evaluated before and 3, 10, 30 and 60 min after sequential microinjection of PPADS (0.25 nmol/50 nL) and KYN (2.0 nmol/50 nL) into the intermediate and caudal commissural NTS.

Microinjections into the NTS of awake rats inside of a plethysmographic chamber

The needle (33-gauge) used for microinjection into the NTS was 1.5 mm longer than the guide cannulae and was connected by polyethylene tubing (PE-10) to a 1- μ L syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). Guide cannulae were implanted bilaterally in the direction of the caudal commissural NTS. After removal of the occluder, the needle for microinjection of drugs into the NTS was carefully inserted into the guide cannulae. Manual microinjection (50 nL) was initially performed in one side, the needle withdrawn, repositioned on the contralateral side and the second microinjection made. Therefore, both microinjections were performed approximately 1 min. apart. After the second microinjection, the plethysmographic chamber was closed for records of the baseline respiratory frequency (RF) immediately before the chemoreflex activation and also the changes in RF in response to chemoreflex activation with KCN. The chemoreflex was activated before (control) and 2, 5, 10, 15 and 30 min after bilateral microinjections of kynurenic acid and PPADS or saline (vehicle) into the caudal commissural NTS.

Respiratory and cardiovascular recordings

The rats used for respiratory recordings in the plethysmographic chamber had also the measurement of the cardiovascular parameters using experimental procedures similar to those used on the protocols, in which the cardiovascular parameters were recorded. Therefore, evaluation of the respiratory frequency was performed using a whole-body plethysmography chamber (Malan, 1973), and recorded simultaneously with the cardiovascular measurements. The PE-50 extensions of the femoral artery and vein catheters as well as the PE-10 tubing

connecting the syringe (Hamilton, 1 μ L) to the injector used for microinjections into the NTS were exteriorized throughout a little hole in the wall of the plethysmography chamber, which was covered with a silicone grease during the records. Using this approach, it was possible to perform the chemoreflex activation with potassium cyanide (KCN, 40 μ g/0.1 mL, i.v.). The microinjections of antagonists (kynurenic acid and PPADS) were microinjected in the same way describe in the previous experimental protocol.

Drug solutions

The following drugs were used in these experiments: α,β -methylene ATP [α,β -methylene adenosine 5'-triphosphate (0.0625 nmol/50 nL)], PPADS [pyrinoxalophosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid tetrasodium salt (0.25 nmol/50 nL)] and KYN [kynurenic acid (2.0 nmol/50 nL)] were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Potassium cyanide (KCN, 40 μ g 0.1 mL⁻¹.rat⁻¹) was obtained from Merck, Darmstadt, Germany. The drugs solutions were freshly dissolved in saline (NaCl, 0,9%) and the pH was in the physiological range.

Experimental protocols

The first group of awake rats was used to verify the effect of microinjection of PPADS into the NTS on the cardiovascular response to chemoreflex activation. The second group of awake rats was used to evaluate the role of ionotropic glutamate receptors and P2 receptors in the NTS on the neurotransmission of the chemoreflex in the NTS. In both cases the chemoreflex was stimulated using injections of KCN (40 μ g/rat, i.v.) before and 3, 10, 30 and 60 min after microinjections. In the second experimental protocol sequential microinjections of KYN (2.0 nmol/50 nL) and PPADS (0.25 nmol/50 nL) were performed into the intermediate and caudal commissural NTS combined with SNP infusion to normalize MAP. The sequence of microinjections of KYN and PPADS was used in six rats and the sequence PPADS and KYN was used in seven rats. Therefore, 13 rats were used for this experimental protocol. In a third

protocol, the chemoreflex was activated before and 3, 10, 30 and 60 min after sequential microinjections of saline (vehicle, 50 nL) into the intermediate and caudal commissural NTS. The dose of PPADS (0.25 nmol/50 nL) used in these experimental protocols was determined in a previous study from our laboratory (data not shown), which showed that this dose was effective in blocking the cardiovascular responses produced by α,β -methylene ATP (0.0625 nmol/50 nL) microinjected into the caudal commissural NTS. The dose of kynurenic acid used in these experimental protocols was determined in a previous study from our laboratory, which documented that it was effective in antagonizing the cardiovascular responses to microinjection of L-glutamate into the NTS of awake rats (Colombari et al., 1994).

In a specific group of rats (n=13) the cardiovascular and respiratory parameters were recorded with the animal inside the plethysmography chamber (volume of 6 liters), which was closed just after bilateral microinjections of kynurenic acid and PPADS for a subsequent chemoreflex activation. On this experimental protocol, chemoreflex was activated by KCN injection and the respiratory response were evaluated before and 2, 5, 10, 15 and 30 min after bilateral microinjections of the antagonists (n=7) or vehicle (saline, n=6). The microinjections of kynurenic acid and PPADS were performed in a random sequence. During injection of KCN (i.v.) for chemoreflex activation, the plethysmography chamber was kept closed and it was opened in between the chemoreflex stimulations and the animals had access to fresh-air. The ventilatory frequency was quantified during 10 sec (every 2 sec) before (baseline) and 10 sec (every 2 sec) after each chemoreflex activation.

Histology

At the end of each experiment, 50 nL of Evans' blue (2%) was microinjected for histological identification of sites of microinjection. Rats were killed with an overdose of thiopental sodium (100 mg/kg, i.v.) and immediately submitted to intracardiac perfusion with saline (154 mM) followed by 10% buffered formalin. Brains were removed

and stored in buffered formalin for 2 days, and then serial transverse sections (15 μ m thickness) were cut and stained by the Nissl method. Only the rats in which the sites of microinjection were located in the intermediate (bilateral) and caudal (midline) commissural NTS or in the caudal commissural NTS bilaterally in the case of the respiratory experimental protocol were considered for data analysis.

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm standard error (SEM). The results were analyzed by one-way ANOVA, and differences between individual means were compared by Student's *t*-test. In all statistical analyses, the level of significance was $P < 0.05$.

II - Working heart brainstem preparation

Another series of experiments were performed in an *in situ* unanaesthetized decerebrated working heart-brainstem preparation (WHBP) as described previously by Paton (1996). Rats were anaesthetized deeply with halothane (AstraZeneca do Brazil Ltda., Cotia, SP, Brazil) in a small chamber and the level of anaesthesia was assessed by absence of response to a noxious pinch of either the paw or the tail. Following sub-diaphragmatic transection, the rostral half of the animal was submerged in cooled carbogen gassed (95% O₂ and 5% CO₂) artificial cerebrospinal fluid (ACSF), decerebrated at the precollicular level and skinned. The descending aorta was isolated, the heart exposed by removal of the left ribs and the lungs. The dorsal surface of the brainstem was exposed by removal of the occipital bone and cerebellum. Then, WHBP was moved to a recording chamber, the descending aorta was cannulated and perfused retrogradely with ACSF (in mM): NaCl, 125; NaHCO₃, 24; KCl, 5; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.25; KH₂PO₄, 1.25; dextrose, 10; oncotic agent (Ficoll® 70, 1.25%; Sigma, St. Louis, MO, USA) using a roller pump (Watson-Marlow 502s, Falmouth, Cornwall, UK) via double lumen cannula. A neuromuscular blocker (vecuronium bromide, 0.04 mg/ml, Norcuron Organon Teknika, Sao

Paulo, SP, Brazil) was used to prevent the chest wall respiratory movements. Perfusion pressure was maintained in a narrow range (from 50 to 70 mmHg) by adjusting flow rate of the perfusion pump. The perfusate was gassed with carbogen continuously, warmed to 32°C and filtered using a nylon mesh (pore size: 25 µm, Millipore, Billirica, MA, USA).

Recordings of electrocardiogram and nerve activities

Left phrenic nerve activity was recorded from its central end using a glass suction electrode held in a micromanipulator (Narishige, Tokyo, Japan). Rhythmic ramping phrenic nerve discharge (PND) gave a continuous physiological index of the preparation viability. The electrocardiogram (ECG) was visible on the phrenic nerve recording which allowed us evaluate HR by using a low-pass filter. Sympathetic nerve activity (tSNA) was recorded from the thoracic sympathetic chain at the level of T6-T12 using a second glass suction bipolar electrode. Signals were AC amplified, band pass filtered (8 Hz-3 kHz) and displayed on a computer using the software Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

Microinjections into the caudal commissural NTS

The CS was used as a landmark for microinjections into the caudal commissural NTS. Drugs were applied bilaterally via a three-barreled micropipette (tip diameter 20–30 µm). The tip of the micropipette was driven into the medulla to a depth of 0.3–0.4 mm ventral to the dorsal surface, 0.3–0.5 mm caudal relative to CS and between 0.2 and 0.4 mm from midline. The injected volume for all drugs (~20 nl) was determined by previous calibration of the picopump system (Picospritzer II, Parker Instruments, OH, USA). Bilateral microinjections were performed into the NTS in the first side following the sequence KYN and PPADS and in the contralateral side the sequence PPADS and KYN. The time for all microinjections was no longer than 1.5 minutes. At the end of the experiments the brain was removed, fixed and histological procedures

were performed in order to verify the micropipette track and the centre of microinjections in the caudal commissural NTS.

Peripheral chemoreceptors activation

KCN solution (0.05 ml of 0.05% solution) was injected into the descending aorta of the WHBP via the perfusion cannula to excite peripheral chemoreceptors as used previously (Paton *et al.*, 1999, 2002; Antunes *et al.*, 2005a; Braga and Machado, 2006).

Experimental protocols

The first group of WHBP was used to verify whether the dose of PPADS (0.16nmol/20nL) to be used in the subsequent experiments was effective in antagonizing the autonomic and respiratory responses to microinjection of α,β -methylene ATP into the caudal commissural NTS. Thus, α,β -methylene ATP (0.4nmol/20nL) was microinjected unilaterally into the caudal commissural NTS before and 2, 10, 30 and 45 minutes after the microinjection of PPADS (0.16nmol/20nL) into the same site in the NTS. The second group of WHBP was used to evaluate the role of P2 receptors in the caudal commissural NTS on the neurotransmission of the chemoreflex by the antagonism of P2 receptors with PPADS. A third group was used to evaluate the role of ionotropic glutamate receptors and P2 receptors in the caudal commissural NTS on the neurotransmission of the chemoreflex by the sequential microinjection of KYN (2.0 nmol/20nL) and PPADS (0.16nmol/20nL). In the last two protocols the chemoreflex was activated by KCN injections (0.05mL of a solution 0.05%, in the perfusion system) before and 2, 10, 30, 45 and 60 min after microinjections. The microinjection of PPADS alone was performed in eight WHBP and the sequential microinjection of PPADS and KYN was performed in other nine WHBP. The dose of kynurenic acid used in these experimental protocols was determined in a previous study from our laboratory, which documented that it was effective in antagonizing the cardiovascular responses to microinjection of

L-glutamate into the NTS of the WHBP (Braga et al., 2006).

Data analysis

All data were analyzed off-line using Spike 2 software with custom-written scripts. Baseline and peak reflex responses in HR were measured. The rectified and integrated signals of the tSNA (100 ms time constant) were measured for a period covering 20 sec before and 20 sec after chemoreflex activation. Data of tSNA were normalized as percentage of control and changes in the tSNA during chemoreflex stimulation were calculated as the difference between the peak of the response and the baseline measured before each stimulus, as described previously (Braga and Machado 2006; Braga *et al.*, 2006). Frequency of bursts of the phrenic nerve activity was measured in a time-dependent way (counted each 10 sec starting 40 sec before the microinjection and ending 50 sec after microinjection). Data are expressed as the peak change in the frequency of the PNA response (increase in the frequency of PNA) after chemoreflex activation. The statistical significance of the changes was assessed by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test ($p < 0.05$) to evaluate the changes in the tSNA and HR after chemoreflex activations. All values are expressed as the mean \pm standard error (SE) and n is the number of preparations.

Histology

At the end of the experiments the brain was removed and fixed by immersion for seven days in 10% buffered formalin. Histological procedures were performed in order to verify the micropipette track and the centre of microinjections in the caudal commissural NTS. Thus, after fixation, serial transverse sections (15 μ m thickness) were cut and stained by the Nissl method. Only the WHBP in which the sites of microinjection were located in caudal commissural NTS were considered for data analysis.

RESULTS

I – Awake rats

Chemoreflex activation before and after microinjection of PPADS into the caudal commissural NTS in awake rats

Figure 1 shows tracings of one rat, representative of the group, in which the chemoreflex activation was performed before and 2, 10, 30 and 60 min after bilateral microinjection of PPADS (0.25 nmol/50 nL) into the caudal commissural NTS and it is possible to verify that pressor and bradycardic responses were not altered after the antagonism. Figure 2 summarizes changes in MAP and HR in response to chemoreflex activation before and after microinjection of PPADS into the NTS and the data show that the antagonism of P2X receptors in the caudal commissural NTS produced no changes in the cardiovascular responses to chemoreflex activation.

Chemoreflex activation before and after microinjection of both PPADS and KYN into the intermediate and caudal commissural NTS in awake rats: Cardiovascular responses

Figure 3 shows tracings of one rat, representative of the group, in which the chemoreflex activation was performed before and 3, 10, 30 and 60 min after sequential microinjection of PPADS (0.25 nmol/50 nL) and KYN (2 nmol/50 nL) into the intermediate (bilaterally) and caudal (midline) commissural NTS. After these sequential microinjections there was a significant increase in MAP but no major changes in baseline HR. The pressor and bradycardic responses to chemoreflex activation 3 and 10 minutes after both PPADS and KYN, combined with sodium nitroprusside infusion to normalize MAP, were significantly attenuated. Figure 4 summarizes changes in MAP and HR in response to chemoreflex activation before and after sequential microinjection of both PPADS and KYN. The upper panel of the figure 4 illustrates that the pressor response to chemoreflex activation was statistically different at 3 (+38 \pm 3 vs +8 \pm 3 mmHg) and 10 minutes (+38 \pm 3 vs +10 \pm 4 mmHg) after the microinjections of antagonists in relation to

control ($P < 0.05$, $n = 13$). The bottom panel of the figure 4 illustrates that the bradycardic response to chemoreflex activation was statistically different at 3 (-172 ± 18 vs -16 ± 13 bpm) and 10 minutes (-172 ± 18 vs -30 ± 20 bpm) after the microinjections of antagonists in relation to control ($P < 0.05$, $n = 13$). Thirty minutes after the sequential blockade the pressor and bradycardic responses were back to control levels.

Chemoreflex activation before and after microinjection of both PPADS and KYN into the intermediate and caudal commissural NTS in awake rats: Respiratory response

Figure 5 shows tracings of one rat, representative of the group, in which the chemoreflex activation was performed before and 2, 5, 10, 15 and 30 min after sequential microinjection of PPADS (0.25 nmol/50 nL) and KYN (2 nmol/50 nL) into the caudal commissural NTS bilaterally. After these sequential microinjections no significant changes in the tachypneic response to chemoreflex activation was observed. The data obtained in the control and 2, 5 and 10 min after the double blockade in the caudal commissural NTS are summarized in the 4 panels of figure 6, which shows no changes in the baseline RF or in the tachypneic response to chemoreflex activation. The data obtained at 15 and 30 min were similar and are not shown. In this group ($n = 7$) the cardiovascular parameters were also recorded and the data show that the increase in the baseline MAP (107 ± 1 vs 123 ± 2 mm Hg) and the reduction in the magnitude of the pressor response (40 ± 3 vs 15 ± 2 mm Hg) 5 min after the double blockade, a pattern of responses similar to that observed in the previous group in which the ventilation was not recorded.

Chemoreflex activation before and after microinjection of vehicle (saline, 50 nL) into the intermediate and caudal commissural NTS in awake rats

The changes in MAP in response to chemoreflex activation before and after sequential microinjection of saline into the three sites of the NTS at 3 ($+42 \pm 1$ vs $+34 \pm 8$ mmHg), 10 ($+42 \pm 1$ vs $+44 \pm 12$ mmHg), 30 ($+42 \pm 1$ vs $+37 \pm 6$ mmHg) and 60 min ($+42 \pm 1$ vs $+37 \pm 8$

mmHg) were not statistically different in relation to control values ($P > 0.05$, $n = 4$). In the same way, the changes in HR in response to chemoreflex activation before and after sequential microinjection of saline into the three sites of the NTS at 3 (135 ± 54 vs -132 ± 47 bpm), 10 (135 ± 54 vs -145 ± 46 bpm), 30 (135 ± 54 vs -152 ± 23 bpm) and 60 min (135 ± 54 vs -150 ± 15 bpm) were not statistically different in relation to control values ($P > 0.05$, $n = 4$).

Baseline MAP and HR before and after NTS microinjections and during the infusion (iv) of sodium nitroprusside to normalize MAP in awake rats

Table 1 shows that the sequential microinjections of PPADS and KYN into the NTS produced a significant increase in baseline MAP, which was normalized by sodium nitroprusside infusion. Sequential microinjection of saline (vehicle) into the NTS produced negligible effect on the baseline MAP. No significant change in the baseline HR was observed after the sequential microinjections of the antagonists or saline into the NTS.

Histology

Figure 7 summarizes the histological profile of the rats used on these experimental protocols. Panels A and C are photomicrographs of a coronal sections of the medulla from the same rat, which is representative of the groups [Kynurenic acid + PPADS ($n = 13$) and saline ($n = 4$)], showing the sites of bilateral microinjections in the intermediate and caudal commissural NTS. Panels B and D are schematic coronal sections of the medulla of the rat, summarizing the areas overlapped by microinjections in the intermediate and caudal commissural NTS, respectively. Panel E is a photomicrograph of a coronal section of one rat, representative of the group used for the respiratory responses ($n = 7$), showing the sites of bilateral microinjections in the caudal commissural NTS. Panel F is a schematic coronal section of the medulla of the rat summarizing the areas

overlapped by microinjections in the caudal commissural NTS.

II - Working heart brainstem preparation

PPADS antagonism of the cardiovascular and respiratory responses to microinjection of α,β -methylene ATP into the caudal commissural NTS in the WHBP

Figure 8 shows that the microinjection of α,β -methylene ATP (0.4 nmol/20 nL) into the caudal commissural NTS produced increase in the tSNA and bradycardia, which were significantly reduced at 2 ($10\pm 2\%$ and -10 ± 9 bpm), 10 ($6\pm 2\%$ and -15 ± 4 bpm) and 30 minutes ($13\pm 3\%$ and -31 ± 3 bpm) after microinjection of PPADS (0.16 nmol/20 nL) into the same site in the caudal commissural NTS in relation to control ($30\pm\%$ and -76 ± 29 bpm, $P<0.05$, $n=7$). In addition, the microinjection of α,β -methylene ATP into the caudal commissural NTS produced reduction in the frequency of the phrenic nerve discharge (-0.23 ± 0.03 Hz) which was attenuated at 2 (-0.11 ± 0.04 Hz), 10 (-0.06 ± 0.05 Hz) and 30 (-0.13 ± 0.05 Hz, $P<0.05$, $n=7$) minutes after PPADS. This figure also shows that the antagonism produced by PPADS was reversible considering that the magnitude of the autonomic and respiratory responses to α,β -methylene ATP were back to control levels 45 min later.

Chemoreflex activation before and after microinjection of PPADS into the caudal commissural NTS in the WHBP

Figure 9 shows the tracings of one WHBP representative of the group in which the chemoreflex activation was performed before and 2, 10, 30 and 45 min after bilateral microinjection of PPADS (0.16 mmol/20 nL) into the caudal commissural NTS. It is possible to verify that the increase in the sympathoexcitatory response [tSNA (integrated and raw data)], bradycardia (HR) and the increase in the frequency of the phrenic nerve activity (\uparrow PNA) were not altered after the antagonism. In addition, the microinjection of PPADS into the caudal commissural NTS did not affect the perfusion pressure (PP) through the experiment. Figure 10 summarizes the

changes in the tSNA, HR and PNA in response to chemoreflex activation before and 2, 10, 30 and 45 minutes after microinjection of PPADS into the NTS and the data show that the antagonism of P2X receptors in the caudal commissural NTS produced no effect on the autonomic responses to chemoreflex activation in the WHBP ($P>0.05$, $n=8$).

Chemoreflex activation before and after microinjection of both KYN and PPADS into the caudal commissural NTS in the WHBP

Figure 11 shows the tracings of one WHBP, representative of the group, in which the chemoreflex activation was performed before and 2, 10, 30 and 60 minutes after sequential bilateral microinjection of KYN (2 nmol/20 nL) and PPADS (0.16 nmol/20 nL) into the caudal commissural NTS. After the sequential antagonism there was a clear reduction of the sympathoexcitatory response to chemoreflex activation at 2, 10 and 30 min and the bradycardic response was abolished at 2 and 10 min after the antagonisms. On the other hand, the increase in the frequency of the phrenic nerve activity was not affected by this sequential antagonism. Although the increase in the frequency of the PNA was not affected by the double antagonism, there was a clear qualitative reduction in the amplitude of the baseline PNA after the microinjection of KYN into the NTS. The qualitative decrease in the amplitude of the baseline PNA after KYN into the caudal commissural NTS in the WHBP was previously reported in another study from our laboratory (Braga and Machado, 2006). It is also important to note that the perfusion pressure did not change though the experiment after the double antagonism into the caudal commissural NTS, illustrating that in the WHBP, different of the awake rat the microinjection of KYN into the NTS did not produce increase in the perfusion pressure. Figure 12 summarizes the changes in the tSNA, HR and PNA in response to chemoreflex activation before and 2, 10, 30 and 60 min after sequential microinjection of both KYN and PPADS. At 2 ($17\pm 1\%$), 10 ($18\pm 2\%$) and 30 minutes ($31\pm 2\%$) after the microinjections of antagonists into the NTS

the increase in the tSNA in response to chemoreflex activation was reduced and statistically different in relation to control (52 ± 2 %, $P < 0.05$, $n = 9$). In the same way, at 2 (-21 ± 3 bpm), 10 (-17 ± 2 bpm) and 30 min (-37 ± 8 bpm) after the microinjections of antagonists into the NTS the bradycardic response to chemoreflex activation was attenuated and statistically different in relation to control (-151 ± 17 bpm, $P < 0.05$, $n = 9$). Sixty minutes after the sequential antagonism, the increase in the tSNA and bradycardic responses were back to control levels. Regarding PNA, the antagonism of the ionotropic glutamatergic and P2 receptors did not affect the increase in the frequency of the phrenic nerve activity in response to chemoreflex activation.

Histology

Figure 13 summarizes the histological profile of rats used in the experimental protocols in the WHBP. Panel A shows a photomicrograph of a coronal section of the medulla from a rat, which is representative of the group, showing the sites of bilateral microinjections in the caudal commissural NTS. Panel B shows a schematic coronal section of the medulla of the rat, adapted from the atlas of Paxinos and Watson (1998), summarizing the centers of bilateral microinjections of KYN and PPADS in the caudal commissural NTS ($n = 9$).

DISCUSSION

Methodological considerations

In the present study we used two unanesthetized experimental models, which allowed us to obtain a body of evidence documenting that the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex at the NTS level involves both L-glutamate and ATP. The first experimental model used is the classical physiological approach of conscious freely moving rats, in which we were able to perform microinjections into the NTS and record the cardiovascular changes in response to chemoreflex activation. Considering that this model is free of anaesthetic influence, it should be the natural choice for this kind of experiment. However, the changes in the baseline mean arterial

pressure due to antagonism of excitatory amino acid receptors in the NTS also involved with other cardiovascular reflexes, such as the baroreflex, preclude a clear evaluation of the autonomic response after antagonisms in the NTS. Although the sympathetic nerve recording in awake rats is feasible, it is not a simple task in the experimental protocols developed in the present study because the rats must combine a good nerve recording with a positive histology. Thus, it is required a large number of animals in order to obtain a reasonable number of experiments with both approaches working properly. Therefore, the working heart-brainstem preparation (WHBP), the second experimental model used in the present study, combines several advantages of the awake rat with those typical of decerebrated preparations, such as the absence of anesthetic as well as the relatively easy access to sympathetic nerve recording and a visual approach to microinjections into the NTS. In addition, the cardiovascular reflexes are preserved in the WHBP and the perfusion pressure is not affected by the manipulation of the NTS or by chemoreflex activation, as observed in the figures 9 and 11. Taken together, these advantages allow a high index of positive histology associated with very good sympathetic and phrenic nerve recordings. Considering that the data obtained in both experimental models were similar, our findings are consistent.

Autonomic responses to chemoreflex activation in awake rats and in the WHBP

Our results provide the first evidence for the involvement of both P2 and ionotropic glutamate receptors in the commissural NTS for mediating the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in both awake rats and in the WHBP. This study steps forward from numerous previous failed attempts in both awake rats as well as in the *in situ* WHBP, in which we were unable to block the pressor/sympathoexcitatory response to chemoreflex activation by using microinjections of antagonists of EAA receptors (Haibara et al., 1995, 1999; Machado and Bonagamba, 2005; Braga and Machado,

2006), GABA (Callera et al., 1997, 1999), glycine (Pimentel et al., 2003), antagonist of adenosine (de Paula et al., 2001) and substance P (Zhang et al., 2000). Bilateral microinjection of kynurenic acid into the NTS produced only a mild reduction in the magnitude of the pressor response to chemoreflex activation, which was apparently due to the large increase in baseline MAP (Haibara et al., 1999). In a recent study, we verified that an infusion of sodium nitroprusside (i.v.) in order to normalize the increase in mean arterial pressure caused by kynurenic acid showed that the magnitude of the pressor response to chemoreflex activation was similar to the control response (Machado and Bonagamba, 2005). In agreement with these studies, Braga and Machado (2006) demonstrated that the sequential antagonism of both ionotropic and metabotropic glutamate receptors in the caudal commissural NTS did not affect the sympathoexcitation following peripheral chemoreceptor activation in the WHBP, suggesting that an additional neurotransmitter in the NTS may take part in mediating the sympathoexcitatory component of the chemoreflex. Considering that: a) the pattern of the pressor response to microinjection of ATP into the NTS is similar to the chemoreflex response following activation with KCN (de Paula et al., 2004), and b) both ATP and L-glutamate can interact in the central nervous system (Gu and Macdermott, 1997; de Paula et al., 2004; Shigetomi and Kato, 2004; Jin et al., 2004), the present study was based on the notion that both P2 and ionotropic glutamate receptors in the NTS participate in the expression of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex. Our findings showing that the pressor response to chemoreflex activation was almost abolished by sequential microinjection of PPADS and KYN into the intermediate and caudal commissural NTS in awake rats and also that the sympathoexcitatory response to chemoreflex activation was abolished in the WHBP by this double antagonism strongly supports the hypothesis that these two neurotransmitters play a pivotal role in the processing of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex at the NTS level.

With respect to the parasympathetic component of the peripheral chemoreflex it seems to be mediated at the NTS level mainly by L-glutamate and NMDA receptors because in previous studies we verified that the bradycardic response was blocked in a dose-dependent manner by AP-5, a selective NMDA receptors antagonist as well as by microinjection of kynurenic acid, a non-selective excitatory amino acid receptor antagonists, microinjected into the intermediate NTS in awake rats (Haibara et al., 1995, 1999; Machado and Bonagamba, 2005). We have also evidence that P2 receptors participate in the modulation of the parasympathetic component of the chemoreflex because microinjection of PPADS or suramin into the both intermediate and caudal commissural NTS of the WHBP attenuated the bradycardic response to chemoreflex activation (Paton et al., 2002). In the present experiments performed in the WHBP, microinjections of PPADS were restricted and confirmed histologically to be in the caudal commissural NTS and no major changes were observed in the bradycardic response to chemoreflex activation, indicating that the efficacy of PPADS on the bradycardic component is dependent of the combined antagonism of P2 receptors in both the intermediate and caudal commissural NTS.

There is experimental evidence about the neuronal mechanisms by which ATP acts on P2 receptors in the NTS but the involvement of these mechanisms in the neurotransmission of the autonomic and respiratory components of the chemoreflex is not yet know. In an intracellular study performed on unidentified NTS neurons *in vitro*, Kato and Shigetomi (2001) showed that ATP increased the spontaneous post-synaptic currents, which were blocked by PPADS indicating that this excitatory effect was mediated by P2X receptors. More recently, Jin et al. (2004) showed that P2 receptor activation with ATP or α,β -methylene ATP in the glutamatergic terminals in the NTS facilitates pre-synaptic glutamate release and studies by Shigetomi and Kato (2004) documented that activation of pre-synaptic P2X receptors with α,β -methylene ATP in the

NTS triggered Ca^{2+} -dependent glutamate release. Moreover, studies by Gu and Macdermott (1997) showed that P2X receptors in cultured spinal cord neurons are also located pre-synaptically on axon terminals of intrinsic excitatory neurons and may facilitate the release of L-glutamate. Thus, one possibility is that ATP acting pre-synaptically, induces glutamate release in the NTS to mediate the chemoreflex pressor response. Since ATP can be co-released with other neurotransmitters (Burnstock, 1986), it is possible that ATP and L-glutamate are involved in the processing of both the parasympathetic and sympathetic components of the chemoreflex. This suggestion is based on findings from the present study whereby PPADS and KYN almost abolished the pressor response and the sympathoexcitation while in a previous study we verified that KYN alone (Machado and Bonagamba, 2005; Braga and Machado, 2006) or PPADS alone (present study) microinjected into the caudal commissural NTS did not change the pressor response as well as the sympathoexcitation to chemoreflex activation.

With respect to the possibility that the effect of P2 receptors is specific to the synaptic processing of the chemoreflex within the NTS, we have previous evidence that P2 antagonist selectively blocked the peripheral chemoreceptor evoked excitatory input to a NTS neuron but not a convergent excitatory synaptic response evoked by stimulation of pharyngoesophageal receptors (Paton et al, 2002). On the other hand, studies by Scislo et al. (1998) showed that microinjection of suramin into the NTS abolished the baroreflex regulation of heart rate. Thus, it is possible that P2 receptors in the NTS are not restricted to the neurotransmission of the chemoreflex but they may modulate the parasympathetic component of the baroreflex as well, suggesting a degree of organization within the NTS that independently modulates the autonomic components of these reflexes. It is also important to emphasize that it is unlikely that the chemoreflex afferents are the only source of fibers in NTS that can release ATP since recent studies by Dale et al. (2002) showed that ATP is released within the NTS during the defense response evoked by hypothalamic stimulation.

Respiratory responses to chemoreflex activation in awake and in the WHBP

Increase in ventilation to chemoreflex activation is the most important compensatory mechanism to recover the normoxia and to allow the survival under stressful condition of hypoxia. Therefore, it is reasonable to consider that the processing of this component of the chemoreflex afferents is not restricted to one neurotransmitter or a specific region of the brainstem. The data of the present study obtained in awake rats as well as in the WHBP show that the combined antagonism of EAA and P2 receptors in the caudal commissural NTS produced no significant changes in the tachypneic response to chemoreflex activation in awake rats (respiratory frequency) or in the WHBP (increase in the frequency of phrenic nerve activity). The data show that in WHBP (figure 11) the combined antagonism of EEA and P2 receptors, in spite of absence of changes in the increase in the frequency of the phrenic nerve activity, produced an apparent reduction in the amplitude of the integrated activity of this nerve. However, no changes were observed in the tidal volume of awake rats after the double antagonism. We might suggest that a) L-glutamate and ATP may not be the neurotransmitters involved in the processing of the ventilatory responses of the chemoreflex in the caudal commissural NTS; and b) the caudal commissural NTS, in spite of its involvement in the processing of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex, may not be the site of the NTS in which occur the synapses that mediates the respiratory component of the chemoreflex. Therefore, the data of the present study showing that the respiratory response to chemoreflex activation was not altered by the antagonism of EAA and P2 receptors in the caudal commissural NTS requires further studies to evaluate the involvement of other NTS sub regions and possibly other combinations of transmitters in the processing of the respiratory component of the chemoreflex.

Final remarks

Our data showing the involvement of both P2 and ionotropic glutamate receptors in the neurotransmission of the chemoreflex within the NTS is consistent with the concept presented in several recent studies suggesting that ATP appears linked to chemoreception in general. This is based on the findings that ATP plays a transduction role in both central chemoreception in the rostral ventrolateral medulla as well as in peripheral chemoreception at the level of the carotid body glomus cells (Spyer et al., 2004; Zhang and Nurse, 2004; Gourine et al., 2005).

The data of the present study shows that P2 and glutamate-sensitive mechanisms in the commissural NTS play an essential role in processing the cardiovascular responses to chemoreflex activation. Indeed, they appear to be particularly critical for the processing of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex. Therefore, our hypothesis that NTS neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex involves neurotransmitters other than only L-glutamate seems to hold. Since our data indicate that antagonism of ionotropic glutamate and P2 receptors in the intermediate and caudal commissural NTS produces a significant reduction in both the bradycardic and the sympathoexcitatory/pressor response to peripheral chemoreflex activation, we conclude that these receptors play a key role in the complex neurochemical mechanisms involved in the mediation of the pattern of cardiovascular responses to chemoreflex activation. The data of the present study also indicate that one of these systems (glutamatergic or purinergic) is enough to keep this emergency reflex active characterizing a redundant process on the neuronal pathways of the chemoreflex at the NTS level. Further, our findings may now provide novel clues for designing pharmacological therapy for reducing sympathoexcitation during condition of heightened peripheral chemoreflex afferent drive such as obstructive sleep apnea, heart failure and hypertension.

With respect to the ventilation the data of the present study shows that the increase in the respiratory frequency in response to chemoreflex activation was not altered by the antagonism of ionotropic glutamate and P2 receptors in awake as well in the WHBP suggesting that another neurotransmitters may participate on the processing of this critical response and further experiments in unanesthetized models are required to clarify the neurotransmission of the ventilatory component of the chemoreflex at the caudal commissural NTS level.

Acknowledgements

The authors thank Rubens F. Melo for histological technical assistance. In Brazil, these studies were funded by FAPESP (2001/11190-8, 2004/03285-7) and CNPQ (522150-95-0). In the UK, JFRP was in receipt of a Royal Society Wolfson Research Merit Award and supported by the British Heart Foundation.

REFERENCES

- Accorsi-Mendonça D, Leão RX, Aguiar JF, Varanda WA and Machado BH (2006). Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of solitary tract of rat brain slices. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Epub August 31, 2006.
- Antunes VR, Braga VA and Machado BH (2005a) Autonomic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate or caudal nucleus tractus solitarius in the working heart-brainstem preparation of the rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **32**, 467–472.
- Antunes VR, Bonagamba LGH and Machado BH (2005b). Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal commissural NTS of awake rats. *Brain Research* **1032**, 85–93.
- Barraco RA, O'Leary DS, Ergene E and Scislo TJ (1996). Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits

- specific regional vascular response patterns. *J Auton Nerv Syst* **59**, 113-124.
- Boscan P and Paton JFR (2001). Nociceptive afferents selectively modulate the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex via actions within the solitary tract nucleus. *Neuroscience*, **110**, 319-328.
- Braga VA, Antunes VR and Machado BH (2006). Autonomic and respiratory responses to microinjection of L-glutamate into the commissural subnucleus of the NTS in the working heart-brainstem preparation of the rat. *Brain Res* **1093**, 150-60.
- Braga VA and Machado BH (2006). Chemoreflex sympathoexcitation is not altered by the antagonism of glutamate receptors in the commissural NTS in the working heart-brainstem preparation of rat. *Exp Physiol* **91**, 551-559.
- Burnstock G (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* **24**, 509-581.
- Burnstock G (1986). Purines and cotransmitters in adrenergic and cholinergic neurons. *Prog Brain Res* **68**, 193-203.
- Callera JC, Sévoz C, Laguzzi R and Machado B.H. (1997). Microinjection of serotonin₃ receptor agonist into the NTS of unanesthetized rats inhibits the cardiovascular component of the baro- and chemoreflex. *J Auton Nerv Syst* **63**, 127-136.
- Callera JC, Bonagamba LGH, Nosjean A, Laguzzi R and Machado BH (1999). Activation of GABA_A but not GABA_B receptors in the NTS blocked bradycardia of chemoreflex in awake rats. *Am J Physiol* **276**, H1902-1910.
- Chitravanshi VC, Kachroo A and Sapru HN (1994). A midline area in the nucleus commissuralis of NTS mediates the phrenic nerve responses to carotid chemoreceptor stimulation. *Brain Research* **662**, 127-133.
- Chitravanshi VC and Sapru HN (1995). Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **268**, R851-R858.
- Colombari E, Bonagamba LGH and Machado BH (1994). Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **266**, R730-738.
- Colombari E, Bonagamba LGH and Machado, BH (1997). NMDA receptor antagonist blocks the bradycardic but not the pressor response to L-glutamate microinjected into the nucleus tractus solitarius (NTS) of unanesthetized rats. *Brain Research* **749**, 209-213.
- Dale N, Gourine AV, Llaudet E, Bulmer D, Thomas T and Spyer, KM (2002). Rapid adenosine release in the nucleus tractus solitarii during defence response in rats: real-time measurement *in vivo*. *J Physiol.* **544**, 149-160.
- de Paula PM and Machado BH (2001). Antagonism of adenosine A1 receptors in the nucleus tractus solitarii do not affect the chemoreflex in awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R2072-2078.
- de Paula PM, Antunes VR, Bonagamba LGH and Machado BH (2004) Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R1164-R1171.
- Ergene E, Dunbar JC, O'Leary DS and Barraco RA (1994). Activation of P2-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius mediates depressor responses. *Neuroscience Letters* **174**, 188-192.
- Franchini KG and Krieger EM (1992). Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic denervated rat. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **262**, R677-R683.
- Franchini KG and Krieger EM (1993). Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J. Auton. Nerv. Syst.* **42**, 63-70.
- Gourine AV, Atkinson L, Deuchars J and Spyer KM (2003). Purinergic signaling in the medullary mechanisms of respiratory control

- in the rat: respiratory neurons express the P2X₂ receptor subunit. *J. Physiol.* **552**, 197-211.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N and Spyer KM (2005). ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature* **436**, 108-111.
- Gu JG and MacDermott AB (1997). Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapse. *Nature* **389**, 749-753.
- Haibara AS, Colombari E, Chianca-Jr DA, Bonagamba, LGH and Machado BH (1995). NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **269**, H1421-H1427.
- Haibara AS, Bonagamba, LGH and Machado BH (1999). Neurotransmission of the sympatho-excitatory component of chemoreflex in the nucleus tractus solitarii of unanesthetized rats. *Am. J. Physiol.* **276**, R69-R80.
- Jin Y-H, Bailey TW, Li B-Y, Schild JH and Andresen MC (2004). Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarii. *J. Neurosci.* **24**, 4709-4717.
- Kato F and Shigetomi E (2001). Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J. Physiol.* **530**, 469-486.
- Llewellyn-Smith IJ and Burnstock G (1998). Ultrastructural localization of P2X₃ receptors in rat sensory neurons. *NeuroReport* **9**, 2545-2550.
- Machado BH and Bonagamba LGH (1992). Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res* **576**, 131-138.
- Machado BH and Bonagamba LGH (2005). Antagonism of glutamate receptors in the intermediate and caudal commissural NTS of awake rats produced no changes in the hypertensive response to chemoreflex activation. *Autonom Neurosc: Basic and Clin* **117**, 25-32.
- Machado BH (2004). Chemoreflex and sympathoexcitation. In *Neural Mechanisms of Cardiovascular Regulation*, ed. Dun NJ, Machado BH and Pilowsky PM. Kluwer Academic Publishers, Norwell.
- Malan A (1973). Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and poikilotherms. *Resp Physiol* **17**, 32-44.
- Michelini LC and Bonagamba LGH (1988). Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. *Hypertension* **11**, 75-79.
- Mifflin SW (1992). Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **263**, R368-R375.
- Paton JFR (1996). A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods* **65**, 63-68.
- Paton JF, Li YW and Kasparov S (1999). Reflex response and convergence of pharyngo-esophageal and peripheral chemoreceptors in the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience* **93**, 143-54.
- Paton JFR, Deuchars J, Li Y-W and Kasparov S (2001). Properties of solitary tract neurones responding to peripheral arterial chemoreceptor. *Neuroscience* **105**, 231-248.
- Paton JFR, de Paula PM, Spyer KM, Machado BH and Boscan P (2002). Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarii for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex. *J Physiol* **543**, 995-1005.
- Paxinos G, and Watson C (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Phillis JW, Scislo TJ and O'Leary DS (1997). Purines and the nucleus tractus solitarii: effects on cardiovascular and respiratory function. *Clin Exp Pharmacol and Physiol* **24**, 738-742.
- Pimentel FF, Bonagamba LGH and Machado BH (2003). Pressor response to chemoreflex activation before and after microinjection of glycine into the NTS of awake rats. *Am J Physiol* **284**, R1000-1009.

- Rong W, Gourine AV, Cockayne, DA, Xiang Z, Ford APDW, Spyer KM and Burnstock G (2003). Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J Neurosci* **23**, 11315-11321.
- Shigetomi E and Kato F. Action potential-independent release of glutamate by Ca^{2+} entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci* **24**, 3125-3135, 2004.
- Scislo TJ, Augustyniak RA, Barraco RA, Woodbury DJ and O'Leary DS (1997). Activation of P_{2X}-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius elicits differential inhibition of lumbar and renal sympathetic nerve activity. *J Auton Nerv Syst* **62**, 103-110.
- Scislo TJ, Ergene E and O'Leary DS (1998). Impaired arterial baroreflex regulation of heart rate after blockade of P2-purinoceptors in nucleus tractus solitarius. *Brain Res. Bull* **47**, 63-67.
- Scislo TJ and O'Leary DS (1998). Differential control of renal vs. adrenal sympathetic nerve activity by NTS A2a and P2x purinoceptors. *Am J Physiol* **275**, H2130-H2139.
- Spyer KM, Dale N and Gourine AV (2004). ATP is a key mediator of central and peripheral chemosensory transduction. *Exp Physiol* **89**, 53-59.
- Yao ST, Barden JA, Finkelstein DI, Bennett MR and Lawrence AJ (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* **427**, 485-507.
- Vulchanova L, Riedi MS, Shuster SJ, Buell G, Surprenant A, North RA and Elde R (1997). Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacol* **36**, 1229-1242.
- Zhang CH, Bonagamba LGH and Machado BH (2000). Blockade of NK-1 receptors in the lateral commissural nucleus tractus solitarius of awake rats had no effect on the cardiovascular responses to chemoreflex activation. *Braz J Med Biol Res* **33**, 1379-1385.
- Zhang M and Nurse CA (2004). CO₂/pH chemosensory signaling in co-cultures of rat carotid body and petrosal neurons: role of ATP and Ach. *J Neurophysiol* **92**, 3433-3445.

TABLE 1 – Baseline mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) before and after sequential microinjections of PPADS and KYN or saline and saline (vehicle) into the intermediate and caudal commissural NTS of awake rats. After sequential microinjections of antagonists of glutamate ionotropic receptors and P2 receptors into the NTS the intravenous infusion of sodium nitroprusside (SNP) was performed to normalize baseline MAP. (*) different related to the baseline before.

GROUPS	BASELINE BEFORE		BASELINE AFTER		BASELINE AFTER + SNP	
	MAP	HR	MAP	HR	MAP	HR
KYN + PPADS n=13	108±3	355±11	142±5*	352±9	107±2	362±10
SALINE + SALINE n=4	105±5	335±12	105±5	335±13	-	-

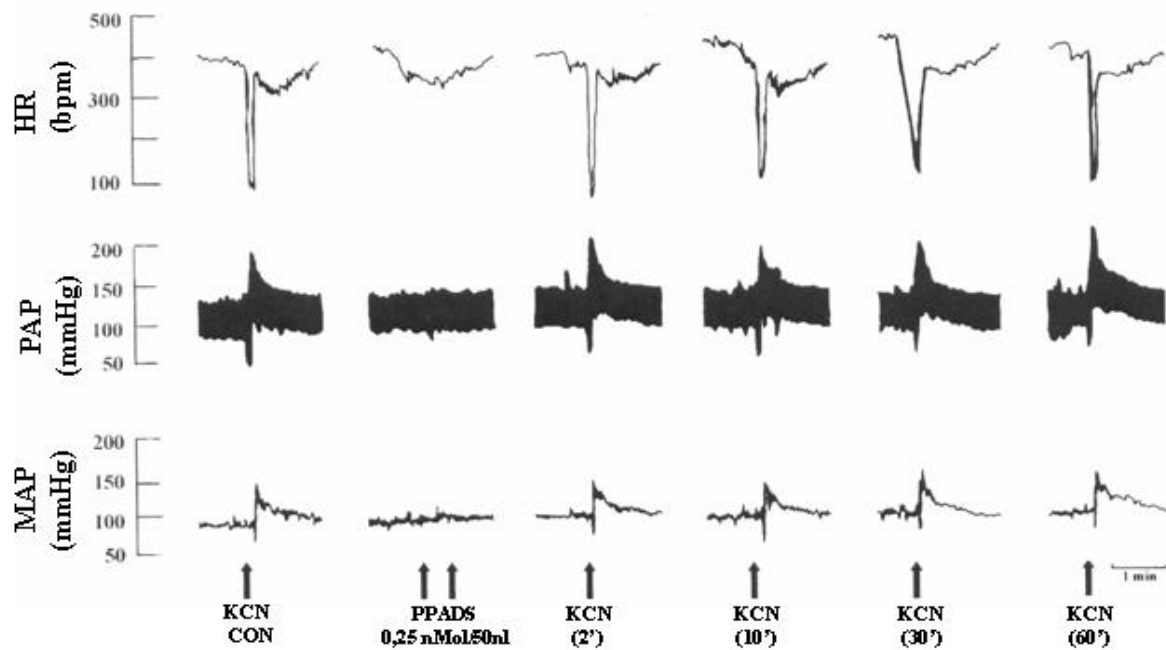


Figure 1. Typical raw data recordings of one rat, representative of the group, showing the changes in heart rate (HR), pulsatile arterial pressure (PAP) and mean arterial pressure (MAP) in response to intravenous injection of KCN ($40 \mu\text{g} \cdot 0.1 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{rat}^{-1}$ i.v.) before (control) and 2, 10, 30 and 60 min after microinjection of PPADS ($0.25 \text{ nmol}/50 \text{ nL}$) into the caudal commissural NTS indicated by the arrows.

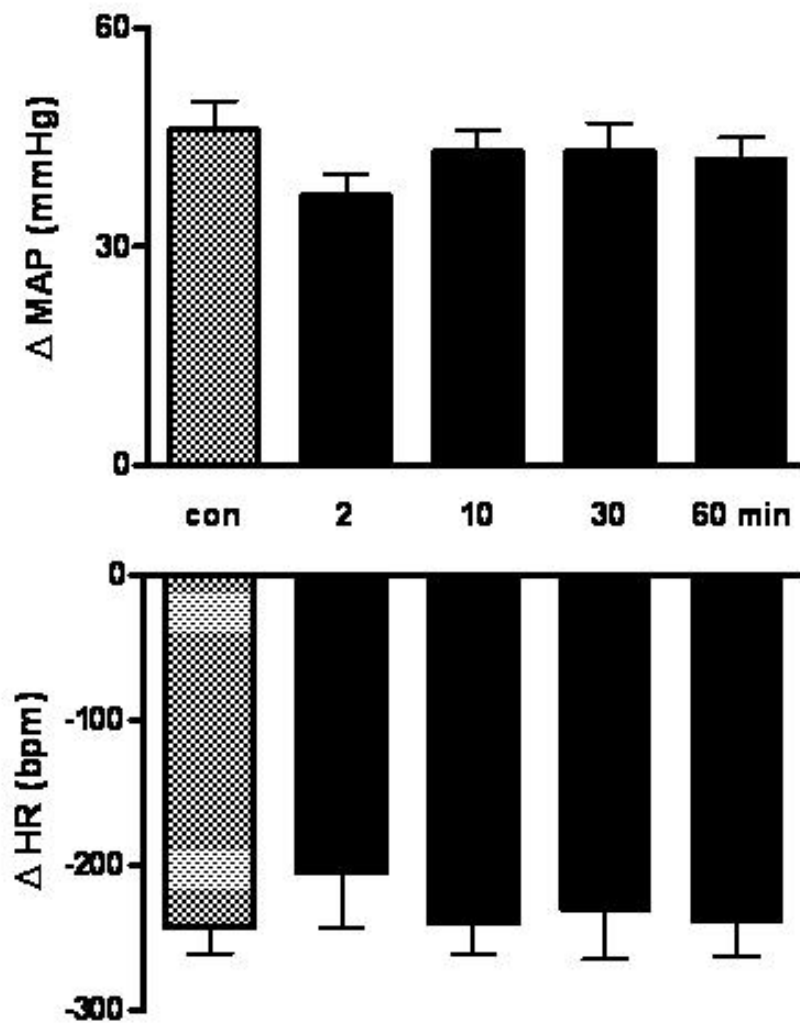


Figure 2. Changes in the arterial pressure (Δ MAP, upper panel) and heart rate (Δ HR, bottom panel) in response to peripheral chemoreflex activation with KCN ($40 \mu\text{g} \cdot 0.1 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{rat}^{-1}$) before and 2, 10, 30 and 60 min after the microinjection PPADS ($0.25 \text{ nmol}/50 \text{ nL}$) into the intermediate (bilateral) and caudal commissural NTS ($n=6$).

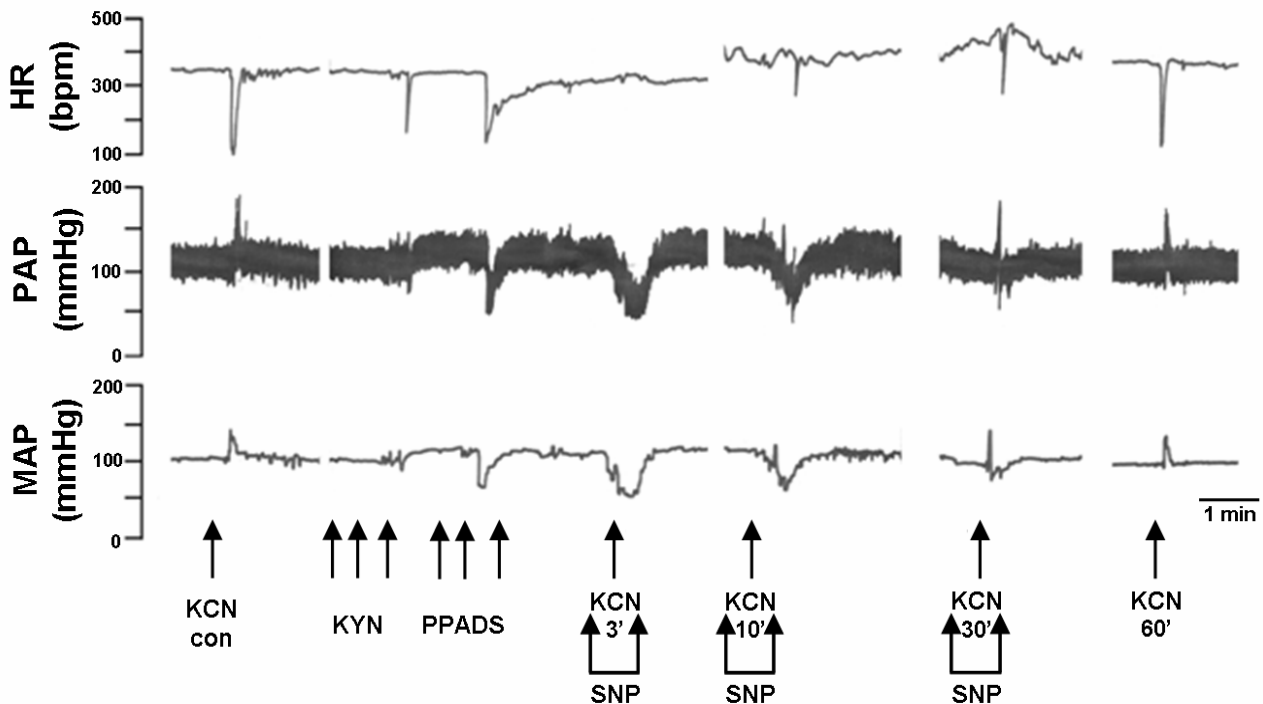


Figure 3. Typical raw data recordings of one rat, representative of the group, showing the changes in heart rate (HR), pulsatile arterial pressure (PAP) and mean arterial pressure (MAP) in response to intravenous injection of KCN ($40 \mu\text{g} \cdot 0.1 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{rat}^{-1}$ i.v.) before (control) and 3, 10, 30 and 60 min after sequential microinjection of PPADS ($0.25 \text{ nmol}/50 \text{ nL}$) and kynurenic acid (KYN, $2 \text{ nmol}/50 \text{ nL}$) into the intermediate (bilateral) and caudal commissural NTS indicated by the arrows. At the 3, 10 and 30 min after microinjection of KYN and PPADS, the peripheral chemoreflex activation was performed during the sodium nitroprusside infusion ($3 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}/\text{min}^{-1}$) to normalize the MAP.

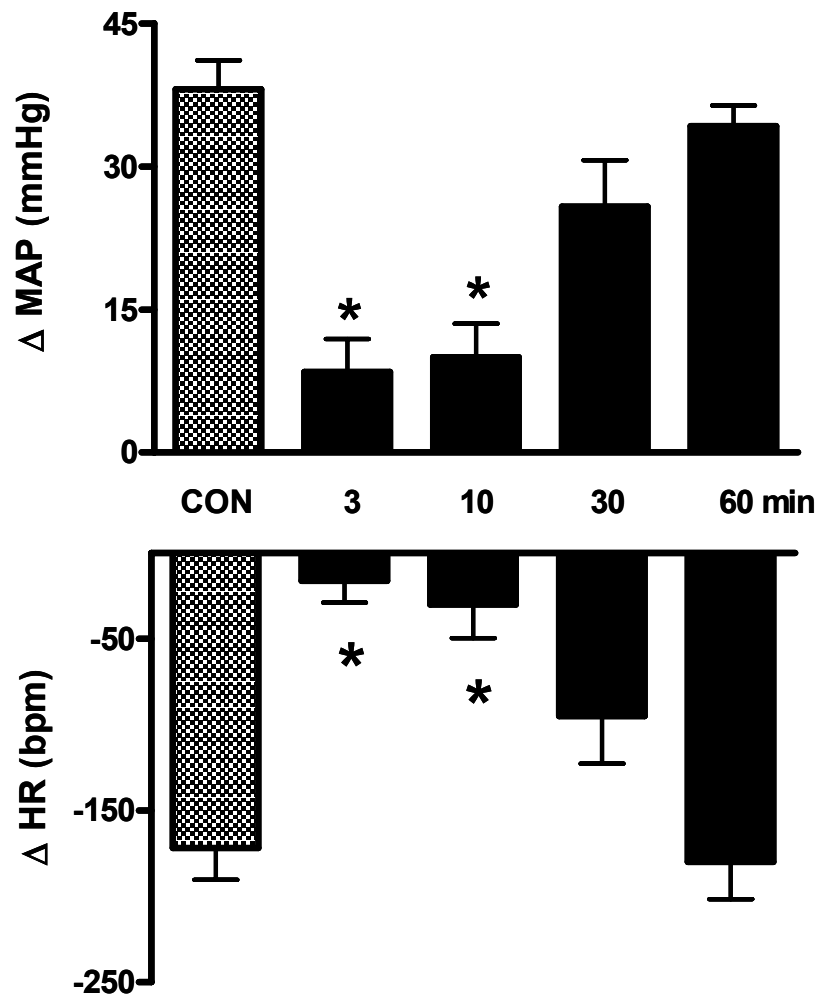


Figure 4. Changes in the arterial pressure (Δ MAP, upper panel) and heart rate (Δ HR, bottom panel) in response to peripheral chemoreflex activation with KCN ($40 \mu\text{g} \cdot 0.1 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{rat}^{-1}$) before and 3, 10, 30 and 60 min after sequential microinjection of PPADS ($0.25 \text{ nmol}/50 \text{ nL}$) and KYN ($2.0 \text{ nmol}/50 \text{ nL}$) into the intermediate (bilateral) and caudal commissural NTS combined with intravenous infusion of sodium nitroprusside [3, 10 and 30 min ($n=13$)]. *Significantly different in relation to the control response ($p<0.05$).

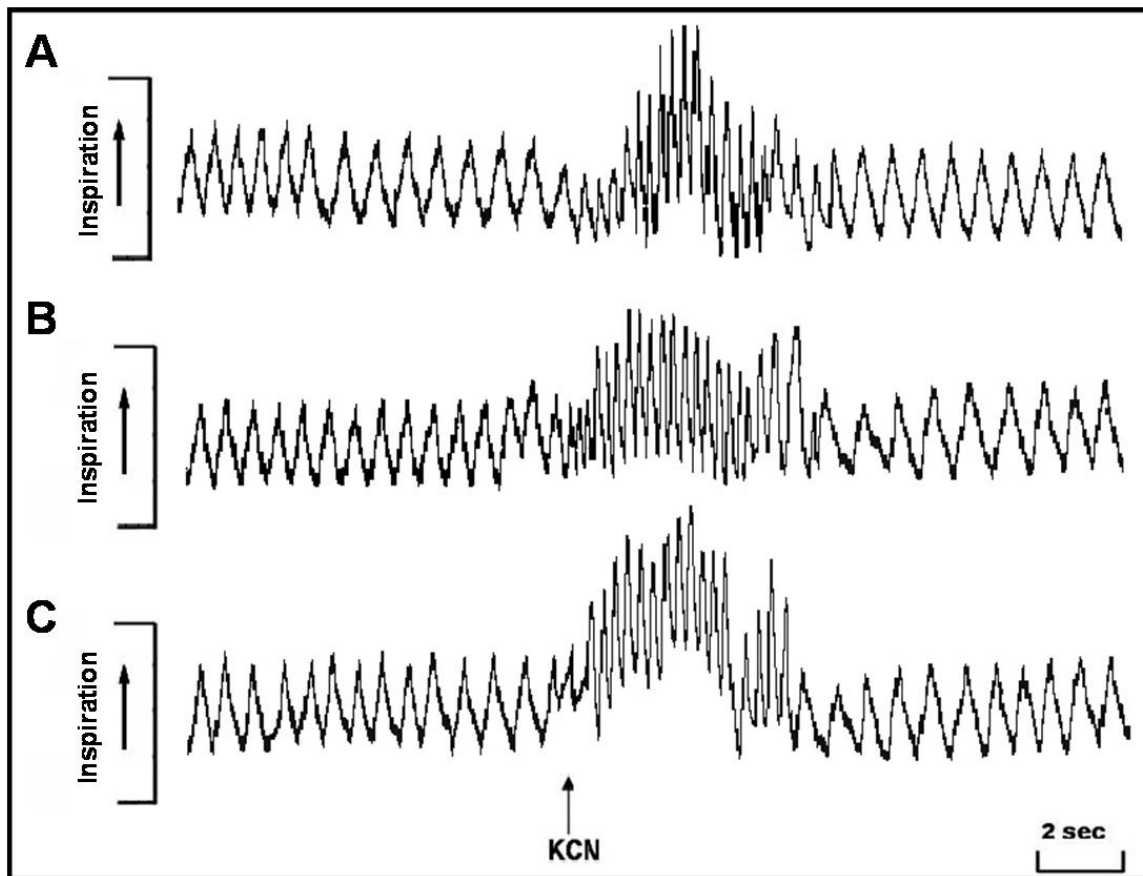


Figure 5. Typical raw data recordings of one rat, representative of the group, showing the changes in respiratory frequency (RF) in response to intravenous injection of KCN ($40 \mu\text{g} \cdot 0.1 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{rat}^{-1}$ i.v., indicated by arrow) before (control, panel A) and 2 (panel B) and 5 min (panel C) after sequential microinjection PPADS ($0.25 \text{ nmol}/50 \text{ nL}$) and kynurenic acid (KYN, $2 \text{ nmol}/50 \text{ nL}$) into the caudal commissural NTS bilaterally.

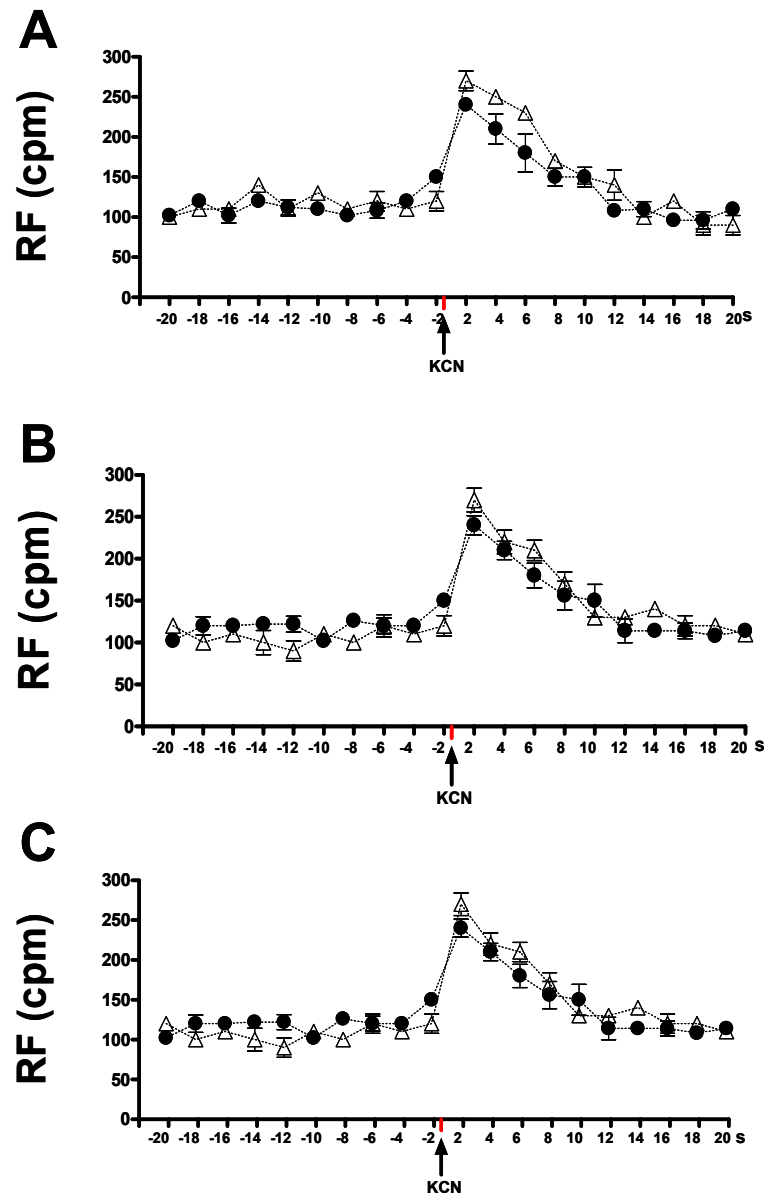


Figure 6. Changes in the respiratory frequency [RF, cycles per minute (cpm)] in response to chemoreflex activation with KCN ($40 \mu\text{g} \cdot 0.1 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{rat}^{-1}$ i.v., indicated by arrows) before (control, panel A) and 2 (panel B) and 5 min (panel C) after sequential microinjection of PPADS ($0.25 \text{ nmol}/50 \text{ nL}$) and KYN ($2.0 \text{ nmol}/50 \text{ nL}$, black circles) into caudal commissural NTS bilaterally ($n=7$) or after bilateral microinjection of the vehicle [white triangles, (saline, $n=6$)]. The time scale in the X axis corresponds to the 20 sec before and 20 sec after chemoreflex activation with KCN and the values represent the average of respiratory frequency every 2 seconds.

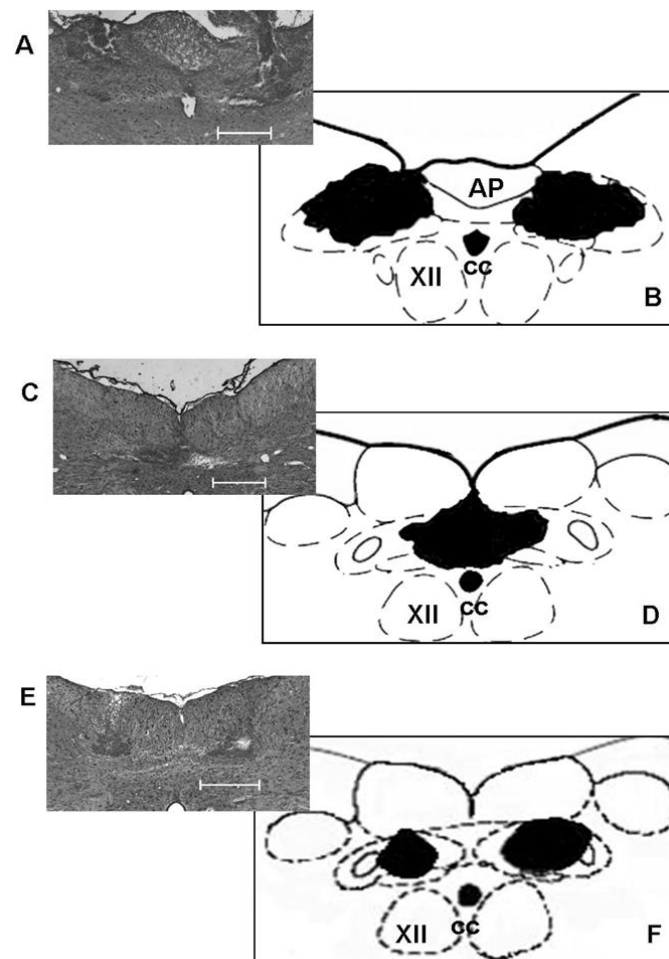


Figure 7. Panels A and C are photomicrographs of coronal sections of the brainstem of one rat representative of the group that received three guide cannulae for bilateral microinjections in the intermediated NTS (panel A) and a medial microinjection in the caudal NTS (panel C) and were used in the protocols for cardiovascular responses to chemoreflex activation before and after microinjections of kynurenic acid and PPADS (n=13) or vehicle (saline, n=4). Panels E is photomicrographs of coronal sections of the brainstem of one rat representative of the group that received two guide cannulae for bilateral microinjections in the caudal NTS and were used in the protocols for respiratory response to chemoreflex activation before and after microinjections of kynurenic acid and PPADS (n=7). Panel B is a schematic drawing summarizing the areas affected by microinjections in the intermediate commissural NTS (n=17). Panel D is a schematic coronal drawing summarizing the microinjected regions in the caudal commissural NTS (n=17). Panel F is a schematic drawing summarizing the areas affected by bilateral microinjections of kynurenic acid and PPADS (n=7) or saline (n=6) in the caudal commissural NTS. Abbreviations: AP, area postrema; CC, central canal; XII, hypoglossal nuclei. The scale bars correspond to 500 μ m. The schematic drawings of the coronal section were adapted from the atlas of Paxinos and Watson (1998).

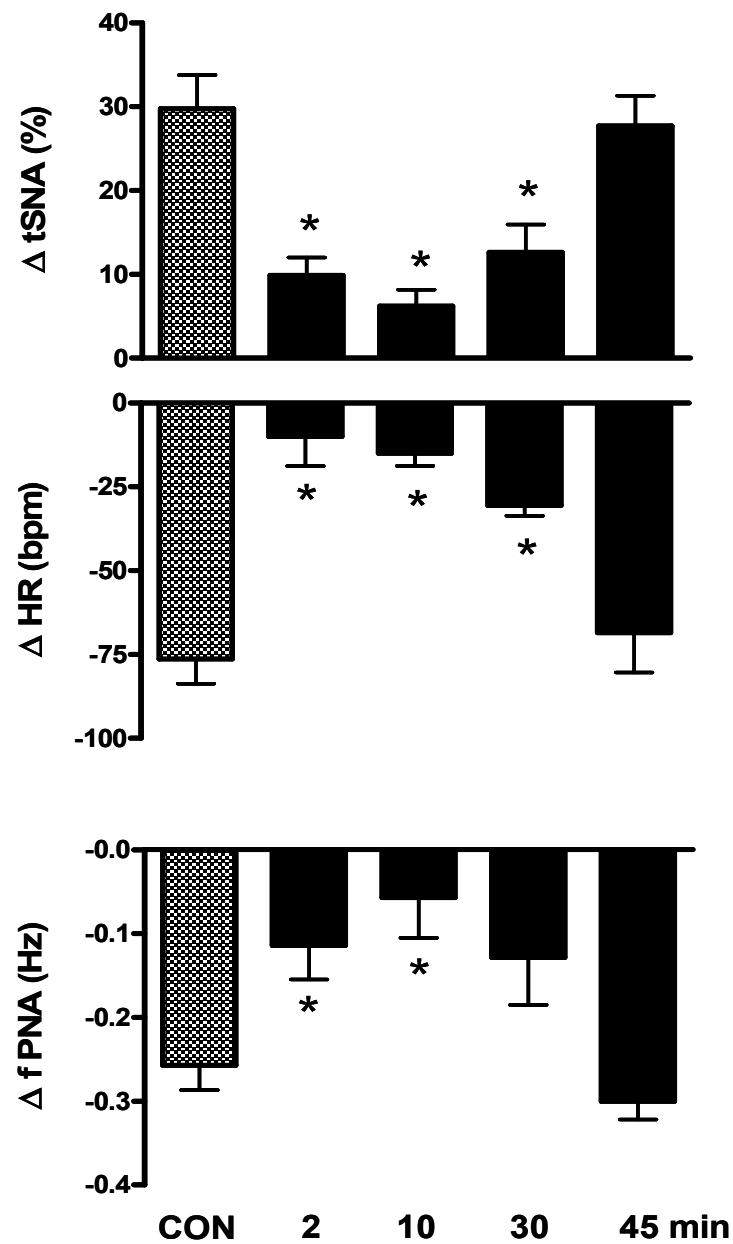


Figure 8. Changes in the thoracic sympathetic nerve activity ($\Delta tSNA$), heart rate (ΔHR) and frequency of phrenic nerve activity ($\Delta fPNA$) in response to microinjection of α, β -methylene adenosine 5'-triphosphate (α, β -methylene ATP, 0.4 nmol/ 20nL) before (control) and 2, 10, 30 and 45 min after microinjection of PPADS (0.16 nmol/20 nL) into the caudal commissural NTS of the WHBP (n=7). *Significantly different in relation to the control response ($P < 0.05$).

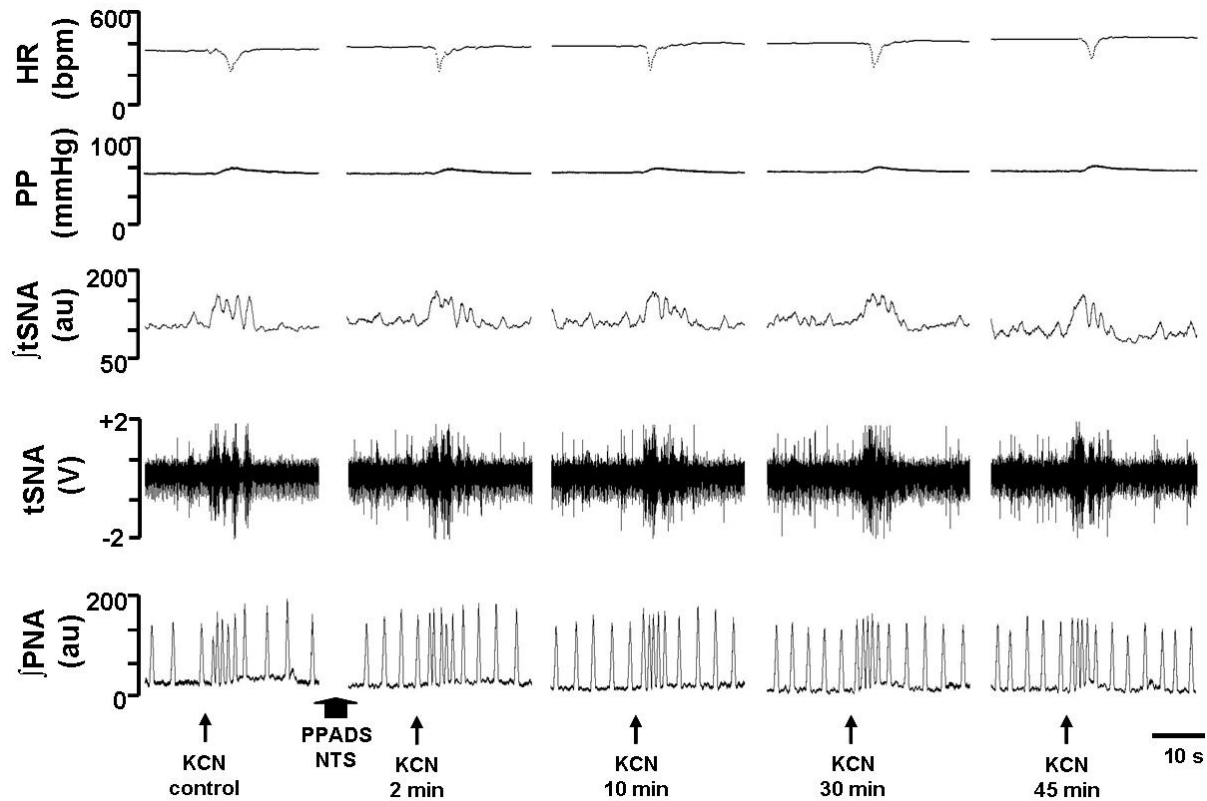


Figure 9. Typical tracings of one WHBP, representative of the group, showing the changes in the heart rate (HR), perfusion pressure (PP), integrated thoracic sympathetic nerve activity (\int tSNA), raw data of the thoracic sympathetic nerve activity (tSNA) and integrated phrenic nerve activity (\int PNA) in response to injection of KCN (0.05 %; 0.05 ml⁻¹ WHBP⁻¹ in the perfusion system) before (control) and 2, 10, 30 and 45 min after bilateral microinjection of PPADS (0.16 nmol/20 nL) into the caudal commissural NTS indicated by the arrows.

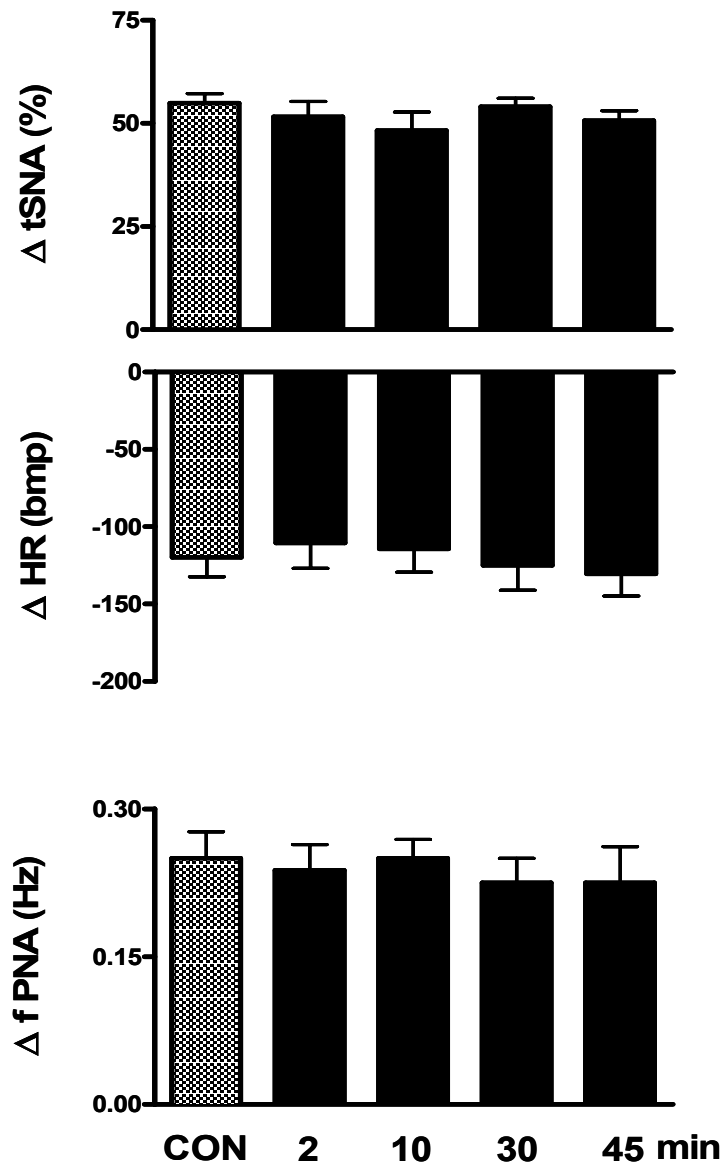


Figure 10. Changes in the thoracic sympathetic nerve activity ($\Delta tSNA$), heart rate (ΔHR) and frequency of phrenic nerve activity ($\Delta fPNA$) in response to peripheral chemoreflex activation with KCN (0.05 %, 0.05 ml⁻¹, WHBP⁻¹ in the perfusion system) before and 2, 10, 30 and 45 min after the microinjection of PPADS (0.16 nmol/20 nL) into the caudal commissural NTS (n=8).

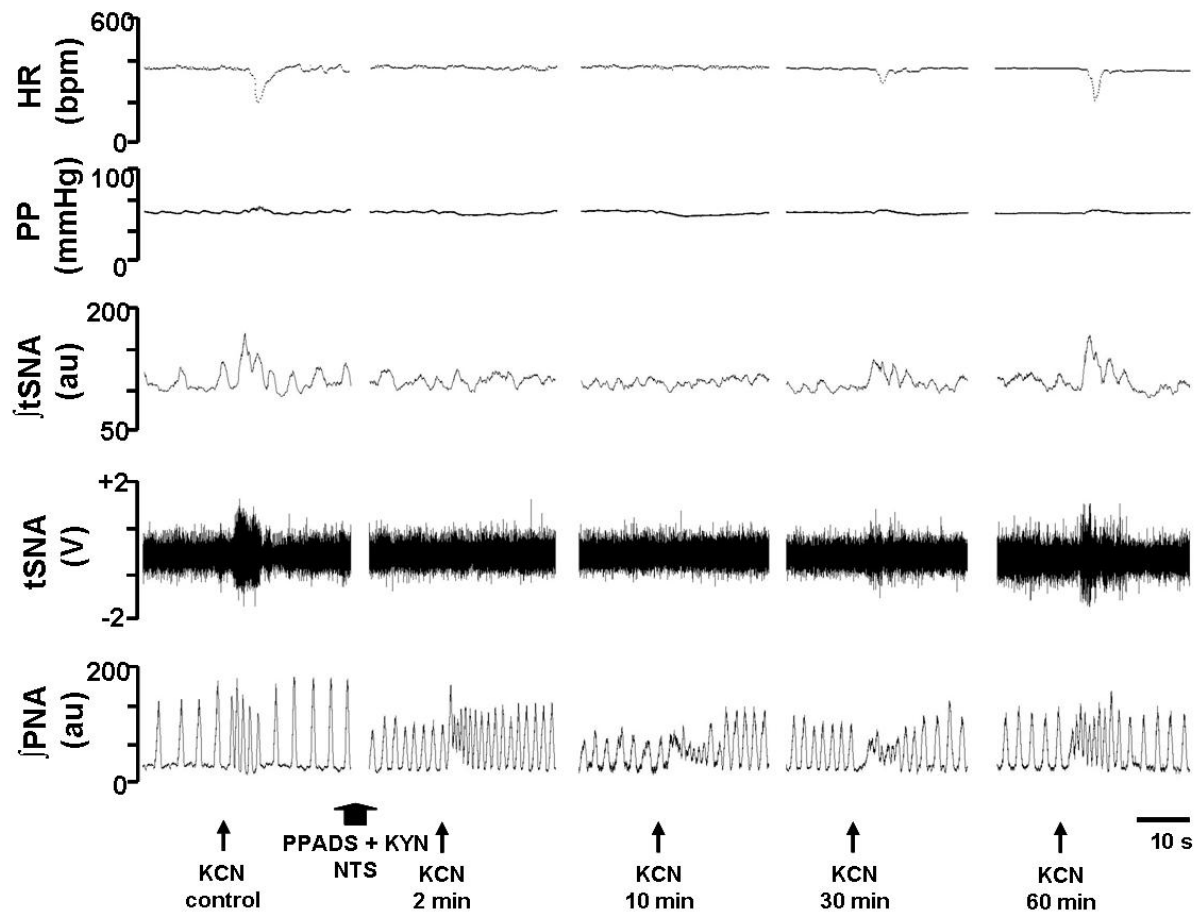


Figure 11. Typical tracings of one WHBP, representative of the group, showing the changes in the heart rate (HR), perfusion pressure (PP), integrated thoracic sympathetic nerve activity (\int tSNA) and the raw data of the thoracic sympathetic nerve activity (tSNA) and integrated phrenic nerve activity (\int PNA) in response to injection of KCN (0.05 % 0.05 ml⁻¹ WHBP⁻¹ in the perfusion system) before (control) and 2, 10, 30 and 60 min after sequential bilateral microinjection of KYN (2.0 nmol/20 nL) and PPADS (0.16 nmol/20 nL) into the caudal commissural NTS indicated by the arrows.

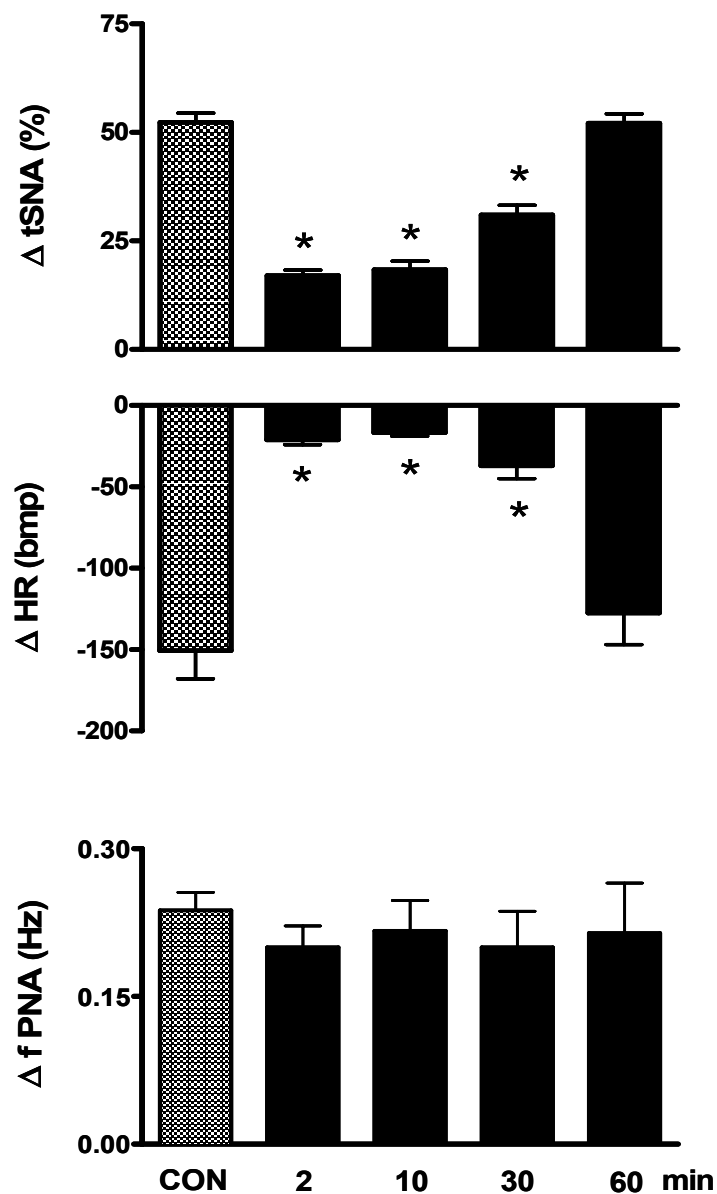


Figure 12. Changes in the thoracic sympathetic nerve activity ($\Delta tSNA$), heart rate (ΔHR) and frequency of phrenic nerve activity ($\Delta fPNA$) in response to peripheral chemoreflex activation with KCN (0.05 %, 0.05 ml⁻¹, WHBP⁻¹ in the perfusion system) before and 2, 10, 30 and 60 min after the sequential bilateral microinjection of KYN (2.0 nmol/20 nL) and PPADS (0.16 nmol/20 nL) into the caudal commissural NTS (n=9). *Significantly different in relation to the control response ($P < 0.05$).

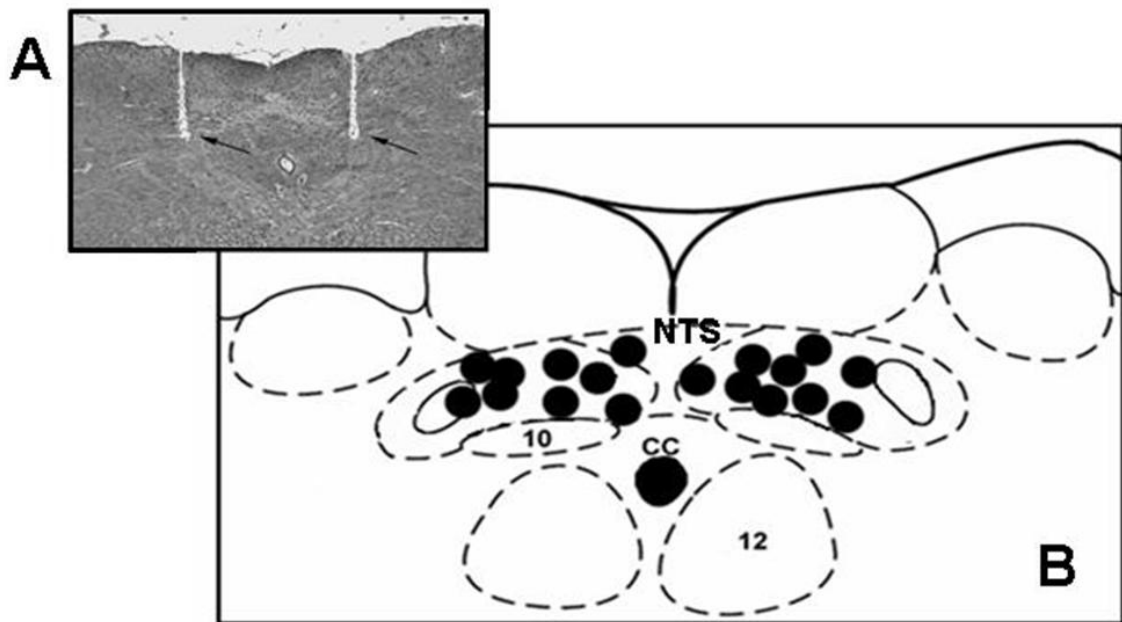


Figure 13. Panel A is a photomicrograph of a coronal section of the brainstem of one rat used in the WHBP protocols, representative of the group, showing the sites of bilateral microinjections in the caudal commissural NTS. Panel B is a schematic drawing summarizing the areas affected by microinjections in the caudal commissural NTS which received the sequential microinjection of KYN and PPADS (n=9). Abbreviations: CC, central canal; 10, dorsal motor nucleus of the vagus; 12, hypoglossal nucleus. The scale bars corresponds to 500 μ m. The schematic drawings of the coronal section were adapted from the atlas of Paxinos and Watson (1998).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)