UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

LUDMILA LIMA SILVEIRA

Envolvimento do processo inflamatório nas alterações observadas na neurotransmissão glutamatérgica no núcleo do trato solitário de ratos submetidos à hipóxia mantida

RIBEIRÃO PRETO-SP
2018

LUDMILA LIMA SILVEIRA

Envolvimento do processo inflamatório nas alterações observadas na neurotransmissão glutamatérgica no núcleo do trato solitário de ratos submetidos à hipóxia mantida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito H. Machado

RIBEIRÃO PRETO-SP

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Lima-Silveira, Ludmila.

Envolvimento do processo inflamatório nas alterações observadas na neurotransmissão glutamatérgica no núcleo do trato solitário de ratos submetidos à hipóxia mantida.

P 160.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Machado, BHM.

1. Hipóxia. 2. Núcleo do trato solitário. 3. Inflamação. 4.
Neurotransmissão.

FICHA DE APROVAÇÃO

Aluna: Ludmila Lima Silveira

Título: Envolvimento do processo inflamatório nas alterações observadas na neurotransmissão glutamatérgica no núcleo do trato solitário de ratos submetidos à hipóxia mantida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Banca Examinadora

Prof. Dr. Benedito H. Machado

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dra.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dra.

Instituição:

Assinatura: _____

Ribeirão Preto ____/____/____

Ao amor que tem forma e nome: meus pais, Edna e Célio e meu irmão Henrique, pois são a razão de todo o trabalho traduzido nessa Tese e os meus maiores exemplos de perseverança e benevolência. A vocês todo o meu afeto e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Há certa complexidade em transcrever em palavras os laços invisíveis que nos sustentaram durante todo o processo de doutorado. Contudo, esboço nessa sessão, a minha tentativa de agradecer aos que, com sua subjetividade, me motivaram, me apoiaram e tornaram esse momento possível.

Aos meus amados pais pelo imenso esforço que fizeram para que eu tivesse uma educação de qualidade. Por terem me apoiado e aconselhado em todas as minhas decisões. Pelos momentos que me cobraram força e pelas inúmeras vezes que me deram colo. Agradeço pela educação rígida, porém cheia de amor. Por terem disfarçado a tristeza a cada despedida, pois sabiam que elas eram necessárias. Obrigada por serem a minha direção, meu porto seguro e pela presença constante mesmo com a longa distância. Amo vocês!

Ao meu irmão Henrique, pela amizade e pelas longas conversas. Por sempre me receber com amor e alegria, por ser ouvinte atencioso das minhas inquietações. Obrigada por ter se alegrado com todas as minhas conquistas e também por ter dividido comigo todos os momentos de angústia. Sou grata por todas as risadas compartilhadas e pelo carinho que sempre dedicou a mim. Aos meus amados avós Ieda, Vicente (em memória), Divina e Antônio, pelo amor e cuidado devotados a mim em todas as etapas da minha vida, por serem exemplo de vida e força. Obrigada, pois apesar da simplicidade conseguiram edificar famílias tão preciosas das quais eu tenho um imenso orgulho de fazer parte. Agradeço também os meus queridos tios e primos, por sempre me receberem com abraços empolgados e cheios de saudade, por me apoiarem e comemorarem comigo cada pequena vitória. Obrigada por constituírem uma família no sentido mais lindo que essa palavra pode assumir e por nunca terem deixado eu me esquecer o quanto é bom voltar para casa.

Ao estimado professor Benedito H. Machado pela orientação firme e presente ao longo desses cinco anos de pós-graduação. Por não ter medido esforços para que eu pudesse desfrutar de todas as oportunidades que a pós-graduação poderia me oferecer. Sua dedicação, rigidez e talento inquestionável para ensinar, me proporcionaram além de grande crescimento científico um importante desenvolvimento pessoal. Muito obrigada.

Ao querido George, por ter sido acima de tudo, o meu melhor amigo durante esse período. Obrigada por ser um grande entusiasta do meu trabalho, por me apoiar e muitas vezes ter acreditado em mim mais do que eu mesma. Seu jeito

alegre e positivo sempre fez com que os meus momentos de inquietação e desânimo fossem substituídos por otimismo e força pra continuar. Obrigada por ter transformado cada simples conversa, viagem ou mesmo as noites no laboratório em algo tão precioso. Agradeço principalmente, por ter sido o meu maior exemplo de empolgação e amor pela ciência. Você sempre foi inspiração para mim. Passamos por essa jornada juntos. Muito obrigada.

À saudosa Leni Bonagamba, pelos preciosos ensinamentos e por ter sido exemplo de profissionalismo e dedicação. Obrigada pela colaboração que fez toda a diferença na qualidade do meu trabalho. Além disso, agradeço pelo carinho, pelos abraços apertados, pelos valiosos conselhos e pelas palavras de apoio e motivação.

À Dra. Daniela Accorsi-Mendonça, pela alegria e boa vontade para ensinar. Por ter compartilhado comigo o seu conhecimento a respeito da eletrofisiologia e por estar sempre disposta a ajudar. Agradeço pelo seu entusiasmo e bom humor contagiante mesmo nos momentos difíceis. Obrigada por ter sempre uma palavra positiva e por me encorajar nos meus momentos de inseguranças.

Ao querido Carlos Eduardo Almado, pela preciosa e indispensável ajuda na análise e discussão dos resultados, pelos elogios carinhosos e tão importantes durante essa etapa. Obrigada por ser um grande exemplo de que a inteligência pode ser companheira da humildade e da generosidade. A você o meu profundo agradecimento.

Ao Dr. Paul Pilowsky, por ter me recebido em seu laboratório e por ter me acompanhado com grande dedicação durante o meu estágio em Sydney. Agradeço também à Dra. Polina Nedoboy e aos membros do grupo *“High blood pressure”* pelos ensinamentos e todas as discussões enriquecedoras ao longo desse período singular na minha carreira.

Aos antigos e atuais colegas de laboratório: Raphael, Davi, Marlusa e Darlan pelas discussões científicas enriquecedoras e por todos os momentos de descontração no laboratório. Agradeço em particular à Melina, por sua importante colaboração nas análises dos dados e por sempre estar pronta a ajudar nas questões teóricas e práticas dos experimentos eletrofisiológicos.

Aos meus grandes amigos Vinícius e Thaís, pelo apoio e amizade durante todo esse período. Por serem exemplo de que a distância não abala uma amizade verdadeira. Obrigada pelas longas e valiosas conversas, pelos desabafos e pelas divertidas visitas. Agradeço por compartilharem dos mesmos valores e ideais que eu e por sempre me receberem em Goiânia com carinho e entusiasmo.

Às queridas Nathália e Ana Paula, por terem compartilhado comigo, não somente a casa, mas também as suas vidas. Agradeço pelo cuidado diário, pelos inúmeros desabafos, pela preocupação e pela amizade demonstrada em cada detalhe do nosso cotidiano. Muito obrigada por terem feito da nossa república um verdadeiro lar.

Aos queridos amigos Aline, Nikollas, Alexandra e Júlio. Muito obrigada pelo carinho, pela ajuda nas questões científicas e principalmente por todos os momentos de alegria compartilhados.

Aos amigos que longe ou perto contribuíram de alguma forma para que esse objetivo fosse alcançado seja por um gesto carinhoso, uma palavra amiga ou um incentivo. Em especial, ao meu amigo Antenor pela amizade que nasceu no Curso de Verão em Fisiologia e se manteve durante toda a pós-graduação.

Aos membros da secretaria do departamento de Fisiologia: Cláudia, Elisa, Fernando e Igor pela competência e prontidão para ajudar nas mais diversas questões da pós-graduação.

Finalizo com os meus agradecimentos mais evitados, provavelmente porque este vem acompanhado de uma imensa saudade antecipada. Ao agradecê-los, tomo consciência da proximidade do encerramento desse ciclo no qual vocês foram o meu tudo, ou como sempre dissemos, a minha FAMÍLIA de Ribeirão Preto. Minha mais profunda gratidão a vocês que foram o meu “abraço casa”, ombro amigo, o meu lar durante todos esses anos, obrigada por compartilharem as particularidades de suas vidas comigo, por essa ligação de alma que com certeza me tornou uma pessoa melhor. Por todos os ensinamentos científicos e por muitas vezes terem me inspirado com sua força e dedicação ao trabalho. Obrigada por todos os momentos em que vocês amenizaram a minha saudade de casa, seja com um abraço apertado ou uma conversa reconfortante durante um café. Meus sinceros agradecimentos pela alegria dividida e pelos memoráveis almoços de domingo. Obrigada por terem me amparado em todos os momentos que eu precisei. Expresso a minha gratidão aos grandes amigos: Mateus Amorim e Junia Lara. Aos meus meninos, amigos/irmãos: Pedro Afonso, Edismauro Filho e Procópio Barcellos. A minha grande amiga que dividiu comigo o lar e a vida durante cinco anos: Nathanne Ferreira. Ao saudoso casal: Rhéure Lopes e Karla Neves. Às queridas amigas, Camila Zanotto e Camila Pereira. Deixo um pedacinho de mim e levarei comigo um pedacinho de cada um de vocês, para termos certeza de que estaremos unidos em qualquer cantinho iluminado desse mundo. Muito obrigada por tudo.

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos."

Isaac Newton

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro da FAPESP (#2013/06077-5, #2014/11101-5 e #2017/13720-2), CNPq e CAPES.

RESUMO

LIMA-SILVEIRA, L. Envolvimento do processo inflamatório nas alterações observadas na neurotransmissão glutamatérgica no núcleo do trato solitário de ratos submetidos à hipóxia mantida. Ribeirão Preto, 2018. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Palavras-Chaves: Hipóxia, Inflamação, Núcleo do Trato Solitário, neurotransmissão.

A hipóxia mantida de curta duração (HM) está associada a alterações cardiorrespiratórias e ao desencadeamento de processo inflamatório em humanos e modelos experimentais. Ademais, há evidências de que a HM pode alterar a transmissão sináptica na região do Núcleo do Trato Solitários (NTS). No presente estudo, utilizamos a minociclina, um inibidor da ativação microglial e anti-inflamatório, para avaliar a influência da inflamação desencadeada pela HM sobre a neurotransmissão glutamatérgica nos neurônios do NTS que enviam projeções para a região ventrolateral da medula (NTS-VLM). A hipótese geral do nosso estudo foi a seguinte: a HM induz processo inflamatório no tronco encefálico, o qual contribui para o aumento da neurotransmissão glutamatérgica em neurônios NTS-VLM, colaborando para a elevação da pressão arterial média (PAM) observada nestes ratos. Embora tenhamos observado aumento da pressão arterial média em ambos os grupos de ratos tratados com veículo (solução salina + água destilada, ip) ou minociclina [(30mg/Kg ip por 3 dias) submetidos a 24h de HM (FiO₂ 0.1) em relação aos seus respectivos grupos controle (FiO₂ 0,28), o aumento da MAP foi menor nos ratos previamente tratados com minociclina. Os registros eletrofisiológicos utilizando a técnica de whole cell patch-clamp mostraram que a HM não produziu alterações nas propriedades ativas e passivas dos neurônios NTS-VLM. No entanto, os neurônios de ratos submetidos a HM apresentaram aumento nas correntes glutamatérgicas espontâneas e evocadas pelo estímulo do trato solitário. Esse grupo de animais também apresentou aumento no número de microgliais na região do NTS. As alterações mencionadas foram atenuadas pelo tratamento prévio com minociclina. Concluímos que a inflamação induzida pela HM contribui para o aumento da neurotransmissão glutamatérgica nos neurônios NTS-VLM o qual poderia estar relacionado com a hipertensão arterial observada nestes ratos.

ABSTRACT

LIMA-SILVEIRA, L. Changes in glutamatergic neurotransmission in the nucleus tractus solitarius of rats submitted to sustained hypoxia are related to the inflammatory process. Ribeirão Preto, 2018. Thesis (PhD). School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Key-words: Sustained hypoxia, nucleus tractus solitarius, inflammation, neurotransmission.

Short-term Sustained hypoxia (SH) is associated with cardiorespiratory changes and inflammatory process in humans and experimental models. There is also evidence that SH can change the synaptic transmission in the nucleus tractus solitarius (NTS) region. Here we use the minocycline, an anti-inflammatory and microglial inhibitor, to evaluate the role of inflammation triggered by SH on the excitatory neurotransmission in the NTS neurons sending projections to the ventrolateral medulla (NTS-VLM). We hypothesized that SH induces brainstem inflammatory process, which may contribute to increase in excitatory neurotransmission and excitability of the NTS-VLM neurons, collaborating to the high blood pressure observed on these rats. Although we have observed increased MAP in both groups of rats treated with vehicle (saline + distilled water, i.p) or minociclina [(30mg/Kg i.p for 3 days) submitted to 24h of SH (FiO₂ 0.1) in relation to their respective control groups (FiO₂ 0.28), the MAP increase was lower in rats treated with minociclina. The whole cell patch-clamp recordings showed that SH produced no changes in active properties of NTS neurons. However, neurons of rats submitted SH presented an increase in the glutamatergic neurotransmission and the number of microglial at the NTS region. These increases were prevented in the groups previously treated with minociclina. We conclude that inflammation induced by SH contributes to the increased excitatory neurotransmission in NTS-VLM neurons that could be associated to high blood pressure observed in these rats.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Protocolo de hipóxia mantida. O grupo experimental foi submetido ao protocolo de hipóxia mantida (esquerda) por 24 horas e os animais do grupo controle foram mantidos em condições de normóxia (direita) durante o mesmo período. 36
- Figura 2:** Esquema ilustrativo mostrando a aplicação do traçador Green Beads na região ventral do bulbo (VLM) e a sua migração retrógrada para o corpo celular dos neurônios do Núcleo do Trato Solitário (NTS). 38
- Figura 3:** Alterações no potencial de membrana de neurônios do NTS em resposta à injeção de correntes hiperpolarizantes. **A)** Desenho experimental utilizado. O potencial de membrana é inicialmente mantido em aproximadamente -70 e então são injetadas correntes negativas (-12,5; -25; -37,5 e -50 pA) para a avaliação da resistência de entrada da membrana. **B)** Traçado representativo mostrando as variações no potencial de membrana frente à injeção das correntes hiperpolarizantes. 45
- Figura 4:** Traçados representativos mostrando os disparos de potenciais de ação de um neurônio do Núcleo do Trato Solitário em resposta a injeção de correntes despolarizantes (+12,5; +25; +37,5; +50 e +62,5 pA). 47
- Figura 5:** Representação esquemática de uma transmissão sináptica evidenciando a liberação de um neurotransmissor e o método utilizado para o registro das correntes pós-sinápticas. 48
- Figura 6:** Fotomicrografia de um corte coronal da porção dorsal do bulbo contendo a região do NTS. Pipeta de registro, seta amarela. Eletrodo de estímulo posicionado sobre o trato solitário, seta branca. 49
- Figura 7.** Registros cardiovasculares de um rato representativo de cada grupo experimental mostrando os traçados de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), e frequência cardíaca (FC). 54
- Figura 8.** Valores médios da PAM (painel A), PAS (painel B), PAD (painel C), e FC (painel D) de ratos controle e HM tratados com veículo ou minociclina, obtidos pelo método de medida direta da pressão arterial. * $P < 0,05$ diferente em relação ao controle # $P < 0,05$ diferente em relação ao veículo. 54
- Figura 9. Painel A:** Representação esquemática de uma fatia coronal evidenciando a disposição espacial na superfície ventral do bulbo contendo o Núcleo Ambiguus (NA), a VLM e a Oliva Inferior (OI, modificado de Paxinos 56

& Watson, *Elsevier*, 2006). Em destaque uma fotomicrografia da região ventral do bulbo evidenciando o sítio de injeção do traçador retrógrado revelado pela fluorescência do Green Beads na região da VLM. **Painel B:** sub-regiões do NTS em uma sequência de cortes coronais do bulbo no sentido rostro-caudal. **Painel C:** neurônio do NTS com aspecto saudável. **Painel D:** fluorescência observada nessa mesma região e **painel E:** sobreposição entre o neurônio mostrado em C e a fluorescência mostrada em D. AP:área postrema, TS: trato solitário.

Figura 10: Propriedades passivas de neurônios do NTS-VLM de ratos controle e HM tratados com veículo ou minociclina. **Painel A:** Relação entre a injeção de corrente e a voltagem da membrana (gráfico V x I) ilustrando o método utilizado para o cálculo da resistência de entrada da membrana (*Rinput*). **Painel B:** Traçado representativo evidenciando o potencial de repouso da membrana (vermelho) e sua alteração frente a injeção de corrente negativa. **Painel C:** Valores médios da capacitância. **Painel D:** Potencial de repouso da membrana e **Painel E:** Resistência de entrada de neurônios do NTS-VLM de animais controle e HM tratados com veículo ou com Minociclina.

57

Figura 11: Valores da média de disparos de potencial de ação para cada amplitude de corrente despolarizante injetada nos neurônios NTS-VLM dos diferentes grupos experimentais.

59

Figura 12: Análise das propriedades ativas de neurônios de ratos controle e HM tratados com veículo ou minociclina. **Painel A:** Traçado representativo de um potencial de ação com algumas de suas características intrínsecas destacadas. **Painel B:** Plano de fase evidenciando as variações do potencial de membrana durante um potencial de ação. **Painel C:** Valores médios do Limiar **Painel D:** condutância máxima de sódio e **painel E:** Hiperpolarização após o potencial de ação.

60

Figura 13: Correntes espontâneas totais dos neurônios do NTS-VLM de ratos submetidos à HM tratados com veículo ou minociclina. **Painel A:** registros de um neurônio representativo de cada grupo experimental. Note que há um aumento da frequência das sPSCs de animais HM tratados com veículo quando comparado com o controle, e que esse aumento não é observado em animais tratados com minociclina submetidos à HM. **Painel B:** Valores médios da frequência; **Painel C:** amplitude e **Painel D:** half-width das sPSCs dos neurônios do NTS de animais controle e HM tratados com veículo ou com Minociclina. *P< 0,05 diferente do controle. #P< 0,05 diferente do veículo.

62

Figura 14: Correntes espontâneas excitatórias (sEPSCs) dos neurônios do NTS-VLM de ratos submetidos à HM tratados com veículo ou minociclina. **Painel A:** registros de um neurônio representativo de cada grupo experimental. Observe o aumento da frequência das sEPSCs de animais HM tratados com veículo em relação aos demais grupos experimentais. **Painel B:** Fração cumulativa do intervalo inter-evento das sEPSCs. **Painel C:** Valores médios da frequência; **Painel D:** amplitude e **Painel E:** half-width das sEPSCs dos neurônios do NTS-VLM de animais controle e HM tratados com veículo ou com Minociclina. *P< 0,05 diferente do controle. #P< 0,05 diferente do veículo.

64

Figura 15: Correntes espontâneas excitatórias em miniatura (msEPSCs) dos neurônios do NTS-VLM de ratos submetidos à HM tratados com veículo ou minociclina. **Painel A:** registros de um neurônio representativo de cada grupo experimental. **Painel B:** Fração cumulativa do intervalo inter-evento das msEPSCs. **Painel C:** Valores médios da frequência; **Painel D:** amplitude e **Painel E:** half-width das sEPSCs dos neurônios do NTS-VLM de animais controle e HM tratados com veículo ou com minociclina.

66

Figura 16. Correntes pós-sinápticas excitatórias evocadas pelo estímulo do trato solitário (TS-eEPSC) de neurônios do NTS-VLM de ratos submetidos a HM. **Painel A:** registros das TS-eEPSC de neurônios representativos de cada um dos 4 grupos experimentais estudados evidenciando o aumento na amplitude das TS-eEPSC no neurônio de um animal HM veículo (seta). **Painel B:** Valores médios da amplitude. **Painel C:** Fração cumulativa da amplitude das TS-eEPSC e **Painel D:** Valores médios do $1/CV^2$ das TS-eEPSC dos neurônios do NTS de animais controle e HM tratados com veículo ou com minociclina. *P< 0,05 diferente em relação ao controle. #P< 0,05 diferente em relação ao veículo.

69

Figura 17. Propriedades cinéticas das TS-eEPSCs. **Painel A:** Traçado de uma TS-eEPSCs e suas características cinéticas representadas graficamente. **Painel B:** Valores médios do half-width; **Painel C:** rise time e **Painel D:** decay time das TS-eEPSCs dos neurônios do NTS-VLM de animais controle e HM tratados com veículo ou com minociclina.

70

Figura 18. Depressão de curto prazo das TS-eEPSCs. **Painel A:** Registro representativo das eEPSCs resultantes de um trem de 5 estímulos com frequência de 10 Hz ao TS. **Painel B:** representação gráfica dos valores da porcentagem média de decaimento das TS-eEPSCs em relação a primeira corrente evocada em neurônios NTS-VLM de animais controle e HM tratados com veículo ou com minociclina.

72

Figura 19: Avaliação das correntes dessincronizadas (TS-eaEPSCs). **Painel A:** Traçado representativo ilustrando a dessincronização das TS-eEPSCs resultantes da substituição do cálcio $[(Ca^{2+})$, esquerda] extracelular pelo estrôncio $[(Sr^{2+})$, direita]. **Painel B:** distribuição relativa média das amplitudes das TS-eaEPSCs do grupo controle e HM tratados com veículo (esquerda) e dos grupos controle e HM tratados com minociclina (direita). **Painel C:** Valores médios da amplitude das eaEPSCs dos diferentes grupos experimentais. **Painel D:** Valores médios do conteúdo quântico (**m**), obtido pela divisão da amplitude média das TS-eEPSCs pela amplitude das correntes quantais (**q**) do neurônio correspondente. *P< 0,05 diferente em relação ao controle. #P< 0,05, diferente do veículo.

75

Figura 20: Avaliação do mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 pela técnica de Real Time qRT-PCR no NTS de animais submetidos a HM. **Painel A:** Fotomicrografia de uma fatia coronal do tronco cerebral contendo a região do NTS evidenciando o local de onde foram obtidos os *punches* dessa região. Valores médios da quantificação do mRNA das citocinas IL-1 β (**Painel B**); TNF- α (**Painel C**) e IL-6 (**Painel C**) na região do NTS de animais controle e HM tratados com veículo ou com Minociclina. *P< 0,05, diferente em relação ao controle.

77

Figura 21: Microglias na região do NTS. **Painel A:** imagem de fluorescência evidenciando as microglias (verde) na região NTS identificadas pela imunofluorescência para o marcador microglial Iba-1. **Painel B:** Número médio de células microgliais na região NTS de animais controle e HM tratados com veículo ou com minociclina. **Painel C:** Imagens em maior magnificação evidenciando a região do NTS de um animal representativo de cada grupo experimental. iNTS: NTS intermediário; CC: canal central; AP: Área postrema. *P< 0,05 diferente em relação ao controle.

78

Figura 22. Características morfológicas das microglias na região NTS. **Painel A:** As imagens binárias das microglias foram "esqueletizadas" e analisadas com o plugin "AnalyzeSkeleton"; ramificações (laranja); *end points* (azul). **Painel B:** Número médio de ramificação / célula **Painel C:** comprimento das ramificações/célula. **Painel D:** Número médio de end points/ célula.

80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1/CV²	Inverso do coeficiente de variação ao quadrado
aCSF	Fluido cérebro-espinhal artificial
ADP	Adenosina difosfato
AMPA	Alfa-amino-3hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropióico
AP	Área postrema
ATP	Adenosina trifosfato
Ca²⁺	Cálcio
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CC	Canal central
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CO₂	Dióxido de carbono
Cont	Controle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNQX	6,7-Dinitroquinoxalina-2,3-diona
DV	Dorso-ventral
EGTA	Etileno glicol ácido tetracético
FC	Frequência cardíaca
Fi	Fração inspirada
GABA	Ácido gama-aminobutírico
H⁺	Íons hidrogênio
H₂O	Água
HCl	Hipóxia crônica intermitente
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico

HIF-1	Fator Induzido por Hipóxia
HM	Hipóxia mantida
HPA	Hiperpolarização posterior ao potencial de ação
IBA-1	<i>Iodinized calcium binding adaptor molecule-1</i>
IIE	Intervalo inter-evento
IK_A	Correntes de saída de potássio
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
iNTS	Núcleo do trato solitário intermediário
K⁺	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
L	Lateral
m	Conteúdo quântico
mEPSCs	Correntes pós-sinápticas espontâneas em miniatura
MgCl₂	Cloreto de magnésio
Mino	Minociclina
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
n	Número de sinapses ativas
N₂	Nitrogênio
Na⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato de sódio monobásico
NGF	Fator de crescimento neural
NK-κB	Fator Nuclear kappaB

NMDA	N-metil D-Aspartato
NTS	Núcleo do trato solitário
O₂	Oxigênio
pA	Picoampere
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PaO₂	Pressão parcial de oxigênio
PAP	Pressão arterial pulsátil
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão fosfato
Pr	Probabilidade de liberação vesicular
q	Tamanho quântico
qRT-PCR	Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
RNA	Ácido ribonucleico
RVLM	Região rostroventrolateral do bulbo
sEPSCs	Correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas
SNC	Sistema nervoso central
sPSCs	Correntes pós-sinápticas espontâneas
Sr²⁺	Estrôncio
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TS	Trato solitário
TS-eaEPSCs	Correntes pós-sinápticas excitatórias evocadas assíncronas
TS-eEPSCs	Correntes pós-sinápticas excitatórias evocadas pela estimulação elétrica do trato solitário
TTX	Tetrodotoxina

Veic	Veículo
VLM	Região ventrolateral do bulbo
VRG	Grupo respiratório ventral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 - A Importância do oxigênio para o metabolismo e os ajustes celulares em respostas às situações de hipóxia	23
1.2 - Os efeitos da hipóxia sobre os sistemas cardiovascular e respiratório	26
1.3 - O Núcleo do Trato Solitário	27
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Animais	35
3.2 Tratamento com minociclina	35
3.3 Hipóxia Mantida (HM)	35
3.4 Experimentos in vivo	36
3.4.1 Avaliação dos parâmetros cardiovasculares em animais não anestesiados e com livre movimentação	36
3.5 Experimentos in situ com neurônios do NTS.....	37
3.5.1 Cirurgia para marcação dos neurônios NTS que se projetam para a superfície ventral do bulbo (VLM).....	37
3.5.2 Registros eletrofisiológicos dos neurônios do NTS-VLM utilizando a técnica de Whole Cell Patch-Clamp	38
3.5.3 Estímulo elétrico do Trato Solitário (TS).....	40
3.6. Avaliação do mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL- 1 β , TNF- α e IL-6 no NTS.....	41
3.7 Análise das células microgliais na região do NTS de ratos submetidos a HM.....	42
3.7.1 Fixação dos tecidos.....	42
3.7.2 Imunohistoquímica.....	42
3.7.3 Aquisição de imagens e análises das microglias no NTS	43
3.8 Análise de dados.....	43
3.9 Protocolos experimentais	43
3.9.1 A influência do processo inflamatório sobre as alterações cardiovasculares de animais submetidos HM por 24 horas.	43
3.9.2 Influência do processo inflamatório induzido por HM sobre as propriedades intrínsecas e características sinápticas de neurônios do NTS que enviam projeções para a superfície ventral do bulbo (VLM).	44
3.9.3 Influência do processo inflamatório sobre as propriedades passivas da membrana de neurônios do NTS de ratos jovens submetidos à HM.	45
3.9.4 Influência do processo inflamatório sobre as propriedades ativas de neurônios do NTS-VLM de ratos jovens submetidos à HM.....	46

3.9.5	Influência do processo inflamatório induzido pela HM sobre as correntes espontâneas totais (sPSCs) e correntes espontâneas excitatórias (sEPSCs) de neurônios do NTS.	48
3.9.6	Estudo das correntes evocadas pelo estímulo elétrico do Trato Solitário.	48
3.9.7	Estudo das correntes espontâneas em miniatura (mEPSC)	50
3.9.8	Estudo das TS-eaEPSCs uníquânticas obtidas por substituição do cálcio extracelular por estrôncio	50
3.9.9	Avaliação do mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL- 1 β , TNF- α e IL-6 no NTS	50
3.9.10	Análise da ativação microglial após à HM por 24 horas.	51
4.	RESULTADOS	52
4.1	Efeito do tratamento com Minociclina sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos submetidos a 24h de HM.	53
4.2	Experimentos com neurônios do NTS que se projetam para a região ventral do bulbo (NTS-VLM).	55
4.2.1	Efeito da exposição a HM e do tratamento com Minociclina sobre as propriedades passivas de neurônios NTS-VLM.	57
4.2.2	Efeito da exposição a HM e do tratamento com Minociclina sobre as propriedades ativas de neurônios NTS-VLM.	58
4.2.3	Efeito da exposição a HM e do tratamento com Minociclina sobre as correntes espontâneas pós-sinápticas totais (sPSCs) de neurônios do NTS-VLM.	61
4.2.4	Efeito da exposição a HM e do tratamento com Minociclina sobre as correntes espontâneas excitatórias (sEPSCs) de neurônios do NTS-VLM.	63
4.2.5	Efeitos da HM e do tratamento com Minociclina sobre as correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias em miniatura (msEPSCs).	65
4.2.6	Efeitos da HM e do tratamento com Minociclina sobre as correntes pós-sinápticas excitatórias evocadas pelo estímulo do trato solitário (TS-eEPSCs).	67
4.2.7	Análise da influência da HM e do tratamento com minociclina sobre a depressão de curto prazo das TS-eEPSCs em neurônios NTS-RVL.	71
4.2.8	Estudo das TS-eaEPSCs assíncronas (TS-eaEPSCs) obtidas por substituição do cálcio extracelular por estrôncio (Sr ²⁺)	73
4.3	Efeitos da HM e do tratamento com Minociclina sobre a expressão do mRNA de citocinas pró-inflamatórias no NTS	76
4.4	Avaliação das microglias na região do NTS de animais submetidos a HM.	77
5.	DISCUSSÃO	81
6.	SUMÁRIO E CONCLUSÕES	95
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
	ANEXO A – Artigo relacionado à Tese	109
	ANEXO B- Artigo publicado não relacionado à Tese	151

1. INTRODUÇÃO

1.1- A Importância do oxigênio para o metabolismo e os ajustes celulares em respostas às situações de hipóxia

O oxigênio (O_2) é indispensável à respiração celular dos animais, e possui extrema importância em seu metabolismo energético (MITCHELL, 1961, 1979). De fato, evidências evolutivas apontam que o aumento do O_2 na atmosfera está entre os principais fatores que possibilitaram o desenvolvimento de organismos complexos na terra (COSTA et al., 2014). No processo de fosforilação oxidativa, uma fase da respiração celular que ocorre no interior das mitocôndrias, o O_2 é utilizado como aceptor final de elétrons sendo então reduzido à água (H_2O). Durante essa etapa, um conjunto de complexos protéicos denominado cadeia transportadora de elétrons, gera uma diferença de gradiente de prótons entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranar. Com efeito, o potencial eletroquímico formado, favorece a rápida movimentação de prótons, pela enzima ATP sintase fornecendo energia para fosforilação da adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP), a fonte de energia fundamental para a maioria das reações bioquímicas (SANDERS et al., 1965; WAYPA et al., 2016).

A queda da pressão parcial de O_2 no sangue, que configura situação de hipóxia, está relacionada com redução expressiva da produção de energia e da síntese protéica (NELSON et al., 1967; SANDERS et al., 1965). Portanto, a manutenção da pressão parcial de O_2 no sangue arterial (PaO_2) dentro de uma estreita faixa de variação representa um desafio constante para os organismos que dependem do metabolismo aeróbio.

Os mamíferos possuem mecanismos celulares capazes de detectar alterações na PaO_2 e desencadear respostas fisiológicas adequadas a essa perturbação. Há evidências de que situações de hipóxia podem induzir a ativação de fatores que modulam a expressão gênica. Entre eles estão o Fator Induzido por Hipóxia (HIF-1) e o Fator Nuclear κB [(NF- κB)] (SEMENZA & WANG, 1992; PAPANDREOU et al., 2005). e ambos são particularmente relevantes para a resposta celular às alterações nos níveis de O_2 . O HIF-1 é um fator de transcrição que é ativado em condições de hipóxia. Os genes-alvo do HIF-1 estão envolvidos em vários ajustes metabólicos e hemodinâmicos, como por exemplo: a) na codificação de fatores angiogênicos para aumento do aporte sanguíneo, b) fatores de proliferação e de sobrevivência celular, c) aumento dos transportadores de glicose e enzimas glicolíticas que favorecem a

produção anaeróbica de energia (SEMENZA & WANG, 1992; LEE et al., 2004). Por outro lado, a família de proteínas NF- κ B possui um papel fundamental para a regulação de genes inflamatórios, e para a coordenação das respostas imunes inatas e adaptativas (LI & VERMA, 2002; BONIZZI & KARIN, 2004).

Há evidências de que as vias de transcrição do HIF e do NF- κ B estão sob modulação recíproca e apresentam alto grau de interdependência (TAYLOR, 2008). Ademais, foi demonstrado que, uma vez ativado, o HIF atua como um importante regulador do processo inflamatório (CRAMER et al., 2003). Esses estudos anteriores indicam a existência de uma relação estreita entre hipóxia e inflamação. De fato, a hipóxia pode representar um forte estímulo inflamatório, sendo que essa afirmação encontra suporte em diversas evidências experimentais (GARVEY et al., 2009; ELTZSCHIG & CARMELIET, 2011)

Diferentes estudos demonstram que camundongos expostos a hipóxia aguda apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias circulantes, bem como o acúmulo de células inflamatórias em diferentes órgãos (SYNNESTVEDT et al., 2002; ECKLE et al., 2008; ROSENBERGER et al., 2009). Estudos semelhantes evidenciaram que moduladores da resposta inflamatória como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), a Interleucina-1 β (IL- 1 β) e o HIF-1 estão aumentados em ratos submetidos à hipóxia intermitente (DEL RIO et al., 2012). O aumento da expressão nos níveis periféricos de citocinas pró-inflamatórias também foi evidenciado em pacientes com apnéia obstrutiva do sono, patologia na qual os indivíduos são submetidos a episódios intermitentes de hipóxia durante o sono (GARVEY et al., 2009; NADEEM et al., 2013). Similarmente, roedores expostos a hipóxia crônica intermitente (HCI) apresentam aumento da atividade do NF- κ B em tecidos cardiovasculares (GREENBERG et al., 2006). Ademais, diferentes trabalhos evidenciaram que indivíduos que se deslocam para elevadas altitudes, onde a pressão parcial de oxigênio é reduzida quando comparada àquela verificada ao nível do mar, apresentam aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes que está associado ao vazamento de fluidos que pode culminar em edema cerebral e pulmonar (KUBO et al., 1998; HARTMANN et al., 2000). A relação entre hipóxia e inflamação também possui relevância clínica, uma vez que, no transplante de órgãos o ambiente hipóxico causado pela isquemia aumenta o risco de inflamação e consequentemente de rejeição tecidual (DE PERROT et al., 2002; KRÜGER et al., 2009). No contexto do sistema nervoso central (SNC),

estudos mostraram que períodos prolongados de hipóxia, ocasionada por isquemia, desencadeiam resposta inflamatória que contribui significativamente para a lesão cerebral observada nessas condições (BARONE & FEUERSTEIN, 1999; IADECOLA & ALEXANDER, 2001).

Situações de hipóxia podem desencadear neuroinflamação por estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células da microglia (DENG et al., 2008; KAUR et al., 2010; KIERNAN et al., 2016). As microglias são as células imunes residentes no SNC e estão envolvidas na imunidade inata e adaptativa desse sistema. Sob condições fisiológicas, essas células encontram-se em estado de repouso caracterizado pela sua morfologia ramificada. Uma vez ativadas, as microglias podem se proliferar e sofrer alterações morfológicas passando para o seu estado “amebóide” e nessa condição podem iniciar uma cascata de reações imunológicas, envolvendo a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias (IL-1b, interleucina -6 e TNF-a), espécies reativas de oxigênio, e neurotransmissores (LEE et al., 2004; FÄRBER & KETTENMANN, 2005; CRAIN & KETTENMANN et al., 2011; SAIJO & GLASS, 2011; NIKODEMOVA & WATTERS, 2013; ORIHUELA et al., 2016). Nesse cenário, SMITH et al. (2013), evidenciaram que as células microgliais de ratos apresentam um aumento da expressão de IL-1 β , IL-6, TNF α , COX-2 e Toll-like receptor (TLR) após a exposição à HCl. Estudos de SNYDER et al. (2017) mostraram que a HCl promove ativação de células microgliais e inflamação em regiões cerebrais relacionadas com a neurodegeneração. Além disso, estudos de (TADMOURI et al., 2014) mostraram que o modelo experimental da hypoxia mantida (HM) por 24 horas, induz ativação das células microgliais em áreas relacionadas com o controle cardiovascular e respiratório. Esses estudos encontram suporte em dados recentes que evidenciaram que a aclimatização ventilatória a hipóxia mantida requer a ativação de células microgliais e liberação de citocinas pró-inflamatórias no SNC (STOKES et al., 2017).

Há evidências de que no SNC, os efeitos das quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias não estão restritos à coordenação das respostas imunes, uma vez que as mesmas podem agir como neuromoduladores (ADLER et al., 2006; ROSTÈNE et al., 2007). Os mecanismos pelos quais os agentes inflamatórios influenciam a atividade neuronal têm sido investigados em diversas regiões do SNC. Um estudo com neurônios do corno dorsal da medula espinhal evidenciou que as citocinas pró-inflamatórias aumentam a excitabilidade desses neurônios, deprimindo a

transmissão sináptica inibitória, e aumentando a transmissão sináptica excitatória (KAWASAKI et al., 2008). Corroborando com esses resultados, foi demonstrado que o TNF- α e a IL-1 β aumenta a inserção de diferentes subtipos de receptores glutamatérgicos na membrana plasmática de neurônios do hipocampo (VIVIANI et al., 2003; STELLWAGEN et al., 2005) facilitando a neurotransmissão excitatória nessa região. Estudos de MING et al. (2013) demonstraram também que o TNF- α reduz o limiar para o disparo de potenciais de ação de neurônios da amígdala central. Em conjunto os estudos mencionados acima indicam que as citocinas pró-inflamatórias podem contribuir para o aumento da excitabilidade neuronal e para o aumento da transmissão sináptica excitatória no SNC.

1.2 - Os efeitos da hipóxia sobre os sistemas cardiovascular e respiratório

Além das respostas celulares e imunológicas, as situações de hipóxia também promovem importantes alterações nos sistemas respiratório e cardiovascular. O sistema respiratório é o responsável pela captação de O₂ do ar atmosférico e pelo seu direcionamento até a barreira alvéolo-capilar nos pulmões, onde são realizadas as trocas gasosas. Por sua vez, o sistema cardiovascular é o responsável por transportar e distribuir o O₂, ligado a hemoglobina, para todas as células dos diferentes tecidos. Para que essas funções sejam realizadas de maneira apropriada, é necessário que os movimentos respiratórios apresentem um padrão rítmico e coordenado (ST-JOHN & PATON, 2003) e que a pressão arterial sanguínea, que é determinada pelo produto do débito cardíaco e da resistência periférica, seja mantida em níveis adequados (JACOB et al., 2016; SAMANTA et al., 2017). Por isso, os sistemas cardiovascular e respiratório são modulados momento a momento pelo SNC (FELDMAN & ELLENBERGER, 1988).

Os efeitos da exposição à hipóxia sobre os sistemas cardiovascular e respiratório foram evidenciados por diferentes estudos experimentais. Pessoas submetidas a episódios repetidos de hipóxia, como é o caso de pacientes acometidos pela apneia obstrutiva do sono, desenvolvem hipertensão arterial e outras disfunções cardiovasculares (CAPLES et al., 2005). Essa hipertensão está relacionada em parte à frequente estimulação dos quimiorreceptores periféricos pelos episódios de hipóxia (NARKIEWICZ et al., 1998). Estudos de ZOCCAL et al. (2008, 2009) demonstraram que ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente apresentam alterações

respiratórias, hiperatividade simpática e hipertensão arterial, destacando que o aumento da atividade simpática está associado a uma modificação no acoplamento entre as atividades simpática e respiratória.

Diferentes estudos têm demonstrado que a exposição a episódios de hipóxia mantida (HM), como acontece com humanos que ascendem para regiões de elevadas altitudes, está relacionada com o desencadeamento de alterações cardiovasculares dentre outras disfunções fisiológicas. Há evidências de que indivíduos submetidos à HM apresentam hiperatividade simpática, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (CALBET, 2003; HAINSWORTH; DRINKHILL, 2007; HANSEN; SANDER, 2003). Resultados semelhantes foram observados em estudos de MORAES et al. (2014), que evidenciaram um aumento significativo da pressão arterial associado a uma elevação da atividade simpática em ratos submetidos a HM.

1.3 - O Núcleo do Trato Solitário

O controle eficiente dos sistemas cardiovascular e respiratório é realizado principalmente por meio dos diferentes reflexos como o quimiorreflexo, barorreflexo e reflexo cardiopulmonar, as quais atuam no sentido de promover ajustes cardiorrespiratórios frente às diferentes perturbações promovidas no meio interno. Esses reflexos são distintos em diferentes aspectos como em relação ao estímulo para sua ativação e quanto às respostas efetoras promovidas pelos mesmos. Entretanto, uma característica comum compartilhada por todos eles refere-se ao seu primeiro contato sináptico no SNC. As fibras aferentes desses reflexos chegam ao SNC por meio do trato solitário (TS) e têm como primeira estação sináptica o núcleo do trato solitário [NTS (DONOGHUE et al., 1984; ANDRESEN & KUNZE, 1994)].

O NTS é constituído por grupos heterogêneos de neurônios que processam as informações viscerais aferentes e por sua vez se conectam com diferentes regiões do SNC (ANDRESEN & KUNZE, 1994; JOHNSON & THUNHORST, 1997; GRILL & HAYES, 2009). Dentre elas, está a região ventrolateral do bulbo (VLM), onde estão localizados os neurônios geradores da atividade simpática (GUYENET, 2006). O sistema autônomo simpático é o responsável pela modulação de diversas funções neurovegetativas, destacando-se, nesse contexto, o controle da pressão arterial e da função cardíaca (GRIMSON, 1941; GUYENET, 2006). O NTS também mantém

conexões diretas com os neurônios do grupo respiratório ventral (VRG) responsáveis pela geração do ritmo e do padrão respiratório (FELDMAN & DEL NEGRO, 2006). As características anatômicas e neuroquímicas da rede neuronal do NTS possibilitam que esse núcleo integre as informações sensoriais e recrute vias neuronais específicas para gerar respostas cardiovasculares e respiratórias apropriadas aos diferentes desafios como, por exemplo, as situações de hipóxia (AICHER et al., 1996; ALHEID et al., 2011).

Os ajustes cardiorrespiratórios em resposta a hipóxia são desencadeados por meio da ativação do quimiorreflexo. Os quimiorreceptores periféricos, localizados nos corpúsculos carotídeos, são células especializadas capazes de detectar a queda na pressão parcial de O_2 , e também o aumento de dióxido de carbono (CO_2) e de íons hidrogênio (H^+), funcionando como sensores da composição química do sangue arterial (GONZALEZ et al., 1994). Em situação de hipóxia a maior entrada Ca^{2+} induz a liberação de neurotransmissores por essas células, levando a despolarização de terminações neurais adjacentes, cujos potenciais de ação são transmitidos para o SNC (DONOGHUE et al., 1984; CLAPS & TORREALBA, 1988; MIFFLIN, 1992). As projeções oriundas dos quimiorreceptores periféricos fazem seu primeiro contato sináptico no NTS, que por sua vez integra essas informações e por meio de suas conexões diretas com os neurônios do RVLM e do VRG (FELDMAN & DEL NEGRO, 2006; GUYENET, 2006) promove respostas fisiológicas como o aumento da pressão arterial e da frequência respiratória com a finalidade de normalizar a PaO_2 e o fornecimento de oxigênio as células de todos os órgãos (AICHER et al., 1996; KOSHIYA; GUYENET, 1996).

Estudos anteriores tiveram como objetivo elucidar os possíveis mecanismos neurais ligados às alterações autonômicas e cardiorrespiratórias desencadeadas pela exposição ao modelo da hipóxia mantida (ZHANG et al., 2008; MORAES et al., 2014; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2015). Esses trabalhos foram direcionados para se investigar os efeitos da HM sobre a transmissão sináptica na região do NTS, considerando o papel chave dessa região no controle das funções cardiovascular e respiratória. Estudos de ZANG et al. (2008, 2009) evidenciaram que a HM crônica promove um aumento na transmissão sináptica excitatória em neurônios do NTS, associada as alterações pré e pós-sinápticas nessa região. Resultados semelhantes foram obtidos por ACCORSI-MENDONÇA et al. (2015) ao demonstrarem que a exposição à HM de curta duração (24 horas) induz aumento da excitabilidade

neuronal, aumento da transmissão sináptica excitatória e redução da modulação glial sobre neurônios do NTS. Em conjunto, esses estudos evidenciam que a HM pode alterar a função neuronal e a transmissão sináptica na região do NTS.

Diante do exposto acima, nota-se que situações de hipóxia mantida podem desencadear: a) processo inflamatório central e periférico; b) alterações cardiovasculares e respiratórias e c) plasticidade sináptica na região do núcleo do trato solitário. Por essas razões, o primeiro objetivo do presente trabalho foi investigar, por meio do registro direto da pressão arterial em ratos não anestesiados, se o processo inflamatório desencadeado pela HM estava envolvido na hipertensão observada em ratos submetidos a esse modelo hipóxia. A hipótese testada nessa etapa foi a seguinte: O processo inflamatório desencadeado pela HM contribui para o aumento da pressão arterial observado em ratos submetidos a esse modelo de hipóxia. Para os nossos estudos, utilizamos a minociclina, um anti-inflamatório do grupo das tetraciclina, que atravessa a barreira hematoencefálica e é efetiva no tratamento de inflamação no SNC (KLEIN & CUNHA, 1995; STIRLING et al., 2005). O mecanismo mais conhecido pelo qual a minociclina reduz a inflamação no SNC é pela inibição da ativação das células microgliais (ZEMKE & MAJID, 2004; STIRLING et al., 2005).

Nossos resultados indicaram que a hipertensão induzida pela HM foi atenuada pelo tratamento com esse anti-inflamatório. Diante disso, passamos a investigar os possíveis mecanismos pelos quais a inflamação contribuiu para a elevação da pressão arterial.

Considerando que mediadores do processo inflamatório podem atuar como neuromoduladores, na segunda etapa desse estudo, utilizamos a técnica de *Whole Cell Patch-Clamp* para os estudos eletrofisiológicos de neurônios do NTS de ratos submetidos a HM. Com o objetivo de estudar os efeitos da HM sobre os neurônios das vias neuronais possivelmente envolvidas no quimiorreflexo, todos os nossos experimentos foram realizados em neurônios NTS que enviam projeções para a VLM (NTS-VLM). Esses neurônios foram previamente identificados por meio da técnica de marcação retrógrada. Nesse contexto, a hipótese testada foi: a HM desencadeia o processo inflamatório no NTS, o qual contribui para o aumento da excitabilidade e da transmissão sináptica excitatória nos neurônios dessa região. Com isso, sugerimos que o tratamento com minociclina resultaria em redução dessas alterações.

Os resultados apresentados nessa tese favorecem a compreensão dos mecanismos relacionados às alterações cardiovasculares e neuronais induzidas pela HM. Com base nos nossos resultados, concluímos que o processo inflamatório contribui para o desencadeamento da hipertensão arterial e para o aumento da transmissão sináptica excitatória em neurônios NTS-VLM de ratos submetidos a HM.

2. OBJETIVOS

O primeiro objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com a minociclina sobre a hipertensão desencadeada pela HM de 24 horas. Posteriormente, tivemos como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com esse anti-inflamatório sobre a transmissão sináptica e as propriedades intrínsecas de neurônios do NTS de ratos submetidos a esse modelo de hipóxia. Os nossos objetivos específicos foram os seguintes:

- a) Avaliar os efeitos do tratamento com a minociclina sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos jovens submetidos à HM por 24 horas (FiO₂ 10%).
- b) Avaliar a influência do processo inflamatório sobre as propriedades passivas dos neurônios marcados do NTS (NTS-VLM) de animais submetidos à HM.
- c) Avaliar a influência da inflamação nas propriedades ativas dos neurônios do NTS-VLM de animais submetidos à HM.
- d) Verificar a influência da inflamação nas características das correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas (sEPSCs) e correntes pós-sinápticas excitatórias evocadas pela estimulação elétrica do trato solitário (TS-eEPSCs) em neurônios do NTS-VLM de animais submetidos à HM.
- e) Avaliar os efeitos do tratamento com minociclina sobre as correntes glutamatérgicas assíncronas (TS-eaEPSCs) em neurônios NTS-VLM.

- f) Avaliar a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α em punches da região do NTS de ratos submetidos a HM.
- g) Comparar o número de Microglias na região do NTS em animais controle ou submetidos à HM tratados com veículo ou com minociclina, como um indicativo de processos inflamatórios nessa região.
- h) Avaliar os efeitos da HM e do tratamento com minociclina sobre a morfologia das células microgliais da região do NTS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para os experimentos com animais não anestesiados e experimentos de eletrofisiologia utilizamos ratos Wistar jovens (100-150g), provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Especificamente para o estudo das células microgлияis, os quais foram realizados na Universidade de Sydney, foram utilizados ratos Wistar (150-250g) fornecidos pelo Centro de Recursos Animais, Perth, Australia.

Os animais foram divididos em 4 grupos: Controle tratado com veículo, controle tratado com minociclina, HM tratado com veículo e HM tratado com minociclina. Os protocolos experimentais utilizados nesse projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto (nº 094/2013; nº 070/2007).

3.2 Tratamento com minociclina

Em nossos estudos investigações foi utilizada a minociclina (30mg/Kg i.p.; Sigma, St. Louis, USA) um anti-inflamatório, do grupo das tetraciclina, que devido a sua facilidade em atravessar a barreira hematoencefálica e agir como um bloqueador da ativação das microgлияs, é amplamente utilizado no combate às inflamações no SNC (KLEIN & CUNHA, 1995; STIRLING et al., 2005). A solução na qual a minociclina foi diluída foi preparada todos os dias, no momento de sua administração. Foram diluídas 30 mg de Minociclina para 1 ml de veículo (5 ml de água destilada + 5 ml de salina). Ao final da diluição o pH foi medido e ajustado para 7,4. Os ratos receberam via intraperitoneal 0.1ml dessa solução para cada 100g de peso corporal, uma vez ao dia.

3.3 Hipóxia Mantida (HM)

Os animais dos grupos controle e HM foram acondicionados em caixas individuais com ração e água *ad libitum* e mantidos em câmaras semelhantes às descritas no item 3.3. O grupo HM foi exposto ao protocolo de hipóxia mantida, que consiste em 24 horas de injeção de gás nitrogênio (N₂ - White Martins, Brasil) com o objetivo de reduzir e manter a fração inspirada de O₂ (FiO₂) de 20,8% para 10%, durante todo o período como representado na figura 1. Os ratos dos grupos controle foram mantidos em câmaras similares, porém em condições de normóxia ao longo de 24 horas.

Figura 1. Protocolo de hipóxia mantida. O grupo experimental foi submetido ao protocolo de hipóxia mantida (esquerda) por 24 horas e os animais do grupo controle foram mantidos em condições de normóxia (direita) durante o mesmo período.

3.4 Experimentos *in vivo*

3.4.1 Avaliação dos parâmetros cardiovasculares em animais não anestesiados e com livre movimentação

Os animais foram anestesiados por meio da administração intraperitoneal de uma mistura de ketamina (45 mg/Kg – Agener União, Brasil) + xilasina (5 mg/Kg – Hertape Calier, Brasil) e um cateter (PE-10 conectado a PE-50, Clay Adams, Parsippany, EUA) foi implantado na aorta abdominal por meio da artéria femoral, para o registro direto da pressão arterial pulsátil (PAP). Ao final da cateterização a cânula foi cuidadosamente exteriorizada no dorso do animal. Após a cirurgia, foi administrada intramuscularmente 1mg/kg de peso corporal do analgésico e antitérmico fluxina meglumina (Banamine, Schering-Plough) como medida profilática.

Os animais tiveram um dia de recuperação da cirurgia e foram posicionados nas câmaras de hipóxia ou controle por 24 horas. Após esse período o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT0380, ADInstruments, Bella Vista, Austrália), que por sua vez, estava conectado a um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os sinais de pressão arterial foram adquiridos por um sistema de aquisição de dados (PowerLab 4/25, ML845,

ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e registrados por um computador utilizando o software LabChart versão 5.0 (Chart Pro, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) a uma frequência de aquisição de 1 kHz. Após um período de adaptação de aproximadamente 10 minutos os parâmetros cardiovasculares foram registrados em ratos com livre movimentação em condições de normóxia durante 40 min. Os valores de pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos a partir dos sinais da PAP.

3.5 Experimentos in situ com neurônios do NTS

3.5.1 *Cirurgia para marcação dos neurônios NTS que se projetam para a superfície ventral do bulbo (VLM)*

Com o objetivo de identificarmos os neurônios do NTS que enviam projeções para a superfície ventral do bulbo, utilizamos a técnica de marcação retrógrada. Para isso os ratos foram anestesiados por meio da injeção intraperitoneal de quetamina (45 mg/Kg – Agener União, Brasil) + xilasina (5 mg/Kg – Hertape Calier, Brasil). Após a anestesia os animais foram depilados na região dorsal da cabeça e fixados em um aparelho esterotáxico para pequenos animais (David-Kopf, EUA) por meio de duas barras auriculares.

Após a assepsia da pele foi feita uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo-se então, a calota craniana dos ratos. A torre do aparelho estereotáxico foi colocada na posição vertical e ajustada até o ponto lambda que representou o nosso ponto de referência para a leitura dos parâmetros antero-posterior (AP), lateral (L) e dorso-ventral (DV). O ponto para a introdução da cânula injetora foi padronizado e adaptado ao tamanho dos nossos animais, utilizando-se como referência as coordenadas estereotáticas obtidas no Atlas de PAXINOS, (2006). Os parâmetros utilizados para o implante das cânulas-guia em direção a VLM foram os seguintes: ântero-posterior -2,9; Lateral +1,7; dorso-ventral -8,8 mm em relação ao Lambda.

Após a determinação do ponto de introdução da microinjetora foi feita a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por meio dessa pequena abertura foi introduzida a agulha injetora e foram injetados unilateralmente, na região correspondente ao VLM, 50 nL de solução do marcador retrógrado Green Beads

(LumaFluor, EUA; figura 2). Os animais foram retirados do estereotáxico e como medida profilática receberam 0,2 mL de pentabiótico veterinário 1.200.000 UI/3 mL (Penicilina e Estreptomicina, Fontoura-Wyeth, Brasil). A seguir os animais foram colocados em caixas individualizadas, com água e ração “ad libitum” e mantidos em sala climatizada pelo período de 7 dias.

Figura 2: Esquema ilustrativo mostrando a aplicação do traçador Green Beads na região ventral do bulbo (VLM) e a sua migração retrógrada para o corpo celular dos neurônios do Núcleo do Trato Solitário (NTS).

3.5.2 Registros eletrofisiológicos dos neurônios do NTS-VLM utilizando a técnica de Whole Cell Patch-Clamp

Ao final de 24 horas de HM ou situação de normóxia (controle) os animais foram removidos das câmaras e decapitados com guilhotina. O tronco cerebral foi rapidamente exposto, removido e imerso em solução gelada ($\sim 0^{\circ}\text{C}$) de fluido cérebro-espinhal artificial (aCSF) contendo (em mM): NaCl, 125; KCl, 2,5; MgCl_2 , 1; NaH_2PO_4 , 1,25; NaHCO_3 , 25; glicose, 25 e CaCl_2 , 2. Essa solução foi continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% O_2 + 5% CO_2), para oxigenação e manutenção do pH em 7,4, e osmolalidade entre 300 e 320 mOsm/Kg. H_2O .

Utilizando-se um vibrátomo (Leica VT 1200S, Alemanha) foram obtidas fatias coronais (250 μ m) do tronco cerebral contendo o NTS e o TS para os registros eletrofisiológicos, bem como fatias contendo a região da VML para confirmação histológica do sítio de injeção do traçador Green Beads. As fatias foram incubadas em aCSF a 31°C durante 30 minutos e após esse período permaneceram a temperatura ambiente. Durante os experimentos as fatias foram transferidas para uma câmara de registro com temperatura controlada (TC-324B/344B, Warner Instruments, EUA) e foram continuamente perfundidas com aCSF borbulhado com mistura carbogênica (2-3 mL/minuto).

As fatias foram posicionadas na câmara de registro e fixadas por meio de uma rede de fios de *nylon* montada sobre uma armação de platina e os neurônios foram visualizados por meio de um microscópio “Upright” de fluorescência com iluminação oblíqua (model BX51WI, Olympus, Japão) acoplado a uma câmera sensível aos comprimentos de onda próximos ao infravermelho (C10600 Orca R2, Hamamatsu Photonics, Japão). Inicialmente, sob microscopia de fluorescência realizamos a confirmação histológica do sítio de injeção do traçador Green Beads, e os experimentos com neurônios do NTS foram realizados apenas quando a histologia foi considerada positiva, ou seja, quando o sítio de injeção encontrava-se na região da VLM. Após a confirmação histológica, localizamos em fatias contendo a região do NTS, os neurônios com aspecto viável e posteriormente identificamos sob microscopia de fluorescência quais desses neurônios apresentavam marcação fluorescente no corpo celular. Somente neurônios que apresentaram marcação foram utilizados durante os experimentos.

As correntes e o potencial de membrana foram registrados por meio da técnica de *whole cell patch-clamp* (SAKMANN & NEHER, 1984). Microeletrodos de borosilicato de vidro (Sutter Instruments, EUA) foram confeccionados usando-se um estirador horizontal (P-97 puller, Sutter Instruments, EUA) e foram preenchidos com solução de pipeta contendo (mM): gluconato de potássio, 130; KCl, 20; Mg-ATP, 2; Na-GTP, 0,3; etileno glicol ácido tetracético (EGTA), 5; *N*-2-hydroxy-ethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulphonic acid (HEPES), 10; fosfocreatina dissódica, 10; pH 7,3 ajustado com KOH, com osmolalidade final entre 310 e 320 mOsm/Kg.H₂O e resistência de ponta entre 3 e 6 M Ω .

Uma pressão positiva e constante foi aplicada na luz do microeletrodo de registro, durante o período em que a pipeta se aproximava ao corpo celular com o

objetivo de evitar a adesão de qualquer partícula a ponta da pipeta e afastar as impurezas localizadas próximas ao corpo celular o que poderia impossibilitar o contato correto entre a ponta da pipeta e a membrana célula. Após a ponta do microeletrodo encostar na membrana, a pressão positiva foi rapidamente interrompida e foi aplicada uma pressão negativa que possibilitou o estabelecimento da configuração *cell-attached*, que é caracterizada pela resistência entre o eletrodo e a membrana celular maior do que 1 GΩ. Posteriormente, uma nova aplicação de pressão negativa foi aplicada ao eletrodo e após o rompimento da membrana celular a configuração *whole-cell* foi obtida, a qual é caracterizada pelo aparecimento das correntes capacitivas da membrana.

Os neurônios foram mantidos em um potencial de repouso de -70 mV e os registros foram realizados somente após um período de estabilização de 5 minutos depois da obtenção da configuração *whole-cell*. Os sinais foram adquiridos utilizando-se um amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, EUA) conectado a um computador via a interface analógico/digital-digital/analógico (DIGIDATA 1440, Molecular Devices, EUA). O software pClamp 10 (Molecular Devices, EUA) foi utilizado para a aquisição dos sinais e análise dos resultados. A resistência em série (<30 MΩ) foi verificada regularmente durante os experimentos e as células que apresentaram aumento superior a 20% foram descartadas.

3.5.3 Estímulo elétrico do Trato Solitário (TS)

Um eletrodo bipolar concêntrico de aço inoxidável (Frederick Haer Company, EUA) foi posicionado sobre o TS ipsilateral ao neurônio registrado (ALMADO et al., 2012). O eletrodo foi conectado a um estimulador com isolador de pulso (D2A, Digitimer, UK) o qual produziu os potenciais de estímulo (intensidade: 0 - 60V, duração: 0,3 ms) aplicados ao TS. O estimulador foi comandado pelo *software* de registro por meio da placa conversora analógico/digital-digital/analógico (DIGIDATA 1440, Molecular Devices, EUA).

3.6. Avaliação do mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL- 1 β , TNF- α e IL-6 no NTS

Essa etapa teve como objetivo avaliar o processo inflamatório desencadeado pela HM, e comprovar a efetividade do tratamento com a Minociclina. Avaliamos por meio da técnica de real time qRT-PCR (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR), a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 β (IL- 1 β) e Interleucina-6 (IL-6)], no NTS dos diferentes grupos experimentais. Para isso, animais representantes dos diferentes grupos experimentais foram decapitados e tiveram o tronco cerebral rapidamente removido. O material foi congelado à -20°C e utilizando um micrótomo de congelamento foram obtidos slices de 1000 μ m de espessura contendo a região do NTS. Posteriormente, com o auxílio de uma agulha de coleta (1mm de diâmetro) foram obtidos punches dessa região. O material coletado foi estocado a -80°C para posterior avaliação gênica pela técnica de real time qRT-PCR.

A extração do mRNA foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA) e kit para extração de RNA (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Foi adicionado 1 ml de Trizol nas amostras as quais foram posteriormente agitadas por 30 segundos na presença 200 μ l de clorofórmio (Sigma, St. Louis, USA) para cada 1 ml da suspensão. Após esse período, os tubos foram centrifugados e a fase aquosa foi transferida para um tubo novo, no qual foi adicionado etanol 70%. As amostras foram agitadas delicadamente e transferidas para uma coluna de afinidade para RNA. Após a lavagem, com tampões específicos, as amostras de RNA foram removidas da coluna com 20 μ l de água deionizada e livre de RNase, sendo armazenadas a -70° C, até a confecção do DNA complementar (cDNA). Na próxima etapa foi determinada a concentração de RNA total por meio de leitura em espectrofotômetro em filtro de 260 nm. A fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada por meio de transcrição reversa (RT-PCR) com oligo d(T)16 (Invitrogen, Carlsbad, USA) e utilizada para a quantificação da expressão dos genes de interesse (IL-6, IL-1 β , e TNF- α) e do gene de expressão constitutiva por PCR em tempo real utilizando TaqMan como repórter da amplificação.

3.7 Análise das células microgliais na região do NTS de ratos submetidos a HM

3.7.1 Fixação dos tecidos

Após 24 horas de HM ou normóxia os animais foram removidos das câmaras e a seguir foram anestesiados com uma solução de sódio pentobarbital (70 mg/kg i.p.; Cenvet Australia) e foram perfundidos através do coração com 400 ml de 0.1 M tampão fosfato (PBS) seguido pela fixação com 400 ml de uma solução gelada de paraformaldeído 4%. Após a fixação, o tronco cerebral foi removido e fixado *overnight* na mesma solução a 4 °C. No dia seguinte, utilizou-se um vibrátomo (VT1200S, Leica) para a obtenção de slices transversos do tronco cerebral contendo a região do NTS (40µm). Esses slices foram estocados em uma solução crioprotetora (30% sacarose, 30% etilennoglicol, 2% polivinilpirrolidona em 0.1M PBS) a 20 °C.

3.7.2 Imunohistoquímica

O processo de Imunohistoquímica foi realizado para a marcação da proteína *iodinized calcium binding adaptor molecule-1* (Iba-1) que é uma proteína ligante de cálcio especificamente encontrada em microglias e macrófagos (ITO et al., 1998). As fatias foram lavadas (3x30 min), em 0,1 M PBS contendo 0.3% Triton X- 100. Na sequência, foram incubadas por 48 horas com o anticorpo primário (Iba1, rabbit polyclonal, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Austrália, Cat# 019-19741) + TTPBSm (10 mM Tris–HCl, 0.1 M PBS, 0.9% NaCl, 0.3% Triton X-100 e 0.1% merthiolate com pH 7.4) + 10 % *donkey* soro (100 µL/pot) por 48h a 4 °C. Após esse período as fatias foram lavadas (3x30 min) em TPBS (10 mM Tris–HCl, 0.1 M PBS e 0.9% NaCl com pH 7.4). Então, os slices foram incubados overnight com o anticorpo secundário (Donkey anti-rabbit, Alexa Fluor 488-conjugated, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Austrália, Cat# 711-546-152) in TPBSm (10 mM Tris– HCl, 0.1 M PBS, 0.9% NaCl and 0.1% merthiolate at pH 7.4) com 2% de *donkey* soro em temperatura ambiente. Na sequência as fatias foram lavadas em TPBS (3x30 min) e posteriormente foram montadas sequencialmente em laminas de vidro (Thermo Fisher Scientific, Victoria, Australia), cobertas com Vectashield (H-1000, Vector Laboratories, CA, USA).

3.7.3 Aquisição de imagens e análises das microglias no NTS

As imagens das fatias do tronco cerebral foram adquiridas por meio de um microscópio Axio Imager Z2 (ZEISS, Germany). A região dorsal das fatias, onde está localizado o NTS, foi fotografada utilizando uma magnificação de 20x cobrindo uma área de 1028,20 μm x 583,60 μm . Todas as imagens foram exportadas para o software para análises biológicas ImageJ (NIH), e as análises foram realizadas utilizando a projeção de intensidade máxima de cada imagem. Uma área retangular abrangendo o NTS bilateralmente foi desenhada e padronizada para todas as fatias e utilizou-se um plugin de contagem de células para a avaliação do número de microglias na região do NTS. Para as análises morfológicas, as imagens foram esqueletonizadas e um plugin de análise de esqueleto foi utilizado para a contagem do número de ramificações celulares e o tamanho de cada ramificação, os quais foram normalizados pelo número total de microglias de cada fatia. Todas as análises foram realizadas “às cegas” por um pesquisador diferente daquele que realizou a aquisição das imagens, e os dados apresentados configuram uma média da análise de três fatias de cada animal.

3.8 Análise de dados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e apresentados em gráficos de dispersão de valores individuais. Os dados foram analisados utilizando a análise da variância de duas vias (ANOVA two-way) seguida pelo pós-teste LSD de Fisher. Foi realizado o teste de Grubbs para a identificação de *outliers* significativos nas amostras, e quando detectados, os mesmos foram eliminados das análises. Para a comparação das curvas de fração cumulativa utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov (KS). Os gráficos e a análise estatística foram feitos por meio do programa GraphPad Prism (versão 6, GraphPad, La Jolla, USA) considerando significância quando $P < 0,05$, ou seja, nível de significância de 5%.

3.9 Protocolos experimentais

3.9.1 A influência do processo inflamatório sobre as alterações cardiovasculares de animais submetidos HM por 24 horas.

O objetivo desse protocolo foi avaliar se as alterações cardiovasculares observadas em animais submetidos ao modelo da HM são dependentes de

processo inflamatório. Para isso, os animais foram divididos em 4 grupos: controle tratado com veículo, controle tratado com minociclina, HM tratado com veículo e HM tratado com minociclina. Os animais foram tratados por 3 dias com minociclina (30mg/kg, i.p) ou veículo (água destilada + salina). No segundo dia de tratamento todos foram anestesiados para o implante de um cateter em sua artéria femoral direita. Após um dia de recuperação os animais foram acondicionados nas câmaras de HM ou controle por 24h. Após esse período os parâmetros cardiovasculares foram registrados com os ratos acordados e com livre movimentação em condições de normóxia.

3.9.2 Influência do processo inflamatório induzido por HM sobre as propriedades intrínsecas e características sinápticas de neurônios do NTS que enviam projeções para a superfície ventral do bulbo (VLM).

Esse protocolo teve como objetivo investigar se o processo inflamatório desencadeado pela HM está relacionado com alterações na atividade dos neurônios do NTS que enviam projeções para a VLM, cujas terminações podem estabelecer contato sináptico com neurônios geradores das atividades simpática ou respiratória. Os neurônios do NTS que se projetam para a VLM foram identificados por meio da técnica de marcação retrógrada como descrito no item 3.6.1 (Figura 3) e tiveram um período de recuperação de 7 dias, suficiente para a migração retrógrada do traçador em direção ao corpo celular. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle veículo, controle minociclina, HM veículo e HM minociclina. O tratamento com minociclina ou veículo foi realizado do 5º ao 7º de dia de recuperação e a seguir os animais foram colocados nas câmaras de hipóxia ou controle por 24h. Ao final desse período os animais foram decapitados em guilhotina e a seguir o tronco cerebral foi removido para os experimentos com neurônios do NTS. Após a obtenção das fatias coronais do bulbo, foi realizada a verificação histológica do sítio de injeção do traçador Green Beads e os experimentos com neurônios marcados foram realizados apenas em animais cujo sítio de injeção do traçador estava restrito à região da VLM. Todos os experimentos eletrofisiológicos foram realizados por meio da técnica de *whole cell patch-clamp* seguindo os protocolos descritos abaixo.

3.9.3 Influência do processo inflamatório sobre as propriedades passivas da membrana de neurônios do NTS de ratos jovens submetidos à HM.

O objetivo desse protocolo foi avaliar se o processo inflamatório altera as propriedades passivas da membrana dos neurônios NTS de animais submetidos à HM. Para isso o potencial de repouso e a capacitância dos neurônios do NTS foram registrados após a obtenção da configuração *whole-cell*. A avaliação dos valores de capacitância da membrana foram estimados a partir do valor obtido pela compensação dos transientes capacitivos gerados por um pulso de 5mV. O potencial de membrana dos neurônios foi registrado em modo *current-clamp* sem que houvesse qualquer injeção de corrente (aproximadamente 4 segundos), na sequência foram injetadas correntes negativas (-12,5; -25; -37,5 e -50 pA) para o cálculo da resistência de entrada da membrana. Por meio da regressão linear a relação entre injeção de corrente e valores de potencial de membrana foi determinada e o valor do coeficiente angular da curva corresponde à resistência de entrada da membrana. Os valores de potencial de membrana em repouso, capacitância e resistência de entrada dos neurônios NTS de animais controle e HM tratados com veículo ou minociclina foram comparados.

Figura 3: Alterações no potencial de membrana de neurônios do NTS em resposta à injeção de correntes hiperpolarizantes. **A)** Desenho experimental utilizado. O potencial de membrana é inicialmente mantido em aproximadamente -70 e então são injetadas correntes negativas (-12,5; -25; -37,5 e -50 pA) para a avaliação da resistência de entrada da membrana. **B)** Traçado representativo mostrando as variações no potencial de membrana frente à injeção das correntes hiperpolarizantes.

3.9.4 Influência do processo inflamatório sobre as propriedades ativas de neurônios do NTS-VLM de ratos jovens submetidos à HM

Esse protocolo teve como objetivo verificar se a inflamação altera as propriedades ativas dos neurônios do NTS de animais submetidos à HM. Essa etapa foi realizada após ser adicionado no banho o DNQX (6,7-Dinitroquinoxalina-2,3-diona, 20 μ M), um antagonista dos receptores glutamatérgicos não- N-methyl-D-aspartato (NMDA), e a Picrotoxina (100 μ M), um antagonista dos receptores (Ácido Gama-Aminobutírico) GABA_A, com a finalidade de realizar o bloqueio sináptico e isolar os neurônios registrados de inputs excitatórios e inibitórios. Estes antagonistas foram eficientes em abolir completamente as correntes pós-sinápticas nos neurônios do NTS-VLM como descrito em estudos anteriores (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2009; ANDRESEN & YANG, 1990). Após a obtenção da configuração *whole-cell* em neurônios do NTS, no modo *current-clamp*, foram injetadas correntes positivas (+12,5; +25; +37,5; +50 e +62,5 pA) durante 200 ms e os valores do potencial de membrana foram registrados como ilustrado na figura 4. A relação entre a injeção de corrente positiva e o numero de potenciais de ação evocados foi determinada. Posteriormente foi realizada uma comparação entre o número de potenciais de ação induzidos pela injeção de corrente positiva nos neurônios do NTS de animais controle e HM tratados com minociclina ou veículo.

Figura 4: Traçados representativos mostrando os disparos de potenciais de ação de um neurônio do Núcleo do Trato Solitário em resposta a injeção de correntes despolarizantes (+12,5; +25; +37,5; +50 e +62,5 pA).

O gráfico de plano de fase foi utilizado para avaliar a cinética do potencial dos potenciais de ação. Essa análise foi realizada no primeiro potencial de ação disparado pela primeira corrente positiva injetada. Para isso foi calculada a derivada da voltagem com o tempo (dV/dt) e então foi construído um gráficos de dV/dt contra a voltagem. A partir desse gráfico foi obtido o valor máximo de dV/dt como uma estimativa da condutância máxima ao sódio (JENERICK, 1963), o limiar e a amplitude da hiperpolarização pós potencial de ação (HPA) . Consideramos como

limiar de disparo do potencial de ação o valor de voltagem no qual dV/dt variou mais que 10 V (GUDES et al., 2015).

3.9.5 Influência do processo inflamatório induzido pela HM sobre as correntes espontâneas totais (sPSCs) e correntes espontâneas excitatórias (sEPSCs) de neurônios do NTS.

Esse protocolo teve como objetivo verificar se a inflamação altera as características das sPSCs e sEPSCs de neurônios do NTS de animais submetidos à HM. Após a obtenção da configuração *whole-cell* em neurônios do NTS, no modo *voltage-clamp*, as sPSCs foram registradas por 1 minuto. Em seguida foi adicionado a Picrotoxina (100 μ M), um antagonista dos receptores GABAérgicos, para isolar as correntes excitatórias, e após 5 minutos as sEPSCs foram registradas durante 1 minuto. A amplitude, *frequência* e *half-width* das correntes foram comparadas entre animais controle e HM tratados com veículo ou minociclina.

Figura 5: Representação esquemática de uma transmissão sináptica evidenciando a liberação de um neurotransmissor e o método utilizado para o registro das correntes pós-sinápticas.

3.9.6 Estudo das correntes evocadas pelo estímulo elétrico do Trato Solitário.

Esse protocolo teve como objetivo avaliar os efeitos da HM e do tratamento com minociclina sobre a amplitude e depressão de curto prazo das correntes glutamatérgicas evocadas pelo estímulo do trato solitário em neurônios do NTS-

VLM. Para isso um eletrodo bipolar concêntrico de aço inoxidável (Frederick Haer Company, EUA) foi posicionado sobre o TS ipsilateral ao neurônio registrado (Figura 6). O eletrodo foi conectado a um estimulador com isolador de pulso (D2A, Digitier, UK) o qual produziu os potenciais de estímulo (intensidade: 0 - 99V, duração: 0,2 ms) aplicados ao TS. Após a obtenção da configuração whole-cell, no modo voltage-clamp, foram realizados cinco estímulos do TS na frequência de 10 Hz (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011) e foram registradas as correntes glutamatérgicas evocadas pelo estímulo do TS. Os experimentos foram realizados na presença de PicROTOXINA, um antagonista dos receptores GABA_A, o que nos permitiu a avaliação das correntes glutamatérgicas isoladas. Com esse protocolo foram avaliadas: a) A amplitude das correntes evocadas pelo estímulo do TS, b) o inverso do coeficiente de variação ao quadrado ($1/CV^2$) que é um parâmetro que fornece informações sobre a plasticidade sináptica, uma vez que alterações nessa variável está relacionada com alterações pré-sinápticas (BEKKERS & STEVENS, 1990), c) a cinética das TS-eEPSCs e d) a depressão na amplitude das correntes em resposta ao trem de 5 estímulos consecutivos do TS. Vale ressaltar que as avaliações da amplitude, $1/CV^2$ e da cinética das TS-eEPSCs foram realizada apenas nas correntes evocadas pelo primeiro estímulo do TS. A média dessas variáveis foi obtida para cada neurônio após pelo menos 15 repetições do protocolo nessas células.

Figura 6: Fotomicrografia de um corte coronal da porção dorsal do bulbo contendo a região do NTS. Pipeta de registro, seta amarela. Eletrodo de estímulo posicionado sobre o trato solitário, seta branca.

3.9.7 Estudo das correntes espontâneas em miniatura (mEPSC)

Após a avaliação das TS-eEPSC, foi acrescentado ao banho a tetrodotoxina (TTX 1 μ M), um bloqueador dos canais para sódio dependente de voltagem, para eliminar a influência do potencial de ação sobre a transmissão sináptica e assim registrar apenas as correntes pós-sinápticas decorrentes da liberação espontânea de neurotransmissores. Após 5 minutos da adição de TTX ao banho o trato solitário foi estimulado para confirmação da efetividade do TTX e em seguida foram realizados os registros das correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias em miniatura (msEPSC).

3.9.8 Estudo das TS-eaEPSCs uníquânticas obtidas por substituição do cálcio extracelular por estrôncio

Esse protocolo foi realizado com o objetivo de avaliarmos os efeitos da HM e do tratamento com minociclina sobre os terminais pós-sinápticos de neurônios NTS-VLM. Para isso, substituímos o cálcio (Ca^{2+}) extracelular por uma concentração equimolar de estrôncio (Sr^{2+}) com o objetivo de dessincronizar as TS-eEPSCs. O estrôncio se liga a sinaptotagmina, o sensor de cálcio das vesículas, com uma afinidade cinética diferente do cálcio, o que promove um padrão de liberação assíncrona, decompondo as TS-eEPSCs em correntes pós-sinápticas assíncronas de menor amplitude, possivelmente uníquânticas [(TS-eaEPSCs) ACCORSI-MENDONÇA; MACHADO, 2013; BEKKERS & CLEMENTS, 1999; ALMADO et al., 2012)]. Esse protocolo nos permitiu avaliar diretamente o componente pós-sináptico “ q ” que representa a corrente gerada por um quantum de neurotransmissor liberado. A amplitude das correntes dessincronizadas foi comparada entre animais controle e HM tratados com minociclina ou veículo.

3.9.9 Avaliação do mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL- 1 β , TNF- α e IL-6 no NTS

Nessa etapa, o objetivo foi caracterizar se a HM promove alterações na expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias: Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 β (IL-1 β) e Interleucina-6 (IL-6)], na região NTS e se o tratamento prévio com minociclina seria efetivo em prevenir essas alterações. Para isso, os animais representantes dos diferentes grupos experimentais foram expostos ao protocolo de HM ou normóxia e após esse período foram rapidamente

decapitados e tiveram o tronco cerebral removido. Posteriormente, com o auxílio de uma agulha de coleta (1mm) foram obtidos *punches* da região do NTS. A avaliação gênica das diferentes citocinas pró-inflamatórias foi realizada pela técnica de Quantitative Reverse Transcription PCR real time (qRT-PCR).

3.9.10 Análise da ativação microglial após à HM por 24 horas.

Por meio desse protocolo investigamos se a HM altera o número e a morfologia de células microgliais da região do NTS e avaliamos a eficácia do tratamento com minociclina como um bloqueador da ativação microglial. Para isso, animais representativos dos grupos controle e experimental foram perfundidos através do coração, primeiro com PBS (0,1M) e depois com paraformaldeído (PFA; 4%), e a seguir os cérebros foram removidos e fixados. Posteriormente o tratamento imuno-histoquímico foi realizado e as células microgliais foram avaliadas pela marcação da proteína IBA1. O número de microglias na região do NTS, e a morfologia dessas células (número e tamanho de ramificações celulares) foram avaliados e comparados entre os grupos.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento com Minociclina sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos submetidos a 24h de HM.

Por meio do registro direto da pressão arterial verificamos que tanto os animais tratados com o veículo (n=15) como os tratados com a minociclina (n=15) submetidos a HM apresentaram aumentos significativos da PAM (104 ± 2 e 96 ± 2 mmHg, respectivamente) quando comparados aos seus controles (veículo, n=16: 88 ± 2 mmHg e minociclina, n=16: 87 ± 2 mmHg; teste LSD de Fisher, $p<0,0001$ e $p=0,004$ respectivamente). Entretanto, o aumento da PAM nos animais tratados com minociclina foi menor que nos animais tratados com veículo [teste LSD de Fisher $p=0,01$ (figura 7 e figura 8 painel A)].

Também foi observado um aumento na PAS dos animais tratados com veículo submetidos à HM (134 ± 3 mmHg) em comparação ao seu grupo controle (116 ± 4 mmHg; teste LSD de Fisher, $p=0,0003$). Entretanto, esse aumento não foi observado entre os grupos tratados com minociclina (controle: 116 ± 3 , HM: 123 ± 3). A HM também promoveu aumento na PAD dos animais tratados com veículo (86 ± 2 mmHg) em relação ao seu controle (68 ± 2 mmHg; teste LSD de Fisher $p<0,0001$). Esse aumento também foi observado nos animais tratados com a minociclina (HM: 76 ± 2 vs controle: 69 ± 3 mmHg; teste LSD de Fisher, $p=0,04$). A PAS e PAD dos animais submetidos à HM foram menores nos animais tratados com minociclina que nos animais tratados com veículo [teste LSD de Fisher, PAS: $p=0,018$ e PAD: $p=0,006$ (figura 8 painéis B e C)].

Tantos os animais tratados com veículo como os tratados com minociclina submetidos à HM apresentaram aumentos significativos da FC (583 ± 13 e 571 ± 13 bpm, respectivamente) em relação aos seus controles (veículo 522 ± 11 bpm e minociclina 495 ± 12 bpm, teste LSD de Fisher, $p=0,008$ e $p<0,0001$ respectivamente). Em contraste com os outros parâmetros avaliados, não foram observadas diferenças na FC entre os animais tratados com veículo ou com minociclina (figura 8 painel D).

Figura 7. Registros cardiovasculares de um rato representativo de cada grupo experimental mostrando os traçados de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), e frequência cardíaca (FC).

Figura 8. Valores médios da PAM (painel A), PAS (painel B), PAD (painel C), e FC (painel D) de ratos controle e HM tratados com veículo ou minociclina, obtidos pelo método de medida direta da pressão arterial. *P < 0,05 diferente em relação ao controle #P < 0,05 diferente em relação ao veículo.

4.2 Experimentos com neurônios do NTS que se projetam para a região ventral do bulbo (NTS-VLM).

Os estudos eletrofisiológicos de neurônios marcados NTS-VLM, foram realizados com o objetivo de verificarmos a influência da HM e do tratamento com minociclina sobre as propriedades intrínsecas e a transmissão sináptica de neurônios possivelmente relacionados com a modulação cardiorrespiratória. Para isso, realizamos inicialmente a verificação histológica do sítio de injeção do traçador retrógrado *Green beads*, tendo como principais referências de localização a superfície ventral do bulbo, Núcleo Ambiguus e a Oliva Inferior [PAXINOS, (2006) (Figura 9, painéis A e B)].

Uma vez confirmado que o sítio de injeção estava localizado na região da VLM, verificamos no NTS os neurônios com aparência saudável, caracterizados por uma membrana refringente e ausência de nucléolo aparente. Após a identificação de neurônios com aspecto saudável, utilizamos a microscopia de fluorescência para distinguirmos quais destes apresentavam a marcação fluorescente. Dessa forma, os experimentos eletrofisiológicos foram conduzidos apenas nos neurônios identificados com a marcação retrógrada, isto é, neurônios do NTS que enviam projeções para a região da VLM (Figura 9, painéis C, D e E).

A) Sítio de injeção do traçador

B) Sub-regiões do NTS no sentido rostro-caudal

Neurônio marcado no NTS

Figura 9. Painel A: Representação esquemática de uma fatia coronal evidenciando a disposição espacial na superfície ventral do bulbo contendo o Núcleo Ambíguo (NA), a VLM e a Oliva Inferior (OI, modificado de Paxinos & Watson, *Elsevier*, 2006). Em destaque uma fotomicrografia da região ventral do bulbo evidenciando o sítio de injeção do traçador retrógrado revelado pela fluorescência do Green Beads na região da VLM. **Painel B:** sub-regiões do NTS em uma sequência de cortes coronais do bulbo no sentido rostro-caudal. **Painel C:** neurônio do NTS com aspecto saudável. **Painel D:** fluorescência observada nessa mesma região e **painel E:** sobreposição entre o neurônio mostrado em C e a fluorescência mostrada em D. AP: área postrema, TS: trato solitário.

4.2.1 Efeito da exposição a HM e do tratamento com Minociclina sobre as propriedades passivas de neurônios NTS-VLM.

A avaliação das propriedades de membrana dos neurônios NTS-VLM foi realizada por meio do estudo das propriedades passivas da membrana desses neurônios. Nesse cenário, não foram evidenciadas diferenças entre a capacitância dos neurônios dos ratos submetidos à HM tratados com o veículo ($10 \pm 0,8$ pF, $n=12$) ou tratados com minociclina ($10 \pm 0,7$ pF, $n=10$), quando comparados com seus respectivos controles [$11 \pm 0,9$ ($n=11$); 10 ± 1 ($n=11$) pF]. O mesmo foi observado para a resistência de entrada [Cont. veic.: 1204 ± 106 M Ω ($n=10$); Cont. mino.: 1343 ± 177 M Ω ($n=11$); HM veic.: 1225 ± 180 M Ω ($n=12$); HM mino.: 1679 ± 191 M Ω ($n=9$)] e para o potencial de repouso da membrana [Cont veic.: -75 ± 4 mV ($n=9$); Cont min.: -70 ± 2 mV ($n=11$); HM veic.: -71 ± 3 mV ($n=11$); HM mino.: -80 ± 4 mV ($n=10$)] como ilustrado na figura 10.

Figura 10: Propriedades passivas de neurônios do NTS-VLM de ratos controle e HM tratados com veículo ou minociclina. **Painel A:** Relação entre a injeção de corrente e a voltagem da membrana (gráfico V x I) ilustrando o método utilizado para o cálculo da resistência de entrada da membrana (*Rinput*). **Painel B:** Traçado representativo evidenciando o potencial de repouso da membrana (vermelho) e sua alteração frente a injeção de corrente negativa. **Painel C:** Valores médios da capacitância. **Painel D:** Potencial de repouso da membrana e **Painel E:** Resistência de entrada de neurônios do NTS-VLM de animais controle e HM tratados com veículo ou com Minociclina.

4.2.2 Efeito da exposição a HM e do tratamento com Minociclina sobre as propriedades ativas de neurônios NTS-VLM.

O estudo das propriedades ativas dos neurônios NTS-VLM foi realizado na presença de bloqueio sináptico (picrotoxina e DNQX) para evitar possíveis influências da rede sináptica nas variáveis analisadas. Por meio de injeções de corrente positivas de amplitude crescentes, verificamos inicialmente, o número de potenciais de ação disparado pelos neurônios dos animais dos diferentes grupos experimentais. Nossos resultados evidenciaram que nem a exposição a HM nem o tratamento com a Minociclina alteraram o número de disparos de potencial de ação dos neurônios dos diferentes grupos experimentais (Cont. veic.: n=12; Cont. Min.: n=11; HM veic.: n=10 e HM Mino.: n=9), como apresentado na figura 11 e na tabela 1. Também não observamos alterações entre os diferentes grupos em relação ao limiar, condutância máxima do sódio e amplitude da hiperpolarização posterior ao potencial de ação (tabela 2), essas variáveis foram calculadas por meio do plano de fase como descrito no protocolo experimental 3.9.4 e ilustrado na figura 12.

Tabela 1. Média $\pm$ erro padrão da média do número de disparos de potencial de ação de neurônios do NTS de cada grupo experimental frente à injeção de correntes despolarizantes.

Grupo	0 pA	12,5 pA	25 pA	37,5 pA	50 pA
Controle veículo	3 $\pm$ 2	17 $\pm$ 6	27 $\pm$ 8	31 $\pm$ 9	32 $\pm$ 11
Controle minociclina	0.3 $\pm$ 0.2	6 $\pm$ 2	20 $\pm$ 6	31 $\pm$ 8	35 $\pm$ 10
HM veículo	3 $\pm$ 2	16 $\pm$ 5	28 $\pm$ 7	31 $\pm$ 8	35 $\pm$ 9
HM minociclina	0.17 $\pm$ 0.12	19 $\pm$ 4	34.6 $\pm$ 7	37 $\pm$ 9	33 $\pm$ 11

Figura 11: Valores da média de disparos de potencial de ação para cada amplitude de corrente despolarizante injetada nos neurônios NTS-VLM dos diferentes grupos experimentais.

Figura 12: Análise das propriedades ativas de neurônios de ratos controle e HM tratados com veículo ou minociclina. **Painel A:** Traçado representativo de um potencial de ação com algumas de suas características intrínsecas destacadas. **Painel B:** Plano de fase evidenciando as variações do potencial de membrana durante um potencial de ação. **Painel C:** Valores médios do Limiar **Painel D:** condutância máxima de sódio e **painel E:** Hiperpolarização após o potencial de ação.

Tabela 2. Média $\pm$ erro padrão dos valores das características intrínsecas do primeiro potencial de ação deflagrado pela primeira corrente hiperpolarizante injetada nos neurônios do NTS de cada grupo experimental.

Grupo	Limar (mV)	Na ⁺ máxima (mV/ms)	HPA (mV)
Controle veículo (n=7)	-53 $\pm$ 3	199 $\pm$ 13	-65 $\pm$ 1
Controle minociclina (n=7)	-52 $\pm$ 1	208 $\pm$ 30	-63 $\pm$ 1
HM veículo (n=8)	-52 $\pm$ 2	195 $\pm$ 31	-65 $\pm$ 2
HM minociclina (n=8)	-51 $\pm$ 2	190 $\pm$ 16	-68 $\pm$ 3

4.2.3 Efeito da exposição a HM e do tratamento com Minociclina sobre as correntes espontâneas pós-sinápticas totais (sPSCs) de neurônios do NTS-VLM.

Para investigarmos os efeitos da HM e do tratamento prévio com a minociclina sobre as características da rede sináptica dos neurônios do NTS-VLM, avaliamos inicialmente, as correntes espontâneas totais (sPSCs) no modo de voltage clamp (-70mV), nas quais estão incluídas as correntes inibitórias e excitatórias. Foi observado que o grupo de animais submetidos à HM tratados com o veículo apresentou aumento significativo na média da frequência das sPSCs (5 ± 1 Hz, n=10), quando comparado ao seu grupo controle ($0,9 \pm 0,2$ Hz n=12, teste LSD de Fisher $p < 0,0001$). Esse aumento não foi evidenciado nos animais submetidos à HM tratados com a Minociclina ($1,5 \pm 0,4$ Hz, n=8) em comparação ao seu grupo controle ($0,9 \pm 0,2$ Hz, n=10). Vale ressaltar que foram observadas diferenças significativas do ponto de vista estatístico entre a frequência das sPSCs de animais HM tratados com veículo ou com Minociclina (teste LSD de Fisher $p = 0,0003$). Não observamos diferenças entre os grupos em relação à amplitude (Cont. veic.: 25 ± 4 pA; Cont. Mino.: 21 ± 2 pA; HM veic.: 23 ± 2 pA; HM Mino.: 20 ± 2 pA) e *Half-width* das sPSCs

[Cont. veic.: $2 \pm 0,2$ ms; Cont. Mino.: $2,7 \pm 0,2$ ms; HM veic.: $2,8 \pm 0,3$ ms; HM Mino.: $28 \pm 0,3$ ms (figura 13)] .

Correntes espontâneas pós-sinápticas totais (sPSCs)

Figura 13: Correntes espontâneas totais dos neurônios do NTS-VLM de ratos submetidos à HM tratados com veículo ou minociclina. Painel **A**: registros de um neurônio representativo de cada grupo experimental. Note que há um aumento da frequência das sPSCs de animais HM tratados com veículo quando comparado com o controle, e que esse aumento não é observado em animais tratados com minociclina submetidos à HM. Painel **B**: Valores médios da frequência; Painel **C**: amplitude e Painel **D**: half-width das sPSCs dos neurônios

do NTS de animais controle e HM tratados com veículo ou com Minociclina. * $P < 0,05$ diferente do controle. # $P < 0,05$ diferente do veículo.

4.2.4 Efeito da exposição a HM e do tratamento com Minociclina sobre as correntes espontâneas excitatórias (sEPSCs) de neurônios do NTS-VLM.

Sabe-se que as aferências cardiorespiratórias estabelecem contato sináptico na região do NTS por meio de sinapses excitatórias (ACCORSI-MENDONÇA; & MACHADO, 2013). Portanto, direcionamos as nossas investigações a essas sinapses. Para isso, os experimentos conduzidos na sequência, foram realizados na presença do antagonista gabaérgico picrotoxina.

Os registros das sEPSCs evidenciaram que a HM promoveu uma redução no intervalo inter-evento entre essas correntes nos neurônios de animais HM tratados com veículo, em relação a todos os outros grupos experimentais, como evidenciado na curva de fração cumulativa [figura 14, painel B (teste de Kolmogorov–Smirnov, HM veíc vs cont. veíc., $p < 0,0001$; HM veíc. vs HM mino., $p < 0,0001$; HM veíc vs cont mino., $p < 0,0001$)], no mesmo sentido, observamos um aumento da frequência, amplitude e *half-width* das sEPSCs nos animais HM tratados com o veículo ($4,1 \pm 0,8$ Hz; 26 ± 2 pA; $3,1 \pm 0,3$ ms; $n=15$, respectivamente) quando comparado ao seu grupo controle ($1,3 \pm 0,3$ Hz, LSD de Fisher, $p=0,0001$; 16 ± 2 pA, LSD de Fisher, $p=0,001$; $2 \pm 0,5$ ms, LSD de Fisher, $p=0,0005$; $n=18$). Entretanto, esse aumento não foi observado nos animais tratados com minociclina submetidos à HM (Frequência: $0,15 \pm 0,4$ Hz, Amplitude: 16 ± 2 pA: *half-width*: $2,6 \pm 0,3$ ms $n=13$) em comparação ao seu grupo controle (Frequência: $0,9 \pm 0,1$ Hz, Amplitude: 22 ± 2 pA: *half-width*: $2,5 \pm 0,2$ ms $n=13$) como ilustrado na figura 14 painéis D, E e F. Os valores de frequência e amplitude foram significativamente menores nos animais HM tratados com minociclina quando comparados aos do grupo HM tratado com veículo (LSD de Fisher, Frequência: $p=0,007$; amplitude: $p=0,003$)

Correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias (sEPSCs)

Figura 14: Correntes espontâneas excitatórias (sEPSCs) dos neurônios do NTS-VLM de ratos submetidos à HM tratados com veículo ou minociclina. **Painel A:** registros de um neurônio representativo de cada grupo experimental. Observe o aumento da frequência das sEPSCs de animais HM tratados com veículo em relação aos demais grupos experimentais. **Painel B:** Fração cumulativa do intervalo inter-evento das sEPSCs. **Painel C:** Valores médios da frequência; **Painel D:** amplitude e **Painel E:** half-width das sEPSCs dos neurônios do NTS-VLM de animais controle e HM tratados com veículo ou com Minociclina. * $P < 0,05$ diferente do controle. # $P < 0,05$ diferente do veículo.

4.2.5 Efeitos da HM e do tratamento com Minociclina sobre as correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias em miniatura (msEPSCs).

As correntes pós-sinápticas espontâneas em miniaturas, foram registradas na presença do bloqueador de canais para sódio dependente de voltagem TTX, portanto, as mesmas não são influenciadas pelos potenciais de ação. Esse protocolo nos permitiu avaliar se as alterações observadas nas correntes espontâneas excitatórias eram dependentes de potenciais de ação ou se refletiam alterações na liberação espontânea de vesículas.

Foi observado que o grupo de animais submetidos a HM tratados com veículo ou com minociclina apresentaram uma redução no intervalo inter-evento das msEPSCs em relação aos seus respectivos controles, representado graficamente pela curva de fração cumulativa [figura 15, painéis B e D (teste de Kolmogorov–Smirnov, HM veíc. vs cont. veíc., $p < 0,0001$; HM mino. vs cont. mino., $p < 0,001$)]. Entretanto, não observamos aumento na frequência das msEPSCs dos animais veículo e minociclina submetidos a HM [HM veic: $2 \pm 0,4$ Hz ($n=9$); HM mino: $2 \pm 0,5$ Hz ($n=7$)] em relação aos seus respectivos grupos controle [Cont. veic.: $1 \pm 0,7$ Hz ($n=8$); Cont. mino: $0,8 \pm 0,1$ Hz ($n=6$)]. Também não observamos qualquer diferença entre os grupos no que se refere à amplitude (Cont veic: 15 ± 2 pA; Cont mino: 20 ± 5 pA; HM veic: 27 ± 3 pA; HM mino: 21 ± 4 pA) e *Half-width* das msEPSCs [Cont. veic.: $2 \pm 0,2$ ms; Cont. mino.: $2 \pm 0,4$ ms; HM veic.: $2 \pm 0,3$ ms; HM mino.: $2 \pm 0,2$ ms] como representado na figura 15, painéis D, E e F.

Figura 15: Correntes espontâneas excitatórias em miniatura (msEPSCs) dos neurônios do NTS-VLM de ratos submetidos à HM tratados com veículo ou minociclina. **Painel A:** registros de um neurônio representativo de cada grupo experimental. **Painel B:** Fração cumulativa do intervalo inter-evento das msEPSCs. **Painel C:** Valores médios da frequência; **Painel D:** amplitude e **Painel E:** half-width das sEPSCs dos neurônios do NTS-VLM de animais controle e HM tratados com veículo ou com minociclina.

4.2.6 Efeitos da HM e do tratamento com Minociclina sobre as correntes pós-sinápticas excitatórias evocadas pelo estímulo do trato solitário (TS-eEPSCs).

Como mencionado anteriormente, as respostas cardiovasculares e respiratórias desencadeadas por situações de hipóxia, ocorrem por meio da ativação dos quimiorreceptores periféricos cujas fibras aferentes chegam ao SNC por meio do trato solitário (TS) e estabelecem o primeiro contato sináptico com os neurônios dos NTS (DONOGHUE et al., 1984, ANDRESEN & KUNZE, 1994). Nesse cenário, nos próximos protocolos nos dedicamos a investigar a neurotransmissão excitatória evocada pelo estímulo elétrico do trato solitário, como uma forma de simular a neurotransmissão que ocorre durante a ativação de um reflexo cardiovascular.

Os dados evidenciaram que a HM promoveu um aumento da amplitude das eEPSCs evocadas pelo primeiro estímulo do TS em neurônios NTS-VLM dos animais tratados apenas com o veículo (352 ± 67 pA; $n=12$) em comparação ao seu grupo controle (168 ± 21 pA; $n=13$, LSD de Fisher, $p < 0,0001$). Esse aumento não foi observado em animais HM tratados com a minociclina (189 ± 41 pA; $n=14$) quando comparado ao seu grupo controle (124 ± 21 pA; $n=10$). Nota-se ainda, que a amplitude das TS-eEPSCs foi significativamente menor nos neurônios dos animais HM tratados com o anti-inflamatório quando comparado aos animais tratados com o veículo (LSD de Fisher, $p < 0,0001$). A curva da fração cumulativa da amplitude das TS-eEPSC de ratos HM veículo apresentou-se deslocada para a direita, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos experimentais [Figura 16, painel C (teste de Kolmogorov–Smirnov, HM veíc vs cont. veíc., $p=0,0007$; HM veíc. vs HM mino., $p=0,002$; HM veíc vs cont mino., $p < 0,0001$). Essas alterações estão evidenciadas na figura 16, painéis A e B. Diante desses resultados, foram conduzidas na sequência, diferentes análises das TS-eEPSCs a fim de investigarmos os possíveis mecanismos relacionados a essas alterações. Um aumento da amplitude das TS-eEPSCs poderia ser explicado por diferentes alterações na transmissão sináptica, incluindo fenômenos pré-sinápticos, como aumento da probabilidade de liberação (*Pr*) ou número de sinapses ativas (*n*) e fenômenos pós-sinápticos como aumento do número de receptores na membrana pós-sináptica (DEL CASTILLO & KATZ, 1954; OLIET et al., 1996).

Para cada neurônio estudado, registramos ao menos 10 TS-eEPSCs, o que nos permitiu calcular o coeficiente de variação da amplitude dessas correntes. O

inverso do quadrado do coeficiente de variação ($1/CV^2$) é uma variável que pode trazer importantes informações sobre a da plasticidade sináptica, uma vez que alterações em $1/CV^2$ geralmente estão relacionadas a alterações de ***Pr*** ou ***n*** (Bekkers & Stevens, 1990). Em nossos estudos, nenhuma alteração foi observada em relação ao $1/CV^2$ dos diferentes grupos experimentais [(Cont. veic.: 35 ± 8 (n=13); Cont. mino.: 31 ± 6 (n=9); HM veic.: 33 ± 9 (n=11); HM mino.: 22 ± 3 (n=14); Figura 16, painel C].

Também não observamos qualquer alteração na cinética das TS-eEPSCs em relação ao *half-width* [(cont. veic.: $6 \pm 0,5$ ms (n=12); HM veic.: $6 \pm 0,7$ ms (n=11); cont. mino.: $7 \pm 0,4$ ms (n=10); HM mino.: $6 \pm 0,3$ ms (n=14)] *rise time* [(cont veic.: $2,2 \pm 0,2$ ms; HM veic.: $2,3 \pm 0,2$ ms; cont mino.: $2,4 \pm 0,2$ ms; HM mino.: $2,3 \pm 0,1$ ms)] e *decay time* (cont. veic.: 9 ± 1 ms; HM veic.: 12 ± 2 ms; cont. mino 12 ± 1 : ms; HM mino: 12 ± 1 ms) como ilustrado na figura 16.

Correntes pós-sinápticas excitatórias evocadas pelo estímulo do trato solitário (TS-eEPSCs)

Figura 16. Correntes pós-sinápticas excitatórias evocadas pelo estímulo do trato solitário (TS-eEPSC) de neurônios do NTS-VLM de ratos submetidos a HM. **Painel A:** registros das TS-eEPSC de neurônios representativos de cada um dos 4 grupos experimentais estudados evidenciando o aumento na amplitude das TS-eEPSC no neurônio de um animal HM veículo (seta). **Painel B:** Valores médios da amplitude. **Painel C:** Fração cumulativa da amplitude das TS-eEPSC e **Painel D:** Valores médios do $1/CV^2$ das TS-eEPSC dos neurônios do NTS de animais controle e HM tratados com veículo ou com minociclina. * $P < 0,05$ diferente em relação ao controle. # $P < 0,05$ diferente em relação ao veículo.

Figura 17. Propriedades cinéticas das TS-eEPSCs. **Painel A:** Traçado de uma TS-eEPSCs e suas características cinéticas representadas graficamente. **Painel B:** Valores médios do half-width; **Painel C:** rise time e **Painel D:** decay time das TS-eEPSCs dos neurônios do NTS-VLM de animais controle e HM tratados com veículo ou com minociclina.

4.2.7 Análise da influência da HM e do tratamento com minociclina sobre a depressão de curto prazo das TS-eEPSCs em neurônios NTS-RVL.

A avaliação da depressão de curto prazo das TS-eEPSCs pode fornecer indicativos sobre a **Pr** de uma sinapse, uma vez que, em sinapses com alta **Pr** mais vesículas liberam neurotransmissor a cada estímulo, e assim o *pool* vesicular é depletado rapidamente. Posto isso, se o aumento da amplitude das TS-eEPSCs fosse consequência de um aumento na **Pr**, esperaríamos que a depressão de curto prazo fosse mais pronunciada nos neurônios do grupo HM veículo. A análise do perfil da depressão de curto prazo foi realizada por meio da aplicação de um trem de 5 estímulos com frequência de 10 Hz ao TS. As amplitudes das correntes evocadas foram normalizadas pela amplitude média da primeira TS-eEPSCs de cada neurônio.

Os dados evidenciaram que o decaimento da amplitude das TS-eEPSCs foi semelhante entre os 4 grupos experimentais para cada estímulo do TS realizado, evidenciando que a HM e o tratamento com minociclina não alteram a depressão de curto prazo dessas correntes, como demonstrado na tabela 3 e na figura 18. As falhas das TS-eEPSCs foram computadas no cálculo da média da amplitude dessas correntes. Foram consideradas como falhas, correntes que apresentavam amplitude menor que a média do ruído mais dois desvios padrão. Contudo, vale ressaltar que o índice de falhas foi extremamente baixo para ambos os grupos experimentais, como evidenciados na tabela 4.

Tabela 3. Valores da porcentagem média de decaimento das TS-eEPSCs resultantes de um trem de 5 estímulos com frequência de 10 Hz ao TS.

GRUPOS	Amplitude relativa (%)				
	stim1	stim2	stim3	stim4	stim5
Controle veículo (n=13)	100	72±6	62±6	58±4	52±6
Controle Minociclina (n=10)	100	63±8	55±8	51±8	47±8
HM veículo (n=12)	100	79±4	74±6	65±5	63±6
HM Minociclina (n=12)	100	67±6	62±6	54±7	53±7

Figura 18. Depressão de curto prazo das TS-eEPSCs. **Painel A:** Registro representativo das eEPSCs resultantes de um trem de 5 estímulos com frequência de 10 Hz ao TS. **Painel B:** representação gráfica dos valores da porcentagem média de decaimento das TS-eEPSCs em relação a primeira corrente evocada em neurônios NTS-VLM de animais controle e HM tratados com veículo ou com minociclina.

Tabela 4. Valores da porcentagem de falhas das TS-eEPSCs.

GRUPOS	Porcentagem de falhas				
	stim1	stim2	stim3	stim4	stim5
Controle veículo	0±0	0±0	0,5±0,5	0±0	1,7±1
Controle Minociclina	0±0	0,4±0,4	1,1±0,7	1,5±1	1,2±0,8
HM veículo	0,3±0,3	0,3±0,3	0,3±0,3	0,7±0,7	0,3±0,3
HM Minociclina	0±0	0±0	0,5±0,5	0,5±0,5	0±0

4.2.8 Estudo das TS-eaEPSCs assíncronas (TS-eaEPSCs) obtidas por substituição do cálcio extracelular por estrôncio (Sr^{2+})

O resultado das nossas avaliações de $1/\text{CV}^2$ e da depressão de curto prazo, fornecem evidências de que o aumento na amplitude das TS-eaEPSCs, observado em neurônios NTS-VLM de animais submetidos a HM tratados com o veículo, não foi proveniente de alterações pré-sinápticas. Por isso, na sequência avaliamos os possíveis efeitos da HM e o tratamento com minociclina, sobre os terminais pós-sinápticos dos neurônios NTS-VLM. Para isso, avaliamos as TS-eaEPSCs registradas após a substituição do cálcio (Ca^{2+}) extracelular por uma concentração equimolar de estrôncio [Sr^{2+}] figura 19, painel A], com o objetivo de dessincronizar as TS-eaEPSCs, em correntes possivelmente uniguânticas, como explicado em detalhes no item 3.9.8.

As correntes dessincronizadas na presença de Sr^{2+} (TS-eaEPSCS) foram avaliadas a partir de pelo menos 25 estímulos ao TS. Apenas foram consideradas para as análises as TS-eaEPSCS obtidas nos primeiros 200 ms subsequentes ao estímulo do TS. Essa janela temporal foi estabelecida com o objetivo de evitar que as análises fossem realizadas, erroneamente em correntes distintas das TS-eaEPSCS. A primeira TS-eaEPSCS evocada imediatamente após o estímulo do TS foi excluída das análises, uma vez que essa corrente apresenta frequentemente, maior amplitude que as demais e, portanto, não representaria uma corrente completamente decomposta.

Considerando que o nosso objetivo era avaliar as correntes uníquânticas, sendo essas as correntes de menor amplitude, analisamos a distribuição de frequência relativas das amplitudes das TS-eaEPSCs. Assim como observado anteriormente por ALMADO et al. (2012), verificamos que a soma de duas gaussianas descrevia de forma mais apropriada os dados que apenas uma gaussiana. Desse modo, ajustamos a função que representa a soma de duas gaussianas à distribuição das amplitudes das TS-eaEPSCs individuais de cada neurônio. Utilizamos para nossa análise o valor correspondente ao pico da primeira gaussiana das duas ajustadas, a qual representava a amplitude média das correntes uníquânticas. A figura 19 painel B apresenta a distribuição relativa média das amplitudes das TS-eaEPSCs de cada grupo experimental.

Observamos que a amplitude das TS-eaEPSCs foi maior nos animais HM tratado com veículo [(24 ± 3 pA (n=4)] em comparação com o grupo controle [11 ± 1 pA (n=4), teste LSD de Fisher, p=0,003]; esse aumento não foi evidenciado no grupo HM tratado com minociclina em relação ao seu controle [10 ± 1 pA (n=4) vs. controle minociclina 15 ± 3 pA (n=4), Figura 19, painéis B e C]. Ademais, a amplitude das TS-aeEPSCs foi significativamente menor nos animais HM tratados com minociclina em relação ao grupo HM tratado apenas com o veículo (teste LSD de Fisher, p=0,001).

Considerando que os valores da amplitude das correntes quantais (**q**) e da amplitude das TS-eEPSCs individuais de cada neurônio eram conhecidos, calculamos o conteúdo quântico (**m**) médio das TS-eEPSCs, isto é, o número médio de vesículas que compõe as TS-eEPSCs (equação 1).

$$m = \text{PSC}/q \quad (1)$$

A variável **m** é um produto de **n** e **Pr**. Portanto, alterações em **m** seriam oriundas de alterações nos parâmetros pré-sinápticos. Contudo, não observamos alterações significativas nos valores de **m** entre os diferentes grupos experimentais [Cont. veic.: 10±2 (n=4); Cont. mino.: 8±2 (n=4); HM veíc.: 14±3 (n=4); HM mino.: 15±4 (n=4)] como evidenciado no painel D da figura 19. Esses últimos dados reforçaram as evidências de que o aumento na amplitude das TS-eEPSCs não é proveniente de alterações pré-sinápticas.

Figura 19: Avaliação das correntes dessincronizadas (TS-eaEPSCs). **Painel A:** Traçado representativo ilustrando a dessincronização das TS-eEPSCs resultantes da substituição do cálcio [Ca^{2+} , esquerda] extracelular pelo estrôncio [Sr^{2+} , direita]. **Painel B:** distribuição relativa média das amplitudes das TS-eaEPSCs do grupo controle e HM tratados com veículo (esquerda) e dos grupos controle e HM tratados com minociclina (direita). **Painel C:** Valores médios da amplitude das eaEPSCs dos diferentes grupos experimentais. **Painel D:** Valores médios do conteúdo quântico (m), obtido pela divisão da amplitude média das TS-eEPSCs pela amplitude das correntes quantais (q) do neurônio correspondente. * $P < 0,05$ diferente em relação ao controle. # $P < 0,05$, diferente do veículo.

4.3 Efeitos da HM e do tratamento com Minociclina sobre a expressão do mRNA de citocinas pró-inflamatórias no NTS

Avaliamos a expressão do mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e a IL-6 em *punches* da região do NTS utilizando a técnica de Real Time qRT-PCR. Cada *pool* de *punches* continha amostras do NTS de 3 animais. Observamos um aumento significativo nos níveis do mRNA da IL-1 β no NTS de ratos tratados com veículo submetidos a HM ($3,5 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-4} 2^{-\Delta CT}$, $n=4$ *punches*, 12 animais) quando comparados ao grupo controle ($2 \cdot 10^{-3} \pm 5 \cdot 10^{-4} 2^{-\Delta CT}$, $n=3$ *punches*, 9 animais, teste LSD de Fisher, $p=0,01$) essa alteração não foi observada nos animais tratados com minociclina [HM: $2 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4} 2^{-\Delta CT}$, $n=3$ *punches*, 9 animais; Cont: $3,1 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4} 2^{-\Delta CT}$, $n=3$ *punches*, 9 animais]. Vale ressaltar que os níveis do mRNA da IL-1 β foi significativamente menor no grupo HM tratados com minociclina em comparação ao grupo HM tratado com veículo (teste LSD de Fisher, $p=0,01$). Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos em relação ao mRNA das citocinas TNF- α (Cont veic: $2,6 \cdot 10^{-3} \pm 5 \cdot 10^{-4} 2^{-\Delta CT}$; Cont Mino: $4 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3} 2^{-\Delta CT}$; HM veic: $1,7 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-4} 2^{-\Delta CT}$; HM Mino: $4,1 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3} 2^{-\Delta CT}$) e a IL-6 (Cont veic: $2,4 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-3} 2^{-\Delta CT}$; Cont Mino: $1,8 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-3} 2^{-\Delta CT}$; HM veic: $2,4 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4} 2^{-\Delta CT}$; HM Mino: $2,4 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-5} 2^{-\Delta CT}$), como ilustrado na figura 20.

Figura 20: Avaliação do mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 pela técnica de Real Time qRT-PCR no NTS de animais submetidos a HM. **Painel A:** Fotomicrografia de uma fatia coronal do tronco cerebral contendo a região do NTS evidenciando o local de onde foram obtidos os *punches* dessa região. Valores médios da quantificação do mRNA das citocinas IL-1 β (**Painel B**); TNF- α (**Painel C**) e IL-6 (**Painel C**) na região do NTS de animais controle e HM tratados com veículo ou com Minociclina. *P < 0,05, diferente em relação ao controle.

4.4 Avaliação das microglias na região do NTS de animais submetidos a HM.

A contagem de microglias marcadas pela proteína Iba-1 foi realizada às cegas por um pesquisador que desconhecia a qual grupo experimental pertencia cada fatia avaliada. Foram quantificadas três fatias do tronco cerebral (40 μm) de cada animal contendo a região do NTS intermediário (figura 21 do painel A). Avaliamos as microglias da região do NTS intermediário tendo em vista que a maioria dos experimentos eletrofisiológicos foram realizados em neurônios localizados nesta região (neurônios NTS-RVLM).

Foi definida uma área de contagem igual para todas as fatias analisadas, esta área cobriu o NTS intermediário bilateralmente. Para as análises, foram considerados os valores da média de três fatias quantificadas de cada animal. Observou-se que o número de microglias apresentou-se aumentado em ratos tratados com o veículo e submetido a HM (251 ± 13 , $n=3$) quando comparado ao grupo controle (185 ± 11 , $n=3$, teste LSD de Fisher, $p=0,009$). No entanto, este aumento não foi observado em animais submetidos a HM tratados com minociclina (209 ± 1) em relação ao seu grupo controle (197 ± 20), conforme ilustrado na figura 21 painéis B e C.

Figura 21: Microglias na região do NTS. **Painel A:** imagem de fluorescência evidenciando as microglias (verde) na região NTS identificadas pela imunofluorescência para o marcador microglial Iba-1. **Painel B:** Número médio de células microgлияis na região NTS de animais controle e HM tratados com veículo ou com minociclina. **Painel C:** Imagens em maior magnificação evidenciando a região do NTS de um animal representativo de cada grupo experimental. iNTS: NTS intermediário; CC: canal central; AP: Área postrema. * $P < 0,05$ diferente em relação ao controle.

Embora o número de microglias tenha aumentado nos animais veículo submetidos a HM, não foram encontradas diferenças entre os grupos em relação às características morfológicas avaliadas pela análise do esqueleto dessas células (figura 22, painel A), conforme demonstrado pela quantificação do número de ramificações / célula (figura 22, painel B, cont. Veic.: 32 ± 1 , cont. Mino: 34 ± 1 ; HM veic: 34 ± 1 ; HM Mino.: 34 ± 3), comprimento das ramificações (figura 22 painel C; cont.: veic: $9 \pm 0,3$; cont. Mino.: $8 \pm 0,3$; HM veic.: 10 ± 1 ; HM Mino.: 11 ± 1) e o número de *end points* (figura 22 painel D , cont. veic.: $21 \pm 0,8$; cont. mino: $22 \pm 0,4$; HM veic: $22 \pm 0,7$; HM Mino: 23 ± 1).

Figura 22. Características morfológicas das microglias na região NTS. **Painel A:** As imagens binárias das microglias foram "esqueletizadas" e analisadas com o plugin "AnalyzeSkeleton"; ramificações (laranja); *end points* (azul). **Painel B:** Número médio de ramificação / célula **Painel C:** comprimento das ramificações/célula. **Painel D:** Número médio de end points/ célula.

5. DISCUSSÃO

Diferentes evidências experimentais apontam que situações de hipóxia estão correlacionadas com o desencadeamento de hipertensão arterial neurogênica (ZOCCAL et al., 2007; MORAES et al., 2014). Um modelo de hipertensão que é caracterizado pelo aumento da pressão arterial decorrente de uma hiperatividade simpática (GUYENET, 2006; KUMAGAI et al., 2012). De fato, estudos em humanos e em modelos experimentais demonstraram os efeitos da exposição à hipóxia sobre o sistema cardiovascular. Estudos do nosso laboratório mostraram que ratos submetidos ao modelo de hipóxia mantida apresentam aumento da atividade simpática e da pressão arterial (MORAES et al., 2014). No mesmo sentido, humanos que experimentam a HM hipobárica observada em elevadas altitudes, apresentam dentre outras alterações fisiológicas, aumento da resistência vascular periférica, aumento da atividade simpática e consequentemente elevação da pressão arterial (HAINSWORTH & DRINKHILL, 2007; HANSEN & SANDER, 2003). Os nossos resultados, obtidos por meio da medida direta da pressão arterial pulsátil em ratos não-anestesiados, vão de encontro a esses achados, uma vez que os animais submetidos a 24 horas de HM apresentaram aumento significativo em todas as variáveis cardiovasculares avaliadas: PAM, PAS, PAD e FC.

Os possíveis mecanismos envolvidos nas alterações autonômicas desencadeadas pela HM tem sido alvo de estudo de diferentes grupos de pesquisa. Nesse cenário, uma série de evidências experimentais apontam que essas alterações poderiam ser oriundas de um aumento da excitabilidade das vias neurais que integram o quimiorreflexo. Nesse contexto, estudos mostraram que a sensibilidade das células glomus do corpúsculo carotídeo está aumentada em animais expostos a HM (POWELL, 2007; NIELSEN et al., 1988; CHEN et al., 2002). Há indicativos de que essa hipersensibilidade do corpúsculo carotídeo poderia ser resultante de alterações na expressão de canais iônicos nessas células, uma vez que a HM pode aumentar a densidade de canais de sódio (Na^+ ; STEA et al., 1992) e reduzir a densidade de canais de potássio (K^+) na membrana das células glomus (HEMPLEMAN, 1995), tendo como resultado um aumento da excitabilidade celular. Corroborando com esses achados, estudos de ACCORSI-MENDONÇA et al., (2015) evidenciaram que tanto o aumento da atividade simpática quanto da resposta respiratória à ativação do quimiorreflexo, apresentaram-se exacerbado após a exposição de ratos à HM de 24 horas. É importante ressaltar que o aumento da

quimiossensibilidade ou da atividade do corpo carotídeo poderiam induzir aumento da atividade simpática nesses animais, como evidenciado previamente em outros modelos de hipertensão (ABDALA et al., 2012; MARCUS et al., 2014).

Estudos anteriores do nosso laboratório também demonstraram que a HM promove aumento da frequência de disparos de potencial de ação de neurônios pré-simpáticos da VLM, e que esse aumento não estava associado a um aumento da excitabilidade intrínseca desses neurônios e sim a um aumento da neurotransmissão excitatória provenientes de outras regiões do SNC (MORAES et al., 2014). Também foi documentado, que os neurônios do NTS apresentam excitabilidade aumentada após a exposição a HM de curta duração, e que a neurotransmissão glutamatérgica está exacerbada nesses neurônios após a exposição à HM por 24 horas (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2015), bem como após a exposição crônica a esse modelo de hipóxia (ZHANG et al., 2009).

Os nossos resultados apresentam novas evidências sobre os mecanismos relacionados com a hipertensão induzida pela HM em ratos, indicando que o processo inflamatório desencadeado pela HM contribui para as alterações cardiovasculares observada nesses animais. Os ratos submetidos a HM previamente tratados com o anti-inflamatório minociclina, apresentaram PAM, PAS e PAD significativamente menores quando comparadas aos animais tratados apenas com o veículo. É importante ressaltar que não foi observada nenhuma diferença entre os parâmetros cardiovasculares dos grupos mantidos em normóxia tratados com o veículo ou com a minociclina, indicando que esse anti-inflamatório não possui efeitos sobre o sistema cardiovascular em situações fisiológicas.

A relação entre a HM e o desencadeamento de processos inflamatórios vem sendo demonstrada de forma consistente na literatura (HARTMANN et al., 2000; KUBO et al., 1998). Estudos de LIU et al. (2009) evidenciaram o aumento da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e do recrutamento de macrófagos no corpúsculo carotídeo de ratos submetidos à HM e que esse aumento de marcadores inflamatórios foi relacionado com o aumento da sensibilidade do corpúsculo carotídeo desses animais. Esses autores demonstraram ainda que o tratamento com anti-inflamatório foi eficiente em reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e impedir a invasão de células imunes nessa região o que resultou em atenuação da hipersensibilidade dos quimiorreceptores carotídeos. Também foi

evidenciado um aumento de citocinas pró-inflamatórias no NTS de ratos expostos a HM de curta duração (HOCKER et al., 2017) e na HM crônica (POPA et al., 2011).

De acordo com o exposto, a HM pode induzir um aumento de mediadores do processo inflamatório em regiões periféricas e no SNC. Diante disso, podemos concluir que a redução da hipertensão arterial observada em ratos tratados com a minociclina, poderia ser decorrente, pelo menos em parte, de uma redução da excitabilidade dos quimiorreceptores periféricos ou de efeitos desse anti-inflamatório no SNC. Contudo, os nossos experimentos com animais acordados não nos permitiu dissociar os efeitos centrais e periféricos da minociclina.

A despeito dos estudos mencionados, os quais evidenciaram os efeitos do processo inflamatório sobre as características intrínsecas e excitabilidade dos quimiorreceptores periféricos, pouco se sabe sobre a influência da inflamação desencadeada pela HM na neurotransmissão das vias neurais do quimiorreflexo. Nessa circunstância, considerando que o NTS é a primeira estação sináptica a receber informações oriundas dos quimiorreceptores periféricos e que o mesmo envia projeções para a VLM, região na qual estão localizados os neurônios geradores das atividades simpática e respiratória, as etapas subsequentes do nosso estudo foram direcionadas para a caracterização eletrofisiológica dos neurônios NTS de ratos submetidos a HM e tratados previamente com anti-inflamatório. A técnica de marcação retrógrada permitiu que os nossos estudos eletrofisiológicos ficassem restritos a neurônios do NTS que se projetam para a VLM e que possivelmente participam das vias neurais do quimiorreflexo.

Os registros eletrofisiológicos realizados por meio da técnica de *whole cell patch-clamp* mostraram que a capacitância, a resistência de entrada e o potencial da membrana em repouso não foram diferentes entre os grupos, indicando que a HM ou o tratamento com Minociclina não promovem mudanças nas propriedades passivas dos neurônios do NTS. Esses achados estão de acordo com estudos anteriores de ACCORSI-MENDONÇA et al., (2015), os quais documentaram que a HM de curta duração não altera as propriedades passivas dos neurônios não marcados do NTS. No mesmo sentido estudos anteriores de (ZHANG et al., 2008, 2009) evidenciaram que a HM crônica não altera as propriedades passivas dos neurônios do NTS que recebem projeções diretas do corpúsculo carotídeo.

Para avaliarmos as propriedades ativas dos neurônios do NTS que enviam projeções para a VLM (NTS-VLM), utilizamos um protocolo experimental no qual

diferentes amplitudes de corrente despolarizantes foram injetadas nos neurônios e quantificamos o número de potenciais de ação disparados. Além disso, avaliamos algumas características intrínsecas do primeiro potencial de ação deflagrado pela primeira amplitude de corrente injetada, tais como: limiar de disparo de PA, amplitude da hiperpolarização posterior ao potencial de ação bem como a região de maior variação de voltagem em função do tempo, (dV/dt_{max}), a qual representa a região de máxima condutância ao Na^+ (JENERICK, 1963). Essas análises foram importantes para extrairmos informações sobre possíveis alterações na excitabilidade dos neurônios NTS-VLM, bem como os efeitos da HM sobre a cinética e densidade de canais sensíveis a voltagem. Alterações na excitabilidade desses neurônios estão frequentemente relacionadas a alterações nas corrente iônicas de canais sensíveis a voltagem, destacando-se no contexto do NTS, as correntes transitórias de potássio (DEKIN & GETTING, 1987; SUNDARAM et al., 1997).

Nos nossos estudos não foram observadas alterações nas propriedades intrínsecas avaliadas, bem como no número de potencial de ação nos neurônios NTS-VLM de todos os grupos estudados, o que nos permite concluir que a HM e o tratamento com minociclina não alteram os elementos eletrogênicos desses neurônios e consequentemente não influenciam a excitabilidade dos mesmos. É importante salientar que, para avaliar a excitabilidade intrínseca dos neurônios, este protocolo experimental foi realizado na presença do antagonista de GABAA (Picrotoxina) e antagonista dos receptores glutamatérgicos não-NMDA (DNQX). Estes antagonistas farmacológicos aboliram completamente as correntes pós-sinápticas nos neurônios do NTS-VLM, como descrito em estudos anteriores (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2009; ANDRESEN & YANG, 1990). Portanto, assumimos que nas nossas condições experimentais os neurônios registrados estavam sinapticamente isolados. Estudos de Accorsi-Mendonça et al. (2015) mostraram que a HM aumentou a excitabilidade de neurônios não marcados do NTS associada a uma redução nas correntes de saída de potássio (IK_A), o mesmo foi observado em neurônios do NTS que recebem projeções diretas do corpúsculo carotídeo após a exposição a HM de uma semana (ZHANG et al., 2008). Os nossos resultados divergiram dos estudos mencionados. Considerando que esses experimentos foram realizados em grupamentos neuronais diferentes do estudado no presente trabalho, sugerimos que a HM pode afetar de forma distinta as propriedades ativas das diferentes subpopulações neuronais do NTS.

Embora os nossos resultados tenham evidenciado que a HM não promove alterações nas propriedades passivas e ativas nos neurônios NTS-VLM, foram encontradas diferenças significativas em relação a transmissão sináptica glutamatérgica nesses neurônios. Observamos que os neurônios NTS-VLM de animais tratados com veículo submetidos à HM apresentaram um aumento significativo na frequência das correntes espontâneas pós-sinápticas totais e excitatórias, associado a uma redução no intervalo inter-evento dessas últimas correntes. Esses resultados podem indicar que a HM promove as alterações nos terminais pré-sinápticos. De acordo com a teoria quântica da liberação de neurotransmissores, mudanças na probabilidade de liberação de neurotransmissores, número de sinapses ou o número de zonas sinápticas ativas podem afetar a função dos terminais pré-sinápticos (DEL CASTILLO & KATZ, 1954; REDMAN, 1990). Também observamos um aumento na amplitude e no *half-width* das correntes espontâneas excitatórias nesses neurônios. Esses resultados indicam que a hipóxia também promoveu alterações nos terminais pós-sinápticos, as quais poderiam ser explicadas, por exemplo, por um aumento na densidade ou na condutância dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos na membrana pós-sináptica (DEL CASTILLO & KATZ, 1954; NEHER & SAKABA, 2001).

Os nossos resultados mostraram que o tratamento com Minociclina foi eficaz na prevenção do aumento da frequência, amplitude e *half-width* das correntes espontâneas excitatórias induzidos pela HM. Esses achados dão suporte ao conceito de que a inflamação é parte dos mecanismos subjacentes às alterações na transmissão sináptica nos neurônios do NTS. Estudos em diferentes regiões do SNC obtiveram resultados semelhantes sobre os efeitos de mediadores inflamatórios na neurotransmissão espontânea. Estudos de KAWASAKI et al. (2008) evidenciaram em neurônios do corno dorsal da medula espinal, que as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α aumentam a neurotransmissão espontânea glutamatérgica nessa região, uma vez que neurônios perfundidos com essas citocinas apresentavam aumento pronunciado da frequência e da amplitude das sEPSCs. Estes achados são consistentes com estudos de GONZÁLEZ et al. (2007) que mostraram que a minociclina reduz a frequência de correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias e a liberação de glutamato em culturas de neurônios do hipocampo de ratos.

A liberação de neurotransmissores pelas terminações sinápticas pode ocorrer em resposta a um potencial de ação, ou pela fusão espontânea de vesículas na

membrana pré-sináptica (FATT & KATZ, 1952; RAMIREZ & KAVALLALI, 2011). Para investigar se esse aumento da frequência das sEPSCs era dependente dos potenciais de ação que chegavam às fibras aferentes nessa região ou se era devido a uma alteração nos mecanismos de liberação de neurotransmissores, nós avaliamos as sEPSCs na presença de TTX. Esse protocolo nos possibilitou eliminar a influência do potencial de ação sobre a neurotransmissão, e com isso, avaliar as correntes pós-sinápticas excitatórias glutamatérgicas do tipo miniatura. Essas correntes refletem propriedades basais da neurotransmissão, isso é, refletem a liberação quântica, a qual independe de potencial de ação (FATT & KATZ, 1952).

Nesses estudos verificamos uma redução no interalo inter-evento das msEPSCs, contudo essa observação não foi acompanhada de alterações significativas na frequência das msEPSCs. Tampouco observamos alterações na amplitude e no *half-width* dessas correntes. Esses resultados evidenciaram que as alterações observadas nas sEPSCs em neurônios do NTS-VLM de animais tratados com o veículo são dependentes dos potenciais de ação que chegam nas terminações nervosas que mantêm contato sináptico com esses neurônios. É importante destacar que essas alterações foram abolidas após o bloqueio dos canais de sódio dependente de voltagem pelo TTX. Vale ressaltar também que nenhuma diferença foi observada entre os neurônios de animais HM tratados com veículo ou com minociclina no que diz respeito aos parâmetros avaliados das msEPSCs, indicando que o efeito da minociclina, observado na ausência de TTX, está direcionado a neurotransmissão dependente de potencial de ação.

As nossas análises das msEPSCs indicaram que a HM e o tratamento com minociclina não promoveram alterações na maquinaria de liberação espontânea de neurotransmissores. Possíveis alterações nesses parâmetros poderiam estar relacionadas, por exemplo, a alterações na sinalização de cálcio, ou a modificações na atividade de proteínas do complexo SNARE, responsáveis pela fusão das vesículas às membranas dos neurônios pré-sinápticos (XU et al., 2009; RAMIREZ & KAVALLALI, 2011; WALTER et al., 2014). Vale salientar as evidências de que a neurotransmissão espontânea e a neurotransmissão dependente de potencial de ação envolvem mecanismos distintos, podendo ser originadas da liberação de conjuntos diferentes de vesículas. (SARA et al., 2005; RAMIREZ & KAVALLALI, 2011; SMITH et al., 2012).

Embora os estudos das correntes espontâneas tenham demonstrado que a HM aumentou a neurotransmissão glutamatérgica dependente de potencial de ação em neurônios NTS-VLM, não podemos inferir a respeito da origem dessa neurotransmissão, uma vez que a mesma poderia ter origem em interneurônios do próprio NTS ou de outras regiões centrais que mantém conexões com esse núcleo (CAI et al., 2007; ROSIN et al., 2006). Portanto, para um melhor entendimento desse fenômeno, passamos a estudar as correntes pós-sinápticas excitatórias em neurônios NTS-VLM evocadas pelo estímulo do TS. Esse protocolo, no qual varias fibras aferentes são estimuladas simultaneamente, nos permitiu avaliar os efeitos da HM e do tratamento com Minociclina sobre a transmissão sináptica glutamatérgica evocada nessa região.

Nossos estudos mostraram que a HM aumenta a amplitude das TS-eEPSCs em neurônios do NTS-VLM. Esses resultados são consistentes com dados anteriores do nosso laboratório que evidenciaram que a transmissão sináptica excitatória em neurônios não marcados do NTS é aumentada pela exposição à HM (Accorsi-Mendonça et al 2015). Respostas similares foram observadas por ZHANG et al., (2008) e (2009) em estudos que evidenciaram um aumento das TS-eEPSC após a exposição crônica à HM. É importante apontar que estudos de KLINE et al., (2007) e ALMADO et al., 2012 demonstraram um efeito oposto em neurônios do NTS de animais submetidos ao modelo da hipóxia crônica intermitente (HCl), uma vez que esses neurônios apresentaram redução significativa das TS-eEPSCs após 10 dias de exposição à HCl, revelando que a plasticidade sináptica no NTS pode ocorrer de maneira diferente, dependendo do modelo de hipóxia ao qual o animal foi exposto.

Com o objetivo de se estudar os mecanismos relacionados com o aumento da amplitude das TS-eEPSCs após a exposição a HM de curto prazo, avaliamos por meio do tratamento com minociclina a possível influência do processo inflamatório nas alterações observadas na transmissão sináptica glutamatérgica no NTS. Notamos que o aumento na amplitude das TS-eEPSCs foi significativo apenas nos neurônios de animais tratados com o veículo, uma vez que os animais tratados com minociclina não apresentaram diferença na amplitude das TS-eEPSCs quando comparados ao seu grupo controle. Além disso, a amplitude das TS-eEPSCs foi significativamente menor nos neurônios de animais HM tratados com Minociclina quando comparado aos do grupo tratado apenas com o veículo.

O aumento da amplitude das TS-eEPSCs observado nos animais tratados com veículo poderia ser desencadeado por um efeito da HM em uma ou mais das variáveis que determinam a transmissão sináptica. Como destacado acima, a amplitude de uma corrente pós-sináptica é determinada pelo produto do número de zonas de sinapses ativas (**n**), probabilidade de liberação de neurotransmissor (**Pr**) e o tamanho quântico (**q**) o qual representa a amplitude resultante da liberação de neurotransmissor a partir de uma única zona ativa. O parâmetro "**n**" pode ser influenciado por mecanismos pré e pós-sinápticos, podendo ser afetado, por exemplo, pelo silenciamento de cada um desses terminais independentemente. A "**Pr**" é um parâmetro pré-sináptico pois depende exclusivamente dos mecanismos de liberação de neurotransmissores, enquanto que o parâmetro "**q**" é um parâmetro essencialmente pós-sináptico e depende de fatores como a densidade e a condutância dos receptores da membrana pós-sináptica (DEL CASTILLO & KATZ, 1954; ZHOU et al., 1997).

As sinapses do TS apresentam uma *Pr* de aproximadamente 0,9 (BAILEY et al., 2006, ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011), essa elevada *Pr* propicia que essas sinapses apresentem uma plasticidade sináptica conhecida como depressão de curto prazo. Estudos de CHEN et al. (1999) evidenciaram que a depressão de curto prazo das sinapses do TS ocorre exclusivamente por mecanismos pré-sinápticos, não estando relacionada com dessensibilização dos receptores pós-sinápticos. Diante do exposto e com a finalidade de elucidar os mecanismos relacionados com o aumento da amplitude da TS-eEPSCs, avaliamos a depressão de curto prazo dessas correntes utilizando o protocolo no qual foram realizados 5 estímulos consecutivos do TS em uma frequência de 10Hz. Entretanto, nos nossos experimentos não foram observadas alterações significativas entre os diferentes grupos experimentais em relação à depressão de curto prazo. Esse resultado nos forneceu evidências de que a **Pr** não foi alterada pela HM tampouco pelo tratamento com a Minociclina.

Outro parâmetro que pode fornecer informações relevantes sobre os mecanismos de plasticidade sináptica é o inverso do quadrado do coeficiente de variação ($1/CV^2$), uma vez que alterações nesse parâmetro fornecem indicativos consistentes de mudanças nas variáveis pré-sinápticas (**n** ou **Pr**), portanto esse parâmetro é sensível a alterações na eficácia da liberação de neurotransmissores (BEKKERS & STEVENS, 1990; MALINOW & TSIEN, 1990; SELIG et al., 1995). Nesse contexto, um aumento nos valores de $1/CV^2$ poderia representar um forte

indicativo de que a plasticidade sináptica observada deveu-se a um aumento no número de sinapses ativas, ou na probabilidade de liberação de neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos. Nos nossos estudos não foram observadas diferenças em relação ao $1/CV^2$ dos diferentes grupos experimentais. Os resultados obtidos com o protocolo de depressão de curto prazo combinados com a avaliação do $1/CV^2$ são evidências de que o aumento da amplitude das TS-eEPSCs observadas nos animais HM tratados com o veículo não está relacionado com o aumento da **Pr** ou **n**. Portanto, o aumento da amplitude não foi proveniente de um efeito da hipóxia nos terminais pré-sinápticos. Dessa forma podemos sugerir que essa alteração foi decorrente dos efeitos da hipóxia na membrana pós-sináptica alterando o parâmetro **q** que se refere, por exemplo, à densidade e à condutância dos receptores glutamatérgicos pós-sinápticos.

Em outro protocolo experimental, observamos que as correntes uniquânticas dessincronizadas TS-eaEPSCs, obtidas pela substituição do cálcio extracelular pelo estrôncio, obedeceram ao mesmo padrão que as correntes TS-eEPSCs, isto é, apresentaram-se com amplitude aumentada, apenas em neurônios NTS-VLM de animais HM tratados com o veículo. Em outras palavras, esse protocolo revelou que, a liberação uniquântica de vesículas gera, na membrana pós-sináptica desses neurônios, uma corrente de maior amplitude. Esses resultados indicam, portanto, que a HM alterou os terminais pós-sinápticos. Considerando que não encontramos qualquer diferença entre os grupos em relação a cinética das TS-eEPSCs, sugerimos que o mecanismo mais provável pelo qual a HM altera a membrana pós-sináptica seria por um aumento da expressão de receptores ionotrópicos glutamatérgicos (não-NMDA) nessa região. Diante do exposto, podemos inferir que o processo inflamatório é parte dos mecanismos ligados as alterações no terminal pós-sináptico de neurônios NTS-VLM, considerando que o aumento da amplitude das correntes uniquânticas foram prevenidas pelo tratamento com o anti-inflamatório minociclina.

A influência dos mediadores do processo inflamatório sobre a membrana pós-sináptica vem sendo elucidado por diferentes abordagens experimentais. Foi demonstrado em neurônios do hipocampo que o TNF- α aumenta a inserção de receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) na membrana plasmática, além de reduzir o número de receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibitório. Essas alterações em conjunto contribuem

para o aumento da excitabilidade neuronal (OGOSHI et al., 2005; STELLWAGEN et al., 2005; BEATTIE et al., 2010). A IL-1 β tem efeitos semelhantes sobre os neurônios, uma vez que ela aumenta a corrente de cálcio por meio da fosforilação de receptores NMDA (VIVIANI et al., 2003). A IL-1 β e o TNF podem também aumentar expressão do fator de crescimento neural (NGF), alterando a plasticidade sináptica (WOOLF et al., 1997). Reforçando as evidências da influência das citocinas inflamatórias sobre a atividade neuronal, estudos de KANNAN et al. (1996) mostraram que a administração central ou periférica de IL-1 β aumenta a pressão arterial e o tônus simpático renal em ratos acordados. Ademais, estudos de KANG et al. (2009) evidenciaram que a infusão intracerebroventricular de um inibidor da atividade do NF- κ B atenua significativamente a hipertensão induzida pela angiotensina II.

Para avaliarmos os possíveis mediadores inflamatórios que estariam alterados nos nossos animais após a exposição a HM, avaliamos a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α na região do NTS, as quais foram selecionadas para nossas investigações com base em dados da literatura que evidenciaram que as mesmas estão aumentadas após a exposição a HM (SONG et al., 2016; HOCKER et al., 2017). Essa escolha também foi fundamentada nos estudos mencionados previamente que evidenciaram que essas citocinas podem alterar a atividade neuronal e a transmissão sináptica no SNC.

Os nossos dados evidenciaram um aumento significativo da expressão do mRNA da citocina IL-1 β que foi atenuado pelo tratamento com a Minociclina. Contudo, não foram observadas alterações na expressão do mRNA para IL-6 e TNF- α no NTS dos animais estudados. Vale ressaltar que as coletas de *punches* do NTS só foram realizadas após 24 horas de HM e que a liberação e degradação das diferentes citocinas ocorrem de maneira fásica e com decurso temporal variável. Usualmente, os níveis de IL-6 e TNF- α aumentam rapidamente após um estímulo inflamatório, ao passo que o decurso temporal para elevação da IL-1 β pode ser variável, dependendo do estímulo (THIJS & HACK, 1995; WEBEL et al., 1997). Nesse caso, não podemos descartar a possibilidade de que o aumento da expressão do mRNA para IL-6 e TNF- α no NTS tenha ocorrido em um momento anterior ao da coleta dos *punches*.

Com a finalidade de se caracterizar o processo inflamatório desencadeado pela HM. Avaliamos os efeitos de HM sobre o número e as características

morfológicas das células da microglia. Observamos que a HM induz um aumento no número de microglia na região intermediária NTS e este aumento não foi observado em animais previamente tratados com minociclina. Os dados indicam que HM representa um estímulo quimiotático eficiente para o recrutamento de células microgliais para NTS. Os resultados também indicam que a minociclina foi eficaz na redução da ativação microglial, o que está de acordo com estudos anteriores, indicando que um dos mecanismos pelos quais a minociclina reduz a inflamação no SNC é por meio da inibição da atividade das células de microglia (ZEMKE & MAJID, 2004; STIRLING et al., 2005).

Embora as microglias tenham sido descritas pela primeira vez como células inflamatórias do cérebro, ativadas em situações de lesão ou patológicas, diferentes evidências experimentais indicam que essas células têm uma alta atividade basal funcionando constantemente como vigilantes do microambiente no SNC e mantendo a dinâmica da atividade neuronal em níveis fisiológicos (HOCKER et al., 2017; HUGHES; EDWARDS, 2012; NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005). Nesse sentido, a microglia desempenha um papel importante na comunicação neuronal sendo integrante da sinapse tripartite [neurônio pré-sináptico, neurônio pós-sináptico e células gliais (KAPOOR et al., 2016)].

Estudos indicam (TREMBLAY et al., 2011; WAKE et al., 2009) que as células da microglia podem detectar alterações na atividade sináptica (TREMBLAY et al., 2011; WAKE et al., 2009). Essas mudanças podem desencadear respostas das microglias, tais como extensão ou retração de suas ramificações que alteram o contato com as terminações sinápticas (NIMMERJAHN et al., 2005). A motilidade microglial permite que essas células estejam em constante comunicação com os neurônios. Essa interação é possível devido à presença de uma grande diversidade de receptores na superfície da microglia para os diferentes neurotransmissores como a dopamina, glutamato e GABA (POCOCK & KETTENMANN, 2007).

O padrão de distribuição e a morfologia microglial não são homogêneos no SNC (LAWSON et al., 1990; MITTELBRONN et al., 2001). A densidade de microglias é específica para cada região do SNC uma vez que uma maior densidade neuronal pode exigir maior número de microglia para preservar sinapses e neurônios em um ambiente fisiológico. Além disso, a atividade neuronal e a liberação de moléculas de sinalização podem alterar a função microglial (KAPOOR et al., 2016).

Além disso, a microglia pode fornecer um *feedback* positivo para o recrutamento de outras microglias e para a infiltração de macrófagos (KETTENMANN et al., 2011).

O conjunto dos nossos resultados nos permite sugerir que o aumento do número de microglias induzidas pela HM na região NTS poderia ser causado por diferentes fatores como, por exemplo, pelo aumento da transmissão sináptica glutamatérgica nesta região (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2015). De fato, há evidências de que a ativação dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos na microglia está envolvida na modulação positiva da ativação microglial e liberação de fatores pró-inflamatórios como o TNF- α (HAGINO et al., 2004). Outras possibilidades para as quais a hipóxia poderia alterar o número e a função microglial seriam as seguintes: a) por meio da sinalização por espécies reativas de oxigênio formadas em situações de hipoxia, b) fatores liberados de neurônios lesados e c) pelos efeitos indiretos da inflamação periférica (PINEAU; LACROIX, 2009).

Uma vez ativadas, as microglias apresentam alterações morfológicas e passam a apresentar perfil amebóide com menores ou nenhuma ramificação. Uma vez ativadas essas células podem liberar, dentre outros fatores, uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e espécies reativas de oxigênio (KETTENMANN et al., 2011; SAIJO & GLASS, 2011; CRAIN et al., 2013). Embora tenhamos observado um aumento no número de células microgliais, não observamos alterações morfológicas nessas células após a exposição a HM. Estudos anteriores mostraram que, dependendo da situação, a microglia pode adquirir o fenótipo de "microglia alerta", um estado em que essas células estão mais ativadas do que na sua condição basal, mas ainda não são totalmente ativadas como no seu estado amebóide; neste caso, mesmo ativadas, essas microglias poderiam ter uma morfologia bastante semelhante à microglia no seu estado basal (HANISCH & KETTENMANN, 2007, KETTENMANN et al., 2011). Com base nestes estudos, é importante notar que a avaliação de possíveis alterações das células da microglia requer uma interpretação cuidadosa, uma vez que a ativação dessas células parece ocorrer gradualmente, compreendendo mudanças morfológicas e fisiológicas progressivas e não necessariamente súbitas alterações de seu estado basal para estados extremos de ativação.

Apesar do fato de não termos observado alterações morfológicas nas microglias, esses resultados não são suficientes para descartar a possibilidade de aumento da atividade microglial desencadeada pelo nosso modelo de hipoxia. Vale

ressaltar que essas células têm uma alta mobilidade e capacidade de mudar sua morfologia rapidamente. Nos nossos estudos, apenas avaliamos as microglias após 24 horas de HM e, portanto, devemos considerar a possibilidade das alterações morfológicas ou fenotípicas terem ocorrido anteriormente a esse período. Nesse sentido, estudos de (TADMOURI et al., 2014), usando um marcador específico para microglia ativada, mostraram que o número de microglias ativas foi aumentado no NTS entre 6 a 24 horas de exposição a hipoxia mantida. Além disso, STOKES et al., (2017), utilizando um modelo de hipoxia mantida hipobárica, mostraram que as microglias do NTS mudam do estado ramificado para amebóide nas primeiras horas de exposição a hipoxia e retornam ao estado ramificado durante as 24 horas de exposição. Nos dois estudos mencionados, os autores observaram que o tratamento com Minociclina foi eficaz em reduzir a ativação e as alterações morfológicas das microglias. Esse bloqueio da ativação microglial foi associado à significativa redução do aumento da ventilação induzido pela HM nesses animais. Nossos resultados demonstrando um aumento no número de microglia no NTS após 24 horas de hipoxia corroboram com esses estudos prévios na literatura. Esse conjunto de resultados indica que a HM pode alterar a sinalização microglial na região NTS e que o tratamento com minociclina pode prevenir essas alterações. Diante dessas observações, sugerimos que o aumento no número de microglias na região do NTS após 24 horas de HM poderia estar correlacionado com o aumento da expressão de IL-1 β nessa região.

6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

O conjunto de resultados apresentados demonstrou que a HM e o tratamento com minociclina não alteraram as propriedades passivas e ativas da membrana dos neurônios NTS-VLM. Contudo, a HM promoveu aumento da transmissão sináptica glutamatérgica espontânea dependente de potencial de ação e da neurotransmissão evocada pelo estímulo do TS nesses neurônios. Nossos dados fornecem evidências consistentes de que o aumento da amplitude das TS-eEPSCs está relacionado a uma alteração no componente pós-sináptico dessas sinapses. O tratamento prévio com o anti-inflamatório minociclina preveniu o aumento da neurotransmissão excitatória nos neurônios NTS-VLM. Além disso, nos animais tratados com a minociclina, não foi observado aumento da expressão de IL-1 β e do número de microglias na região do NTS presente nos animais tratados apenas com o veículo.

Os nossos resultados fornecem evidências de que o processo inflamatório desencadeado pela HM contribui para o aumento da transmissão sináptica excitatória em neurônios do NTS. Uma vez que nossos estudos foram conduzidos em neurônios marcados do NTS que mantém conexões diretas com os neurônios da VLM, sugerimos que o aumento da transmissão sináptica excitatória nesses neurônios pode contribuir para a hiperatividade simpática e a hipertensão arterial observada em ratos submetidos a HM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALA, A. P. et al. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 17, p. 4269–4277, 1 set. 2012.

ACCORSI-MENDONÇA, D. et al. Are l-glutamate and ATP cotransmitters of the peripheral chemoreflex in the rat nucleus tractus solitarius? **Experimental Physiology**, v. 94, n. 1, p. 38–45, 1 jan. 2009.

ACCORSI-MENDONÇA, D. et al. Synaptic profile of nucleus tractus solitarius neurons involved with the peripheral chemoreflex pathways. **Neuroscience**, v. 197, p. 107–120, 1 dez. 2011.

ACCORSI-MENDONÇA, D. et al. Enhanced Firing in NTS Induced by Short-Term Sustained Hypoxia Is Modulated by Glia-Neuron Interaction. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 35, n. 17, p. 6903–6917, 29 abr. 2015.

ACCORSI-MENDONÇA, D.; MACHADO, B. H. Synaptic transmission of baro- and chemoreceptors afferents in the NTS second order neurons. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 175, n. 1, p. 3–8, 1 abr. 2013.

ADLER, M. W. et al. Viewing chemokines as a third major system of communication in the brain. **The AAPS journal**, v. 7, n. 4, p. E865-870, 6 jan. 2006.

AICHER, S. A. et al. Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarius to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 373, n. 1, p. 62–75, 9 set. 1996.

ALHEID, G. F.; JIAO, W.; MCCRIMMON, D. R. Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. **Neuroscience**, v. 190, p. 207–227, 8 set. 2011.

ALMADO, C. E. L.; MACHADO, B. H.; LEÃO, R. M. Chronic intermittent hypoxia depresses afferent neurotransmission in NTS neurons by a reduction in the number of active synapses. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 47, p. 16736–16746, 21 nov. 2012.

ANDRESEN, M. C.; KUNZE, D. L. Nucleus tractus solitarius--gateway to neural circulatory control. **Annual Review of Physiology**, v. 56, p. 93–116, 1994.

ANDRESEN, M. C.; YANG, M. Y. Non-NMDA receptors mediate sensory afferent synaptic transmission in medial nucleus tractus solitarius. **The American Journal of Physiology**, v. 259, n. 4 Pt 2, p. H1307-1311, out. 1990.

BAILEY, T. W. et al. Vasopressin Inhibits Glutamate Release via Two Distinct Modes in the Brainstem. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 23, p. 6131–6142, 7 jun. 2006.

BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, n. 8, p. 819–834, ago. 1999.

BEATTIE, M. S.; FERGUSON, A. R.; BRESNAHAN, J. C. AMPA-receptor trafficking and injury-induced cell death. **The European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 2, p. 290–297, jul. 2010.

BEKKERS, J. M.; STEVENS, C. F. Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 346, n. 6286, p. 724–729, 23 ago. 1990.

BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 280–288, jun. 2004.

CAI, Y. L. et al. Glutamatergic vestibular neurons express Fos after vestibular stimulation and project to the NTS and the PBN in rats. **Neuroscience letters**, v. 417, n. 2, p. 132–137, maio 2007.

CALBET, J. A. L. Chronic hypoxia increases blood pressure and noradrenaline spillover in healthy humans. **The Journal of Physiology**, v. 551, n. Pt 1, p. 379–386, 15 ago. 2003.

CAPLES, S. M.; GAMI, A. S.; SOMERS, V. K. Obstructive sleep apnea. **Annals of Internal Medicine**, v. 142, n. 3, p. 187–197, 1 fev. 2005.

CHEN, C.-Y.; HOROWITZ, J. M.; BONHAM, A. C. A presynaptic mechanism contributes to depression of autonomic signal transmission in NTS. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 277, n. 4, p. H1350–H1360, 1 out. 1999.

CHEN, J. et al. Role of endothelin and endothelin A-type receptor in adaptation of the carotid body to chronic hypoxia. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 282, n. 6, p. L1314–1323, jun. 2002.

CLAPS, A.; TORREALBA, F. The carotid body connections: a WGA-HRP study in the cat. **Brain Research**, v. 455, n. 1, p. 123–133, 5 jul. 1988.

COSTA, K. M. et al. Evolution and physiology of neural oxygen sensing. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 302, 2014.

CRAMER, T. et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. **Cell**, v. 112, n. 5, p. 645–657, 7 mar. 2003.

DE PERROT, M. et al. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, n. 2, p. 211–215, 15 jan. 2002.

DEKIN, M. S.; GETTING, P. A. In vitro characterization of neurons in the ventral part of the nucleus tractus solitarius. II. Ionic basis for repetitive firing patterns. **Journal of Neurophysiology**, v. 58, n. 1, p. 215–229, jul. 1987.

DEL CASTILLO, J.; KATZ, B. Quantal components of the end-plate potential. **The Journal of Physiology**, v. 124, n. 3, p. 560–573, 28 jun. 1954.

DEL RIO, R. et al. Carotid body inflammation and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia. **The European Respiratory Journal**, v. 39, n. 6, p. 1492–1500, jun. 2012.

DENG, Y. et al. Amoeboid microglia in the periventricular white matter induce oligodendrocyte damage through expression of proinflammatory cytokines via MAP kinase signaling pathway in hypoxic neonatal rats. **Brain Pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 18, n. 3, p. 387–400, jul. 2008.

DONOGHUE, S. et al. The central projections of carotid baroreceptors and chemoreceptors in the cat: a neurophysiological study. **The Journal of Physiology**, v. 347, p. 397–409, fev. 1984.

ECKLE, T. et al. Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. **Circulation**, v. 118, n. 2, p. 166–175, 8 jul. 2008.

ELTZSCHIG, H. K.; CARMELIET, P. Hypoxia and inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 7, p. 656–665, 17 fev. 2011.

FATT, P.; KATZ, B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. **The Journal of Physiology**, v. 117, n. 1, p. 109–128, 28 maio 1952.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 232, mar. 2006.

FELDMAN, J. L.; ELLENBERGER, H. H. Central coordination of respiratory and cardiovascular control in mammals. **Annual Review of Physiology**, v. 50, p. 593–606, 1988.

GARVEY, J. F.; TAYLOR, C. T.; MCNICHOLAS, W. T. Cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation. **The European Respiratory Journal**, v. 33, n. 5, p. 1195–1205, maio 2009.

GONZALEZ, C. et al. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 4, p. 829–898, 1 out. 1994.

GONZÁLEZ, J. C. et al. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca(2+) signalling in hippocampal neurons. **The European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2481–2495, nov. 2007.

GREENBERG, H. et al. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 2, p. 591–596, 5 maio 2006.

GRILL, H. J.; HAYES, M. R. The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their

combined effects on food intake. **International Journal of Obesity (2005)**, v. 33 Suppl 1, p. S11-15, abr. 2009.

GRIMSON, K. S. TOTAL THORACIC AND PARTIAL TO TOTAL LUMBAR SYMPATHECTOMY AND CELIAC GANGLIONECTOMY IN THE TREATMENT OF HYPERTENSION. **Annals of Surgery**, v. 114, n. 4, p. 753–775, out. 1941.

GUDES, S. et al. The role of slow and persistent TTX-resistant sodium currents in acute tumor necrosis factor- α -mediated increase in nociceptors excitability. **Journal of Neurophysiology**, v. 113, n. 2, p. 601–619, 15 jan. 2015.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335–346, maio 2006.

HAINSWORTH, R.; DRINKHILL, M. J. Cardiovascular adjustments for life at high altitude. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 158, n. 2–3, p. 204–211, 30 set. 2007.

HANISCH, U.-K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1387–1394, nov. 2007.

HANSEN, J.; SANDER, M. Sympathetic neural overactivity in healthy humans after prolonged exposure to hypobaric hypoxia. **The Journal of Physiology**, v. 546, n. Pt 3, p. 921–929, 1 fev. 2003.

HARTMANN, G. et al. High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein. **Cytokine**, v. 12, n. 3, p. 246–252, mar. 2000.

HEMPLEMAN, S. C. Sodium and potassium current in neonatal rat carotid body cells following chronic in vivo hypoxia. **Brain Research**, v. 699, n. 1, p. 42–50, 13 nov. 1995.

HOCKER, A. D. et al. The impact of inflammation on respiratory plasticity. **Experimental neurology**, v. 287, n. Pt 2, p. 243–253, jan. 2017.

HUGHES, K. L.; EDWARDS, L. Teaching and learning in the dual enrollment classroom. **New Directions for Higher Education**, v. 2012, n. 158, p. 29–37, 1 jun. 2012.

IADECOLA, C.; ALEXANDER, M. Cerebral ischemia and inflammation. **Current Opinion in Neurology**, v. 14, n. 1, p. 89–94, fev. 2001.

ITO, D. et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 57, n. 1, p. 1–9, 1 jun. 1998.

JACOB, M.; CHAPPELL, D.; BECKER, B. F. Regulation of blood flow and volume exchange across the microcirculation. **Critical Care (London, England)**, v. 20, n. 1, p. 319, 21 out. 2016.

JENERICK, H. PHASE PLANE TRAJECTORIES OF THE MUSCLE SPIKE POTENTIAL. **Biophysical Journal**, v. 3, p. 363–377, set. 1963.

JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 18, n. 3, p. 292–353, jul. 1997.

KANG, Y.-M. et al. Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 82, n. 3, p. 503–512, 1 jun. 2009.

KANNAN, H. et al. Activation of sympathetic outflow by recombinant human interleukin-1 beta in conscious rats. **The American Journal of Physiology**, v. 270, n. 2 Pt 2, p. R479-485, fev. 1996.

KAPOOR, K. et al. Alerted microglia and the sympathetic nervous system: A novel form of microglia in the development of hypertension. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 226, p. 51–62, 2016.

KAUR, G. et al. Microglia and central nervous system immunity. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 21, n. 1, p. 43–51, jan. 2010.

KAWASAKI, Y. et al. Cytokine Mechanisms of Central Sensitization: Distinct and Overlapping Role of Interleukin-1 β , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- α in Regulating Synaptic and Neuronal Activity in the Superficial Spinal Cord. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 20, p. 5189–5194, 14 maio 2008.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of Microglia. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 461–553, 1 abr. 2011.

KIERNAN, E. A. et al. Mechanisms of microglial activation in models of inflammation and hypoxia: Implications for chronic intermittent hypoxia. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 6, p. 1563–1577, 15 mar. 2016.

KLEIN, N. C.; CUNHA, B. A. Tetracyclines. **The Medical Clinics of North America**, v. 79, n. 4, p. 789–801, jul. 1995.

KLINE, D. D. Plasticity in Glutamatergic NTS Neurotransmission. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 164, n. 1–2, p. 105–111, 10 dez. 2008.

KLINE, D. D.; RAMIREZ-NAVARRO, A.; KUNZE, D. L. Adaptive depression in synaptic transmission in the nucleus of the solitary tract after in vivo chronic intermittent hypoxia: evidence for homeostatic plasticity. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 17, p. 4663–4673, 25 abr. 2007.

KOSHIYA, N.; GUYENET, P. G. NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. **The American Journal of Physiology**, v. 270, n. 6 Pt 2, p. R1273-1278, jun. 1996.

KRÜGER, B. et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 9, p. 3390–3395, 3 mar. 2009.

KUBO, K. et al. Inflammatory cytokines in BAL fluid and pulmonary hemodynamics in high-altitude pulmonary edema. **Respiration Physiology**, v. 111, n. 3, p. 301–310, mar. 1998.

KUMAGAI, H. et al. Importance of rostral ventrolateral medulla neurons in determining efferent sympathetic nerve activity and blood pressure. **Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 35, n. 2, p. 132–141, fev. 2012.

LAWSON, L. J. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151–170, 1990.

LEE, J.-W. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)α: its protein stability and biological functions. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 36, n. 1, p. 1–12, 29 fev. 2004.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF-κappaB regulation in the immune system. **Nature Reviews. Immunology**, v. 2, n. 10, p. 725–734, out. 2002.

LIU, X. et al. Adaptation to chronic hypoxia involves immune cell invasion and increased expression of inflammatory cytokines in rat carotid body. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 296, n. 2, p. L158–166, fev. 2009.

MALINOW, R.; TSIEN, R. W. Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. **Nature**, v. 346, n. 6280, p. 177–180, 12 jul. 1990.

MARCUS, N. J. et al. Carotid body denervation improves autonomic and cardiac function and attenuates disordered breathing in congestive heart failure. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 2, p. 391–408, 15 jan. 2014.

MIFFLIN, S. W. Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. **The American Journal of Physiology**, v. 263, n. 2 Pt 2, p. R368–375, ago. 1992.

MING, Z.; CRISWELL, H. E.; BREESE, G. R. Evidence for TNFα Action on Excitatory and Inhibitory Neurotransmission in the Central Amygdala: A Brain Site Influenced by Stress. **Brain, behavior, and immunity**, v. 33, p. 102–111, out. 2013.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144–148, 8 jul. 1961.

MITCHELL, P. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. **Science (New York, N.Y.)**, v. 206, n. 4423, p. 1148–1159, 7 dez. 1979.

MITTELBRONN, M. et al. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. **Acta Neuropathologica**, v. 101, n. 3, p. 249–255, mar. 2001.

MORAES, D. J. A. et al. Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 9, p. 2013–2033, 1 maio 2014.

NADEEM, R. et al. Serum Inflammatory Markers in Obstructive Sleep Apnea: A Meta-Analysis. **Journal of Clinical Sleep Medicine : JCSM : Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine**, v. 9, n. 10, p. 1003–1012, 15 out. 2013.

NARKIEWICZ, K. et al. Baroreflex Control of Sympathetic Nerve Activity and Heart Rate in Obstructive Sleep Apnea. **Hypertension**, v. 32, n. 6, p. 1039–1043, 1 dez. 1998.

NEHER, E.; SAKABA, T. Estimating Transmitter Release Rates from Postsynaptic Current Fluctuations. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 24, p. 9638–9654, 15 dez. 2001.

NELSON, B.; HIGHMAN, B.; ALTLAND, P. Oxidative phosphorylation during altitude acclimation in rats. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 213, n. 6, p. 1414–1418, 1 dez. 1967.

NIELSEN, A. M.; BISGARD, G. E.; VIDRUK, E. H. Carotid chemoreceptor activity during acute and sustained hypoxia in goats. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 65, n. 4, p. 1796–1802, out. 1988.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5726, p. 1314–1318, 27 maio 2005.

OGOSHI, F. et al. Tumor necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) induces rapid insertion of Ca²⁺-permeable alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA)/kainate (Ca-A/K) channels in a subset of hippocampal pyramidal neurons. **Experimental Neurology**, v. 193, n. 2, p. 384–393, jun. 2005.

OLIET, S. H.; MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. Bidirectional control of quantal size by synaptic activity in the hippocampus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 271, n. 5253, p. 1294–1297, 1 mar. 1996.

PAPANDREOU, I. et al. Cellular reaction to hypoxia: sensing and responding to an adverse environment. **Mutation Research**, v. 569, n. 1–2, p. 87–100, 6 jan. 2005.

PAXINOS, G. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Sixth Edition** Spiral-bound. 6 edition ed. [s.l.] Academic Press, 2006.

PINEAU, I.; LACROIX, S. Endogenous signals initiating inflammation in the injured nervous system. **Glia**, v. 57, n. 4, p. 351–361, mar. 2009.

POCOCK, J. M.; KETTENMANN, H. Neurotransmitter receptors on microglia. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 10, p. 527–535, out. 2007.

POPA, D. et al. Ibuprofen blocks time-dependent increases in hypoxic ventilation in rats. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 178, n. 3, p. 381–386, 30 set. 2011.

POWELL, F. L. The influence of chronic hypoxia upon chemoreception. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 157, n. 1, p. 154–161, 1 jul. 2007.

POWELL, F. L.; MILSOM, W. K.; MITCHELL, G. S. Time domains of the hypoxic ventilatory response. **Respiration Physiology**, v. 112, n. 2, p. 123–134, maio 1998.

RAMIREZ, D. M. O.; KAVALALI, E. T. Differential regulation of spontaneous and evoked neurotransmitter release at central synapses. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 21, n. 2, p. 275–282, abr. 2011.

REDMAN, S. Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. **Physiological Reviews**, v. 70, n. 1, p. 165–198, jan. 1990.

ROSENBERGER, P. et al. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia. **Nature Immunology**, v. 10, n. 2, p. 195–202, fev. 2009.

ROSIN, D. L.; CHANG, D. A.; GUYENET, P. G. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 499, n. 1, p. 64–89, 1 nov. 2006.

ROSTÈNE, W.; KITABGI, P.; PARSADANIAN, S. M. Chemokines: a new class of neuromodulator? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 895–903, nov. 2007.

SAKMANN, B.; NEHER, E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. **Annual Review of Physiology**, v. 46, p. 455–472, 1984.

SAMANTA, D.; PRABHAKAR, N. R.; SEMENZA, G. L. Systems biology of oxygen homeostasis. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine**, v. 9, n. 4, 2017.

SANDERS, A. P.; HALE, D. M.; MILLER, A. T. Some effects of hypoxia on respiratory metabolism and protein synthesis in rat tissues. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 209, n. 2, p. 443–446, 1 ago. 1965.

SARA, Y. et al. An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. **Neuron**, v. 45, n. 4, p. 563–573, 17 fev. 2005.

SELIG, D. K. et al. Independent mechanisms for long-term depression of AMPA and NMDA responses. **Neuron**, v. 15, n. 2, p. 417–426, ago. 1995.

SEMENTA, G. L.; WANG, G. L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required

for transcriptional activation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 12, p. 5447–5454, dez. 1992.

SMITH, S. M. et al. Calcium regulation of spontaneous and asynchronous neurotransmitter release. **Cell calcium**, v. 52, n. 3–4, p. 226–233, set. 2012.

SMITH, S. M. C.; FRIEDLE, S. A.; WATTERS, J. J. Chronic intermittent hypoxia exerts CNS region-specific effects on rat microglial inflammatory and TLR4 gene expression. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e81584, 2013.

SNYDER, B. et al. Chronic intermittent hypoxia induces oxidative stress and inflammation in brain regions associated with early-stage neurodegeneration. **Physiological Reports**, v. 5, n. 9, 4 maio 2017.

ST -JOHN, W. M.; PATON, J. F. R. Defining eupnea. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 139, n. 1, p. 97–103, 16 dez. 2003.

STEA, A.; JACKSON, A.; NURSE, C. A. Hypoxia and N⁶,O^{2'}-dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, but not nerve growth factor, induce Na⁺ channels and hypertrophy in chromaffin-like arterial chemoreceptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 20, p. 9469–9473, 15 out. 1992.

STELLWAGEN, D. et al. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 12, p. 3219–3228, 23 mar. 2005.

STIRLING, D. P. et al. Minocycline as a neuroprotective agent. **The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry**, v. 11, n. 4, p. 308–322, ago. 2005.

STOKES, J. A. et al. Minocycline blocks glial cell activation and ventilatory acclimatization to hypoxia. **Journal of Neurophysiology**, v. 117, n. 4, p. 1625–1635, 1 abr. 2017.

SUNDARAM, K.; JOHNSON, S. M.; FELDER, R. B. Altered expression of delayed excitation in medial NTS neurons of spontaneously hypertensive rats. **Neuroscience Letters**, v. 225, n. 3, p. 205–209, 11 abr. 1997.

SYNNESTVEDT, K. et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 7, p. 993–1002, out. 2002.

TADMOURI, A.; CHAMPAGNAT, J.; MORIN-SURUN, M. P. Activation of microglia and astrocytes in the nucleus tractus solitarius during ventilatory acclimatization to 10% hypoxia in unanesthetized mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 92, n. 5, p. 627–633, maio 2014.

TAYLOR, C. T. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor- κ B in hypoxic inflammation. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 17, p. 4055–4059, 1 set. 2008.

THIJS, L. G.; HACK, C. E. Time course of cytokine levels in sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 21 Supl 2, p. S258-263, nov. 1995.

TREMBLAY, M.-È. et al. The role of microglia in the healthy brain. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 45, p. 16064–16069, 9 nov. 2011.

VIVIANI, B. et al. Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 25, p. 8692–8700, 24 set. 2003.

WAKE, H. et al. Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 13, p. 3974–3980, 1 abr. 2009.

WALTER, A. M.; HAUCKE, V.; SIGRIST, S. J. Neurotransmission: Spontaneous and Evoked Release Filing for Divorce. **Current Biology**, v. 24, n. 5, p. R192–R194, 3 mar. 2014.

WAYPA, G. B.; SMITH, K. A.; SCHUMACKER, P. T. O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 47–48, p. 76–89, mar. 2016.

WEBEL, D. M. et al. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 6, p. 1514–1520, jun. 1997.

WOOLF, C. J. et al. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor α . **British Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 3, p. 417–424, jun. 1997.

XU, J. et al. Synaptotagmin-1 functions as the Ca²⁺-sensor for spontaneous release. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 6, p. 759–766, jun. 2009.

ZEMKE, D.; MAJID, A. The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 27, n. 6, p. 293–298, dez. 2004.

ZHANG, W. et al. Chronic sustained and intermittent hypoxia reduce function of ATP-sensitive potassium channels in nucleus of the solitary tract. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 5, p. R1555–R1562, nov. 2008.

ZHANG, W. et al. Chronic Sustained Hypoxia Enhances Both Evoked EPSCs and Norepinephrine Inhibition of Glutamatergic Afferent Inputs in the Nucleus of the Solitary Tract. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 10, p. 3093–3102, 11 mar. 2009.

ZHOU, Z.; CHAMPAGNAT, J.; POON, C. S. Phasic and long-term depression in brainstem nucleus tractus solitarius neurons: differing roles of AMPA receptor desensitization. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 14, p. 5349–5356, 15 jul. 1997.

ZOCCAL, D. B. et al. Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 1, p. 79–85, jan. 2007.

ZOCCAL, D. B. et al. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. Pt 13, p. 3253–3265, 1 jul. 2008.

ZOCCAL, D. B. et al. Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 9, p. 972–983, set. 2009.

ANEXO A – Artigo relacionado à Tese

The increase of excitatory synaptic transmission in the NTS neurons of rats submitted to sustained hypoxia is blunted by anti-inflammatory treatment

Lima-Silveira L, Accorsi-Mendonça D, Bonagamba LGH⁺, Almado CE, Da Silva MP, Nedoboy^{*} PE, Pilowsky PM^{*}, Machado BH.

Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 14049-900, SP, Brazil

⁺Deceased on November 26, 2017

^{}The Heart Research Institute, Sydney, New South Wales 2042, Australia*

Running title: Hypoxia and brainstem inflammation.

Key words: Hypoxia, Minocycline, Nucleus Tractus solitarius, synaptic transmission.

Author for correspondence:

Benedito H. Machado, Ph.D.

Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto,
University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Email: bhmachad@fmrp.usp.br

Phone: 55-16-3315-3015

L.L.S., D.A.M., L.G.H.B. and PEN. performed the experiments. L.L.S., C.E.A. and M.S.P. analyzed the data. L.L.S., D.A.M., P.M.P. and B.H.M. designed the research. L.L.S. and B.H.M wrote the manuscript. All the authors approved the final version of the manuscript.

ABSTRACT

Short-term Sustained hypoxia (SH) is associated with important cardiorespiratory changes and inflammatory process in humans and experimental models. There is also evidence that SH can change the synaptic transmission in the nucleus tractus solitarius (NTS) region. Here we use the Minocycline (Mino), an anti-inflammatory and microglial inhibitor, to evaluate the role of inflammation triggered by SH on the excitatory neurotransmission in the NTS neurons sending projections to the ventrolateral medulla (NTS-VLM). We hypothesized that SH induces brainstem inflammatory process, which may contribute to increase in excitatory neurotransmission and excitability of the NTS-VLM neurons, collaborating to the observed high blood pressure observed on these rats. Although we have observed increased MAP in both groups of rats treated with vehicle (saline + distilled water, i.p) or Mino [(30mg/Kg i.p for 3 days) submitted to 24h of SH (FiO_2 0.1) in relation to their respective control groups (FiO_2 0.28), the MAP increase was lower in rats treated with Mino. The whole cell patch-clamp recordings showed that SH produced no changes in active properties of NTS neurons. However, neurons of rats submitted SH presented an increase in the excitatory neurotransmission and the number of microglial at the NTS region. These increases were prevented in the groups previously treated with mino. We conclude that inflammation induced by SH contributes to the increased excitatory neurotransmission in NTS-VLM neurons and consequently to high blood pressure in these rats.

INTRODUCTION

The nucleus tractus solitarius (NTS) is an important integrative station for the modulation of the afferents of the peripheral chemoreflex. In hypoxic conditions, the neurons in this nucleus receive information from the peripheral chemoreceptors, and modulates cardiorespiratory responses through direct connections with the ventral medulla (VLM), where are located the presympathetic and respiratory neurons, (Haibara et al., 1999; Machado, 2001; Guyenet, 2006, Feldman and Del Negro, 2006).

The experimental model of sustained hypoxia (SH), promotes cardiovascular changes that are similar to the pathological condition known as “mountain sickness”, which is related to the effect of high altitude effects on humans (Hainsworth & Drinkhill, 2007; Calbet, 2003; Hansen & Sander). There is evidence that individuals submitted to SH have sympathetic hyperactivity and consequent increase in heart rate and blood pressure (Hainsworth & Drinkhill, 2007; Calbet, 2003; Hansen & Sander, 2003). Studies by Moraes et al (2014), also evidenced a significant increase in blood pressure associated with an increased sympathetic activity in rats submitted to SH. Furthermore, SH exposure induces increased neuronal excitability and excitatory synaptic transmission in the NTS region (Zang et al., 2009; Accorsi-Mendonça et. al., 2015).

Besides cardiovascular and respiratory responses, hypoxia is often related to inflammatory process, once the transcriptional pathways activated by hypoxia can also modulate the transcriptional pathways of inflammation (Eltzschiz and Carmeliet, 2011; Taylor, 2008). Indeed, the increased expression of inflammatory markers was documented in systemic circulation as well in the central nervous systems (CNS) of humans and animals submitted to different models of hypoxia (Kubo et al., 1998; Hartmann et al., 2000; Iturriaga et al., 2015; Sapin et al., 2015; Yang et al., 2015; Ortega et al., 2016).

A proposed mechanism by which hypoxia triggers neuroinflammation is by the release of proinflammatory cytokines by microglial cells (Deng et al., 2008; Kaur et al., 2010, Kiernan et al., 2016). Microglia are the immune cells residing in the CNS and are involved in the innate and adaptive immunity of the brain. Once activated, microglia may proliferate and undergo morphological changes, initiating a cascade of immunological reactions, involving the release of several proinflammatory cytokines

(IL-1b, interleukin- 6 and TNF-a), reactive oxygen species, and neurotransmitters (Lee et al., 2003; Farber & Kettenmann, 2005; Orihuela et al., 2016; Kettenmann et al., 2011; Saijo and Glass, 2011; Crain et al. al., 2013). Furthermore, there is experimental evidence that in the CNS, the effects of chemokines and proinflammatory cytokines are not restricted to the coordination of immune responses, oce these mediators may act as facilitatory of the excitatory synaptic transmission and changes in the excitability of the neurons (Ming et al., 2013; Viviani et al., 2003; Ogoshi et al., 2005; Stellwagen et al., 2005; Beattie and et al., 2010).

Taken together, these previous studies have shown that SH can trigger: a) central and peripheral inflammatory process; b) cardiovascular changes and c) synaptic plasticity in the NTS neurons. In the present study, we used direct measurement of arterial pressure and whole cell patch-clamp technique, to investigate whether or not changes in the blood pressure and in the NTS synaptic transmission in rats submitted to SH are affected by the inflammatory process. In order to study the neural pathways involved in the processing of the chemoreflex, all electrophysiological experiments were performed in NTS neurons sending projections to the VLM (NTS-VLM). These neurons were previously identified by injecting into VLM a retrograde marker. We hypothesized that inflammation triggered by SH contribute to increased blood pressure and excitability of neurons of the NTS. For reach our goals we used minocycline, an antiinflammatory of tetracycline group that crosses blood brain barrier, and it is effective in the treatment of inflammation in the CNS (Klein & Cunha, 1995; Stirling et al., 2005). Here we are presenting new evidence about the influence of inflammatory processes triggered by SH on cardiovascular regulation and synaptic transmission at the NTS level.

METHODS

Experiments with conscious rats

Animals

Juvenile Wistar rats (90-120g) were provided by Animal Care Facility of the University of São Paulo, campus of Ribeirão Preto, Brazil. All experimental protocols were approved by Institutional Ethical Committee (# 094/2013). Rats were housed in collective cages and maintained in an environment with constant temperature (21-22° C), artificial light-dark cycle of 12 hours, with food and water *ad libitum*. Specifically for the study of immunohistochemistry of microglia cells, Wistar rats (150-250g) were provided by the Animal Resource Center, Perth, Australia.

The animals were separated into four groups. Two groups were submitted to SH for 24h (Fi 0.1) and two groups kept in normoxic conditions (Fi 20.8). The rats of one SH group were treated with anti-inflammatory Minocycline and the other group with vehicle. The same procedures were used for the groups maintained under normoxic conditions.

Sustained hypoxia (SH)

Rats of the control and SH groups were placed in individual cages with food and water *ad libitum* and kept in chambers (210 L volume) equipped with gas injectors and sensors of O₂, CO₂, temperature and humidity. The SH group was submitted to sustained hypoxia protocol. In this protocol, nitrogen was frequently injected into the chamber during 24 hours (N₂ - White Martins, Brazil) in order to keep the O₂ pressure in 10%. The injection of N₂ gas inside the chamber was controlled by solenoid valves [Oxycycler (Model A84XOV) Biospherix, USA], which are automatically operated by a software (Anawin 2, version 2.4.17). Rats from control groups were kept in similar chambers, but under normoxic conditions during 24 hours.

Treatment with anti-inflammatory

Rats were treated with the anti-inflammatory Minocycline (30 mg/kg ip; Sigma, St. Louis, USA). Minocycline solution was prepared just before its injection

[30 mg of Minocycline were diluted in 1 ml of vehicle (5 ml distilled water + 5 ml of saline)]. The pH was measured and adjusted to 7.4.

Rats received an injection of Minocycline solution (30 mg/kg), intraperitoneally (ip) once a day. The treatment was carried out for 3 days and on the third day animals were placed into hypoxia or control chambers.

Evaluation of cardiovascular parameters in conscious rats

On the second day of treatment with Minocycline or vehicle, rats were anesthetized with ketamine (45 mg/Kg, Aldrich, Milwaukee, EUA) + xylazine (5 mg/Kg, Aldrich, Milwaukee, EUA) and a catheter (PE-10 connected to PE-50, Clay Adams, Parsippany, USA) was implanted in the abdominal aorta through the femoral artery for direct recordings of pulsatile arterial pressure (PAP). The catheter was subcutaneously exteriorized at the back of the rat. At the end of surgery the analgesic and antipyretic flunixin meglumine [Banamine, Schering-Plough (1 mg/kg)] was administered intramuscularly.

One day after surgery, when the animals were fully recovered from anesthesia, they were placed into hypoxic or normoxic chambers. After 24 hours, the animals were removed from the chambers for cardiovascular recordings. The arterial catheter was connected to a pressure transducer (MLT0380, AD Instruments, Bella Vista, Australia), which was connected to an amplifier (Amp Bridge, ML221, AD Instruments, Bella Vista, Australia). Pulsatile arterial pressure (PAP) signals were acquired by a data acquisition system (PowerLab 4/25, ML845, AD Instruments, Bella Vista, Australia) and recorded by a computer using the software LabChart 5.0 (Chart Pro, AD Instruments, Bella Vista, Australia). After an adaptation period of approximately 10 minutes, the cardiovascular parameters were recorded in freely moving rats under normoxia conditions for 40 min. The mean arterial pressure (MAP), systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), and heart rate (HR) were derived from PAP recordings.

Experiments with NTS neurons

Labeling of NTS neurons sending projections to the ventrolateral medulla (VLM)

To enable the identification of the NTS neurons sending projections to the VLM, retrograde tracer Green Beads (LumaFluor, Durham, EUA) were microinjected unilaterally into the VLM region as previously described by Accorsi-Mendonça et al. (2009). One week before patch clamp experiments, rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (45 mg/Kg, Aldrich, Milwaukee, EUA) plus xylazine (5 mg/Kg, Aldrich, Milwaukee, EUA), and fixed in a stereotaxic apparatus for small animals (David-Kopf, EUA). Then, the anesthetic lidocaine (with vasoconstrictor) was injected subcutaneously into the scalp. After asepsis, a longitudinal incision was made in the skin and subcutaneous tissue to expose the skull. The tower of the stereotaxic apparatus was placed upright and adjusted to the lambda point of the skull and the point for the introduction of the injection cannula was adapted to the size of rats, using as reference the stereotactic coordinates of atlas by Paxinos and Watson (1996). The solution of retrograde tracer Green Beads was injected unilaterally into the VLM region (50 nL). Then the rats were removed from the stereotaxic and received the analgesic and antipyretic flunixin meglumine [Banamine, Schering-Plough (1 mg / kg)] and 0,1 mL of veterinary penicillin 1.200.000 UI/3 mL (Penicillin and Streptomycin, Fontoura-Wyeth, Brazil) as a prophylactic measure. These animals were maintained in individual cages, with water and food "ad libitum" in an acclimatized room for a period of seven days required for the migration of the injected tracer in direction of the cell body in the NTS.

Brainstem slice preparation

After recovery of stereotaxic surgery rats were treated with Minocycline for 3 days and then submitted to hypoxia or normoxia protocols. At the end of 24h protocols, the animals were decapitated and the brainstem was quickly removed and immersed in ice-cold solution (~ 0°C) of aCSF containing (in mM): NaCl, 125; KCl, 2,5; MgCl₂, 1; NaH₂PO₄, 1,25; NaHCO₃, 25; glucose, 25 and CaCl₂, 2. This solution was continuously bubbled with carbogenic mixture (95% O₂ + 5% CO₂), for oxygenation and maintenance of pH in 7.4. The osmolarity was maintained between 300 and 315 mOsm/Kg.H₂O. Coronal slices (250 µm thickness) of brainstem

containing the NTS were obtained using an oscillating slicer (Vibratome 1000 plus, Leica Biosystems, Germany). Slices were incubated in aCSF at 31°C for 30 minutes, and after this period maintained at room temperature. During the experiments slices were transferred to a recording chamber with controlled temperature (TC-324B/344B, Warner Instruments, EUA) and was continuously perfused with aCSF bubbled with carbogenic mixture (95% O₂ + 5% CO₂) for 2-3 mL/minute, at 31°C.

Neurons in brainstem slice were visualized using a Fixed-Stage Upright Microscope (model BX51WI, Olympus, Japão). Initially, we made the identification of viable neurons in the NTS region on the surface of the slice and subsequently the same neuron was analyzed under fluorescence microscopy to identify the presence of fluorescent labeling Green Beads in the cell body. Only labeled neurons were used in our experiments.

Electrophysiological recordings of NTS neurons

Electrophysiological properties of neurons were recorded using *whole cell patch-clamp* (Sakmann & Neher, 1984). Borosilicate glass microelectrodes (Sutter Instruments, Novato, USA) were made using a horizontal puller (P-97 puller, Sutter Instruments, USA) and were filled with solution containing (in mM): 130 Kgluconate, 20 KCl, 2 Mg-ATP, 0.3 Na-ATP, 10 Na₂-phosphocreatin, 5 EGTA, 10 HEPES. The osmolality of solution was ~310 mOsm/Kg-H₂O and pH 7.4 adjusted with KOH.

Neurons were maintained in a resting membrane potential of -70 mV and the recordings were made only 5 minutes after obtaining whole-cell configuration. The signals were acquired using an amplifier Multiclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale USA) connected to a data acquisition system (DIGIDATA 1440, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The software pClamp 10 (Molecular Devices, USA) was used for signal acquisition and data analysis. Series resistance was checked regularly during the experiments, and cells presenting large variations or series resistance greater than 30 MΩ were discarded.

Active and passive membrane properties of NTS neurons

To evaluate the passive properties, negative current were injected in current-clamp mode (-12, 5; -25; -3,5 e -50 pA) during 200 ms, and the membrane potential was recorded. Using linear regression we built a relationship between current

injection and membrane potential; the value of the slope of the curve corresponds to the membrane resistance.

For the evaluation of active properties of neurons, positive current were injected in current clamp mode (+12,5; +25; +37,5; +50 e +62,5 pA) during 200 ms and membrane potential was recorded. The relationship between the injection of positive current and the number of action potentials evoked was determined. We also used the phase plane graph to evaluate the kinetics properties of the action potential. This analysis was performed on the first action potential triggered by the first positive injected current. For this, the voltage derivative with time (dV/dt) was calculated and then a graphical representation of dV/dt was constructed against the voltage. From that graph the maximum values of dV/dt was considered as an estimate of the maximum conductance to sodium (Jenerick 1963). We considered as threshold of action potential the voltage value in which dV/dt varied more than 10 V (Gudes et al., 2015). This experimental protocol was performed in the presence of the GABA_A antagonist (picrotoxin, 100 μ M) and non-NMDA glutamatergic receptor antagonist (DNQX 20 μ M). These antagonists were efficient in abolishing post-synaptic currents in NTS-VLM neurons, as described in previous studies (Accorsi-Mendonça et al., 2009, Andresen & Yang, 1990).

Glutamatergic currents evoked by the stimulation of the tractus solitarius stimulus

To evaluate the effects of SH and Minocycline treatment on the amplitude and short-term depression of the postsynaptic currents evoked by the stimulation of *tractus solitarius* (TS-eEPSCs), a concentric bipolar electrode (Frederick Haer Company, USA) was positioned on the TS ipsilateral to the recorded neuron. The electrode was connected to a stimulator with pulse isolator (D2A, Digitier, UK) which produced the stimulus (intensity: 0 - 50V, duration: 0.2 ms) applied to TS. After obtaining the whole-cell configuration, in the voltage-clamp mode, five TS stimuli were performed at the 10 Hz frequency. For the stimulus, we used the minimum voltage in which we obtained the greater TS-eEPSCs amplitude (Accorsi-Mendonça et al., 2011). The experiments were carried out in the presence of picrotoxin, which allowed us to evaluate the isolated glutamatergic currents. With this protocol we evaluated: a) the amplitude of the currents evoked by the TS stimulus, b) the opposite of the coefficient of variation squared ($1/CV^2$), which is a parameter

providing information about synaptic plasticity (Bekkers & Stevens, 1990), c) the kinetics of TS-eEPSCs and d) the depression in the amplitude of the currents in response to the train of 5 consecutive TS stimuli. It is noteworthy that the amplitude, $1/CV^2$ and kinetic evaluations of the TS-eEPSC were performed only in the currents evoked by the first TS stimulus. The mean of these variables was obtained for each neuron after at least 15 replicates of the protocol in those cells.

The unquantal TS-eaEPSCs obtained by replacement of extracellular calcium by strontium

Here we evaluated the effects of SH and treatment with Minocycline on postsynaptic terminals of NTS-VLM neurons. For this, we replaced the extracellular calcium (Ca^{2+}) for an equimolar concentration of strontium (Sr^{2+}), in order to desynchronize the TS-eaEPSCs. Strontium binds to synaptotagmin, the vesicles protein sensitive to calcium, with a different kinetic affinity for calcium, which promotes an asynchronous release pattern, decomposing TS-eaEPSCs into possible smaller unquantal currents (Oliet et al. 1996, Bekkers & Clements 1999, Almado et al., 2012). This protocol allowed us to directly evaluate the post-synaptic component "q" which represents the current generated by a quantal release of neurotransmitter.

Spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) and miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) of NTS-VLM neurons

After obtaining the whole-cell configuration, in the voltage clamp mode, picrotoxin (100 μ M) was added to the bath in order to isolate excitatory currents, and 5 minutes after the sEPSCs were recorded. The Tetrodotoxin (TTX 1 μ M), a voltage-dependent sodium channel blocker, was added to the bath to eliminate the influence of the action potential on the synaptic transmission and thus to register only the postsynaptic currents generated by the spontaneous release of neurotransmitters. After 5 minutes of the addition of TTX to the bath the solitary tract was stimulated to confirm the effectiveness of TTX in abolishing postsynaptic currents. Then, miniature post-synaptic spontaneous currents (mEPSCs) were recorded. The amplitude and frequency of currents were calculated and compared between groups.

Microglia cell evaluation in the NTS region

After 24 hours in the protocol of sustained hypoxia or normoxia, rats were removed from the chambers, deeply anesthetized with sodium pentobarbital (72 mg/kg i.v.; Cenvet Australia) and were transcardially perfused with 400 ml of ice cold 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) followed by fixation with 400 ml of ice cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4). After fixation, brainstem was removed and post fixed overnight in the same fixative at 4° C. Transverse slices of the brainstem (40µm) containing the NTS region were obtained using vibrating microtome (VT1200S, Leica, Germany) and then stored in cryoprotectant solution (30% sucrose, 30% ethylene glycol, 2% polyvinylpyrrolidone in 0.1 M PBS) at 20° C. The immunohistochemical processes were performed for the labeling the Iba-1 (iodinized calcium binding adaptor molecule-1) that is a microglia/macrophage-specific calcium binding protein, present in all the microglia cells. As primary antibodies it was used: Iba1, rabbit polyclonal (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Cat# 019-19741) and as secondary antibodies: Donkey anti-rabbit, Alexa Fluor 488-conjugated, (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Cat# 711-546-152). Slices were mounted sequentially on glass slides (Thermo Fisher Scientific, Victoria, Australia), cover-slipped with Vectashield (H-1000, Vector Laboratories, CA, USA) and sealed with clear nail polish.

The image of brainstem sections containing the NTS region, were acquired using an Axio Imager Z2 (ZEISS, Germany). The dorsal region of the slices, where the NTS is located, was photographed using a magnification of 20x covering an area of 1028.20 µm x 583.60 µm. All images were exported to the software for biological analyzes ImageJ, and analyzes were performed using the maximum intensity projection of each image. A rectangular area covering the NTS bilaterally was drawn and standardized for all slices and a cell counting plugin was used for the evaluation of the number of microglia in the NTS region. For the morphological analyzes, binary images were 'skeletonized' with ImageJ and analyzed with the "AnalyzeSkeleton" plugin. The skeletal analysis was used to count the number of cell branches and the size of each branch, which were normalized by the total number of microglia of each slice. The data presented represent an average of the analysis of three slices of each animal. Blind analyzes of these brainstem images from control and SH rats were

performed by an investigator not informed about the identification of the experimental group of each rat.

Statistical analysis

All results were expressed as dispersion $\pm$ SEM. For the comparisons between the parameters evaluated in the groups, we used the two-way analysis of variance (ANOVA two-way) followed by Fishers Least Significant Difference (**LSD**) test. The graphics and statistical analysis were made using the GraphPad Prism program (version 6, GraphPad, La Jolla, USA). The electrophysiological experiments were analyzed using the Clampfit software (pClamp version 10, Axon Instrument, USA) or Mini Analysis program (Synaptosoft Inc., USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$, 5% of significance.

RESULTS

Effect of Minocycline on cardiovascular parameters of rats submitted to SH

Both groups [vehicle (n=15) or Minocycline (n=15)] submitted to SH showed significant increase in MAP (104 ± 2 vs 88 ± 2 and 96 ± 2 vs 87 ± 2 mmHg, respectively) when compared to their respective controls (vehicle n=16 and Minocycline, n=16). However, the increase in MAP of animals treated with Minocycline was significantly lower than in vehicle-treated animals (Figure 1 and Figure 2 panel A).

Significant increases in systolic arterial pressure (SAP) and diastolic arterial pressure (DAP) of vehicle-treated animals submitted to SH (SAP: 134 ± 3 vs 116 ± 4 and DAP: 86 ± 2 vs 68 ± 2 mmHg) compared to control group were also observed. However, this increase was not significantly in SH animals treated with Minocycline (SAP: 123 ± 3 vs 116 ± 3 ; DAP 76 ± 2 vs 69 ± 3 mmHg) compared to control (Figure 2, panels B and C). Heart rate (HR) of animals submitted to SH treated with vehicle or Minocycline was significantly higher (583 ± 13 vs 522 ± 11 and 571 ± 13 vs 495 ± 12 bpm, respectively) when compared to control groups. No significant difference was observed in HR between rats treated with vehicle or Minocycline (Figure 2, panel D).

Electrophysiological recordings of NTS neurons projecting to the VLM

For electrophysiological recordings of NTS neurons projecting to VLM, histological verification was performed to check the injection site of the retrograde tracer. Nucleus ambiguus and inferior olive were used as reference of location (Figure 3, panel A). When the injection site was restricted to the VLM area, the experiments with NTS neurons presenting the fluorescent labeling were performed (Figure 3, panel B, C and D). Studies provide evidence that NTS neurons involved in the chemoreflex pathways are mostly located at the caudal and intermediate commissural NTS (Donoghue et al, 1984; Accorsi-Mendonça et al, 2011). Our experiments were performed preferentially in neurons from these regions, since most of labeled neurons were found on these NTS subdivision.

Effect of Minocycline on passive and active properties of NTS-VLM neurons of rats submitted to SH

No differences were found between groups in relation to input resistance [Cont. vehic.: $1204 \pm 106 \text{ M}\Omega$ (n=10); Cont. mino.: $1343 \pm 177 \text{ M}\Omega$ (n=11); SH vehic.: $1225 \pm 180 \text{ M}\Omega$ (n=12); SH mino.: $1679 \pm 191 \text{ M}\Omega$ (n=9)] and the resting membrane potential [Cont vehic.: $-75 \pm 4 \text{ mV}$ (n=9); Cont min.: $-70 \pm 2 \text{ mV}$ (n=11); SH vehic.: $-71 \pm 3 \text{ mV}$ (n=11); SH mino.: $-80 \pm 4 \text{ mV}$ (n=10)].

Regarding the active properties of neurons, no differences were observed in the frequency discharge of NTS neurons from different groups (Cont vehic.: n=12; Cont Min: n=11; SH vehic.: n=10 e SH Mino.: n=9) in response to injected currents as shown in Figure 4, panel B and Table 1. We also did not observed statistical differences when both group were compared in relation to the threshold, maximum sodium conductance and amplitude of the hyperpolarization after the action potential [(HPA) table 2], calculated by the phase plane graphic as illustrated in figure 4 panel C.

Effects of SH and treatment with Minocycline on TS-eEPSCs

Cardiovascular and respiratory responses triggered by hypoxia occur via activation of the peripheral chemoreflex which afferent fibers reach the CNS through TS and make the first synaptic contact with the NTS neurons (Donoghue et al. 1984, Andresen & Kunze, 1994). In this context, we investigated the excitatory

neurotransmission evoked by the electrical stimulation of the TS in order to simulate the neurotransmission that occurs during activation of cardiovascular reflexes.

The data showed that SH produced an increase in the EPSCs amplitude evoked by the first TS stimulation in NTS-VLM neurons of vehicle-treated animals (352 ± 67 pA; $n=12$) compared to their control group (168 ± 21 pA; $n=13$). This increase was not observed in neurons of minocycline-treated SH animals (189 ± 41 pA; $n = 14$) when compared to their control group (124 ± 21 pA; $n=10$). It was observed noted that the amplitude of the TS-eEPSC was significantly lower in the neurons of the SH animals treated with the anti-inflammatory when compared to the TS-Eepsc from rats treated with the vehicle. These changes are shown in Figure 5, Panels A, B and C.

Different analyzes of the TS-eEPSC were performed in order to investigate the possible mechanisms related to these alterations. An increase in the amplitude of TS-eEPSC could be explained by different changes in synaptic transmission, including presynaptic events such as increased release probability or number of active synapses and post-synaptic events such as increased number of receptors in the post- synaptic membrane (Del Castillo & Katz, 1954; Oliet et al., 1996).

For each neuron studied, we recorded at least 10 TS-eEPSC, which allowed us to calculate the coefficient of variation of the amplitude of these currents. The inverse of the square of the coefficient of variation ($1/CV^2$) is a parameter that bring important information about synaptic plasticity, since changes in $1/CV^2$ are usually related to changes in the probability of vesicular release and number of active synapses (Bekkers & Stevens, 1990). In our studies, no change was observed in relation to the $1/CV^2$ of the different experimental groups [Cont. vehic.: 35 ± 8 ($n=13$); Cont. mino.: 31 ± 6 ($n=9$); SH vehic.: 33 ± 9 ($n=11$); SH mino.: 22 ± 3 ($n=14$), Figure 5, panel D].

We also did not observe any change in the kinetics of TS-eEPSC in relation to the half-width [(cont. vehic.: $6 \pm 0,5$ ms ($n=12$); SH vehic.: 6 ± 0.7 ms ($n=11$); cont. mino.: 7 ± 0.4 ms ($n=10$); SH mino.: 6 ± 0.3 ms ($n=14$)] rise time (cont vehic.: $2.2 \pm 0,2$ ms; SH vehic.: $2,3 \pm 0,2$ ms; cont mino.: 2.4 ± 0.2 ms; SH mino.: $2.3 \pm 0,1$ ms) and decay time (cont. vehic.: 9 ± 1 ms; SH vehic.: 12 ± 2 ms; cont. mino 12 ± 1 : ms; SH mino: 12 ± 1 ms) as shown in the figure 6.

Short-term depression of TS-eEPSC in NTS-RVL neurons of SH rats

The evaluation of the short-term depression of TS-eEPSC may provide indications about the release probability of neurotransmitter (Pr) of a synapse. If the increase in TS-eEPSC amplitude was a consequence of an increase in Pr , we would expect that the short-term depression to be more pronounced in the neurons of the vehicle-treated SH rats.

The data documented that the TS-eEPSC amplitude decay was similar between the 4 experimental groups, indicating that SH and the treatment with minocycline do not alter the short-term depression of these currents, as shown in table 3 and Figure 7. The TS-eEPSC failures were computed in the calculation of the mean amplitude of these currents. Currents that presented an amplitude smaller than the average of the noise plus two standard deviations was considered failure. However, it is worth to note that the failure rate was extremely low for both experimental groups, as shown in Table 4.

The unquantal TS-eaEPSCs obtained by replacement of extracellular calcium by strontium (Sr^{2+})

The data of our evaluations of $1/CV^2$ and short-term depression provide consistent indications that the increase in TS-eEPSC amplitude observed in NTS-VLM neurons from vehicle-treated SH rats was not due to pre-synaptic changes. Therefore, we evaluated the possible effects of HM and minocycline treatment on the post-synaptic terminals of NTS-VLM neurons. For this, we evaluated the TS-eaEPSCs recorded after the replacement of extracellular calcium by an equimolar concentration of Sr^{2+} , in order to desynchronize the TS-eEPSCs in possible unquantal currents (figure 8, panel A).

The asynchronous currents in the presence of Sr^{2+} were evaluated from at least 25 stimulus of TS. Only the eaEPSCs obtained during the first 200 ms following TS stimulation were considered for the data and the first eaEPSCs evoked immediately after the TS stimulus was excluded from the analyses, once its currents often presents a greater amplitude than the others, and therefore it would not represent a completely decomposed current.

Considering that our aim was to evaluate the unquantal currents, we analyzed the relative frequency distribution of the amplitudes of eaEPSCs. As previously observed by Almado et al., (2012), we verified that the curve that represent the sum

of two Gaussians described the data better than only one Gaussian. Thus, we fit the function representing the sum of two Gaussians to the distribution of the amplitudes of the individual TS-aeEPSCs values of each neuron. For this analysis we used the average of the first Gaussian (corresponding to the peak), which represented the average amplitude of the unquantal currents. The panel B of figure 8 shows the mean relative distribution of the amplitudes of the TS-aeEPSCs of each experimental group.

We observed that the amplitude of TS-aeEPSCs was higher in the neurons of vehicle-treated SH rats [24 ± 3 pA ($n=4$)] compared to the control group [11 ± 1 pA ($n=4$)], this increase was not evidenced in minocycline-treated SH group relative to its control [10 ± 1 pA ($n=4$) vs. minocycline control 15 ± 3 pA ($n=4$)], Figure 8 C and D panels].

Considering our knowledge about the magnitude of the quantum currents (q) and the amplitude of the individual TS-eEPSCs of each neuron, we were able to calculate the mean quantum content (m) of the TS-eEPSCs, which, the average number of vesicles composed of TS-eEPSCs (equation 1: $m = PSC / q$).

The variable m is a product of the number of active synapses (n) by the probability of release (Pr). Therefore according to the equation 1, changes in m would be due to changes in presynaptic parameters. However, we did not observe significant changes in m values between experimental groups [Cont. vehic.: 10 ± 2 ($n=4$); Cont. min.: 8 ± 2 ($n=4$); SH vehic.: 14 ± 3 ($n=4$); SH min.: 15 ± 4 ($n=4$)] as evidenced in panel D of figure 8. These latter data support the evidence that the increase in the amplitude of TS-eEPSCs is not from presynaptic changes.

Effect of minocycline on spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) and miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) of NTS-VLM neurons of SH rats

It was observed an increase in the frequency and amplitude of sEPSCs in the SH vehicle-treated animals (4.1 ± 0.8 Hz, 26 ± 2 pA, $n=15$, respectively) when compared to the control group (1.3 ± 0.3 Hz, 16 ± 2 pA, $n=18$). However, this increase was not observed in SH minocycline-treated rats (Frequency: 0.15 ± 0.4 Hz, Amplitude: 16 ± 2 pA, $n=13$) in relation to its control group (Frequency: 0.9 ± 0.1 Hz, Amplitude: 22 ± 2 pA, $n=13$) as shown in Figure 9, panel B and C.

To assess whether or not changes observed in spontaneous excitatory

currents were dependent on action potentials or they just reflect changes in the mechanisms of spontaneous release of neurotransmitter, we recorded the miniature excitatory postsynaptic currents (msEPSCs) after the addition of TTX in the bath. Therefore, under this experimental condition we were sure that these currents were not influenced by action potentials. No difference was observed in the frequency of msEPSCs between all the experimental groups [(Cont. vehic.: 1 ± 0.3 Hz (n=8); Cont mino.: 0.8 ± 0.1 Hz (n=6); SH vehic.: 2 ± 0.4 Hz (n=9); SH mino.: 2 ± 0.5 Hz (n=7)]. The same was observed for the amplitude (Cont vehic.: 17 ± 2 pA; Cont mino.: 20 ± 5 pA; SH vehic.: 27 ± 3 pA; SH mino.: 21 ± 4 pA) as showed in the figure 9, panel E and F.

Quantification of the number of microglia in the NTS region of animals submitted to sustained hypoxia

The counting of Iba-1 labeled microglia was performed blindly by a researcher who did not know which experimental group belonged each brainstem slice evaluated. Three slices of the brainstem (40 μ m) of each animal containing the intermediate NTS region (Figure, 1 panel A) were quantified. We evaluated microglia of the intermediate NTS because most of the electrophysiological experiments were performed in this region, since it is in this location where we found the highest number of labeled neurons (NTS neurons projecting to VLM).

An equal counting area was defined for all the analyzed slices and this area covered the intermediate NTS bilaterally. For these analyzes, the mean values obtained among the three quantified slices of each animal were considered. We observed that the number of microglia was increased in rats treated with the vehicle and submitted to SH (251 ± 13 microglia) when compared to the control group (185 ± 11 microglia). However, this increase was not observed in animals submitted to SH treated with minocycline (209 ± 1 microglia) in relation to the control group (197 ± 20 microglia), as illustrated in the Figure 10.

Although the number of microglia has increased in the NTS of rats submitted to SH, no statistical difference was found between the groups in relation to the morphological characteristics evaluated by the skeleton analysis (Figure 10, panel D). As demonstrated by the quantification of number of branches/cell (Figure 2, panel B; Cont. Veic: 32 ± 1 ; Cont. Mino: 34 ± 1 ; SH Veic: 34 ± 1 ; SH Mino: 34 ± 3), the branches length (Figure 2, panel C; Cont. Veic: $9 \pm 0,3$; Cont. Mino: $8 \pm 0,3$; SH Veic:

10 ± 1; SH Mino: 11 ± 1) and the end points (Figure 2, panel D; Cont. Veic: 21 ± 0.8; Cont. Mino: 22 ± 0.4; SH Veic: 22 ± 0.7; SH Mino: 23 ± 1).

DISCUSSION

In the present study we identify that the vehicle-treated rats submitted to SH presented an increase in MAP, SAP, DAP and HR. These results are consistent with previous data showing that exposure to SH produce an increase in blood pressure associated with an increased sympathetic activity in humans and experimental models (Calbet, 2003; Hansen & Sander, 2003; Rostrup, 1998; Hainsworth & Drinkhill, 2007; Hainsworth et al., 2007; Moraes et al., 2014).

The possible mechanisms involved in the autonomic changes triggered by SH have been studied by different laboratories (Moraes et al., 2014; Zhang et al., 2008; Popa et al., 2011). In this context, several evidences point out that these alterations seems to be due to an increase in the excitability of the neural pathways of chemoreflex (Zhang et al., 2008; Liu et al., 2009; Accorsi-Mendonça e cols., 2015). Indeed, studies have shown that increased chemosensitivity or tonicity of the carotid body glomus cells could induce increased sympathetic activity in these animals, as previously demonstrated in other models of hypertension (ABDALA et al., 2012; MARCUS et al., 2014).

It is noteworthy that SH rats treated with anti-inflammatory presented an increase on SAP, DAP and MAP significantly lower than those observed in vehicle-treated SH animals, indicating the involvement of the inflammatory process in the mechanisms underlying the cardiovascular changes observed in this model of hypoxia. Moreover, no difference was observed between the cardiovascular parameters of control groups treated with vehicle or with minocycline, showing that under normoxic conditions minocycline is not affecting the neural pathways involved in the cardiovascular regulation.

Several studies have demonstrated that hypoxic conditions are associated with inflammatory process in the carotid body cells, which are origin of the peripheral chemoreflex. Studies by Liu et al (2009) documented an increase in gene expression of pro-inflammatory cytokines and recruitment of macrophages in carotid body of rats submitted to SH and this increase in inflammatory markers were associated with increased sensitivity of carotid body. In fact, a recent study indicated that

proinflammatory cytokines increase the excitability of the carotid body cells (Liu et al., 2013). It is noteworthy that the increased activity of the carotid body cells is associated with increased blood pressure levels (McBryde et al., 2013; Del Rio et al., 2012).

SH also induces an inflammatory process in the CNS. Recently, Song et al., (2016) showed that short-term SH increases TNF- α and IL-1 β mRNA expression in brain cortex of rats. Furthermore, it was demonstrated an increased number of activated microglia in the NTS of mice after SH exposure (Lee et al., 2003; Farber & Kettenmann, 2005, Tadmouri et al., 2014) and also an increased expression of proinflammatory cytokines in the NTS of rats exposed to short-term and chronic SH (Hocker et al., 2017; Popa et al., 2011). Although these previous studies have shown that inflammation plays a key role in the excitability of carotid body and in the NTS there is a lack of studies about the influence of inflammatory process in these areas on the cardiovascular regulation.

Considering that NTS neurons are integral to the cardiovascular and respiratory reflexes activated by hypoxia (Machado, 2001), we evaluated the influence of treatment with Minocycline on intrinsic properties and synaptic transmission at this nucleus. The experiments were performed in previously labeled neurons sending projections to VLM, which are probably related to cardiorespiratory modulation and chemoreflex pathways (Guyenet, 2006; Feldman and Del Negro, 2006, Machado, 2001). Our data are showing that the input resistance or resting membrane potential were not different among groups, indicating that SH or minocycline treatment does not produce changes in the passive properties of NTS neurons. These data corroborate with previous studies by Zhang et al. (2008 and 2009), which documented that SH does not change the passive properties of NTS neurons receiving direct projections from carotid body.

The evaluation of excitability of NTS-VLM neurons and intrinsic characteristics of the action potential of these cells also evidenced that SH and anti-inflammatory treatment did not change in the active properties of these neurons. Changes in the excitability of these neurons seems to be related to changes in the ionic currents of voltage-sensitive channels, especially the transient potassium currents in the context of the NTS (Dekin & Getting, 1987; Dundaram et al., 1997).

Although our data are not showing major changes in the intrinsic properties of neurons, significant changes were found at the synaptic transmission. We are

showing that SH increases the amplitude of TS-eEPSC in NTS-VLM neurons. These results are consistent with previous data from our laboratory demonstrating that excitatory synaptic transmission in unlabeled NTS neurons is facilitated by exposure to SH (Accorsi-Mendonça et al., 2015). Similar responses were observed by ZHANG et al., (2008; 2009) in studies that evidenced an increase in TS-eEPSC after chronic exposure to SH. It is important to note that studies by Kline et al. (2007) and Almado et al., 2012 demonstrated opposite effect NTS neurons of rats submitted to the model of chronic intermittent hypoxia, once these neurons presented significant reduction of TS-eEPSC after 10 days of exposure to HCl, revealing that synaptic plasticity in NTS may occur differently, depending on the model of hypoxia to which rats are exposed.

Interestingly, we noted that the increase in TS-eEPSC amplitude was significantly different only in the neurons of vehicle-treated rats, because neurons of minocycline-treated rats showed no difference in TS-eEPSC. The increase in TS-eEPSC amplitude observed only in vehicle treated rats was probably triggered by an effect of SH on one or more of the variables determining synaptic transmission. We used the short-term depression protocol and the evaluation of $1/CV^2$ in order to investigate if these changes were due to presynaptic mechanisms (Bekkers & Stevens, 1990; Chen & Bonham, 1999). However, no significant changes were observed between the data from experimental groups in relation to short-term synaptic depression or in $1/CV^2$. Although previous studies have shown that the neural pathways related to the peripheral chemoreflex are more activated after SH, our result provided evidence that SH does not produced any local changes in synaptic terminals making connections to NTS-VLM neurons, because presynaptic terminal were not altered by SH.

It is worth pointing out that the evaluation of desynchronized unquantal currents, obtained by the replacement of extracellular Ca^{2+} by Sr^{2+} , presented the same pattern of the TS-eEPSC currents. The TS-asEPSC presented increased amplitude only in NTS-VLM neurons of SH rats treated with the vehicle. In other words, this protocol revealed that the unquantal release of vesicles produces, on the postsynaptic membrane of these neurons, a current with larger amplitude. These data indicate that SH altered the postsynaptic terminal, which mechanisms seems to be related to by an increase in the density of glutamatergic receptors in this region. We are suggesting that the inflammatory process is part of the mechanisms linked to the post-synaptic terminal changes in NTS-VLM neurons, based upon that the

increase in the amplitude of the unquantal currents were prevented by treatment with the anti-inflammatory minocycline.

Our analyzes of msEPSCs indicated that the changes triggered by hypoxia did not affect the miniature neurotransmission, once the increase in frequency and amplitude observed in the sEPSCs were not observed in the miniature currents obtained after the addition of TTX the bath. It is worth to note that spontaneous neurotransmission and action-dependent neurotransmission involve distinct mechanisms, and may originate from the release of different sets of vesicles (SARA et al., 2005; SIR et al., 2011; SMITH et al. 2012). Minocycline was effective in preventing the changes the sEPSCs depending on action potential. These data are consistent with studies by González et al. (2007) demonstrating that minocycline reduces the frequency of excitatory post-synaptic spontaneous currents and the release of glutamate in cultures of hippocampal neurons.

The role of mediators of the inflammatory process on the post-synaptic membrane has been elucidated by different experimental approaches. It has been shown in hippocampal neurons that TNF- α increases the insertion of alpha-amino-3-hydroxy-methyl-5-4-isoxazolepropionic (AMPA) receptors on the plasma membrane, in addition to reducing the number of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors to this an inhibitory neurotransmitter. All these changes together contribute to the increase of neuronal excitability (Ogoshi et al., 2005; Stellwagen et al., 2005; Beattie et al., 2010). IL-1 β has similar effects on neurons, since it increases calcium current through the phosphorylation of receptors of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype (Viviani et al., 2003). IL- 1 β and TNF can also increase expression of the neural growth factor (NGF), altering the synaptic plasticity (Woolf et al., 1997), an additional factor reinforcing the evidence about the influence of inflammatory cytokines on neuronal activity. Studies by Kannan et al. (1996) have shown that the central or peripheral administration of IL-1 β increases blood pressure and renal sympathetic tone in rats. In addition, Kang et al. (2009) have shown that intracerebroventricular infusion of an inhibitor of NF- κ B significantly attenuates angiotensin II-induced hypertension.

We observed that SH also induces an increase in the number of microglia in the intermediate NTS and this increase was not observed in RATS previously treated with minocycline. These data indicate that SH represents an efficient chemotactic stimulus to recruiting microglial cells for NTS. The data are also indicating that

minocycline was effective in reducing microglial activation, which is in agreement with previous studies documenting that minocycline reduces inflammation in the CNS by inhibition of microglia cells (Zemke et al., 2014; Stirling et al., 2015).

In spite the fact that we did not observe morphological changes in these cells for the activated amoeboid state, these findings are not enough to discard the possibility of an increase in the microglial activity triggered by our model of sustained hypoxia. It is noteworthy that these cells have a high motility and ability to change their morphology quickly. Previous studies showed that depending on the situation, microglia may acquire the "alerted microglia" phenotype, a state in which these cells are more activated than in their basal condition, but are not yet fully activated as in their amoeboid state; in this case, even if activated, these microglia could have a morphology that is quite similar to the surveilling microglia (Hanisch and Kettenmann, 2007; Kettenmann et al., 2011; Karperien et al., 2013). Based on these studies, it is important to note that the study of microglia requires a careful interpretation, since microglial activation appears to occur gradually, comprising progressive morphological and physiological changes, and does not necessarily change from its basal state to extreme states of activation. We only assessed the microglia after 24 hours of SH protocol, and therefore we cannot ruled out the possibility that morphological or phenotype changes occurred in a time window before our evaluation. In fact, studies by Tadmouri et al., (2014) using a specific marker for activated microglia, showed that the number of active microglia was increased in the NTS in the period comprised between 6 and 24 hours of exposure to sustained hypoxia. In addition, Stokes et al., (2017) using a model of hypobaric sustained hypoxia, showed that the microglia change from branched to amoeboid state within the first hours of exposure to hypoxia, and returns to the branched state after 24 hours of exposure. Although these changes may occur in the time window of 6 and 24 hours of the experimental protocol of SH, in the present study we are showing that the functional changes in the NTS neurons persist after the end of the experimental protocol of 24h of exposition to SH.

Here we demonstrated that the treatment with Minocycline prevented the changes in excitatory synaptic transmission in NTS-VLM neurons, probably by postsynaptic mechanisms, and also increases in the number of microglial cells in the intermediated NTS regions of rats submitted to SH. We conclude that inflammatory process triggered by SH contributes to the increase in excitatory synaptic

transmission of NTS-VLM neurons. Since our studies were conducted in labeled NTS neurons probably related to the chemoreflex pathways, we suggest that the increased excitatory synaptic transmission at the level of these NTS neurons contribute to the sympathetic overactivity and hypertension observed in SH rats.

REFERENCES

ABDALA, A. P. et al. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 17, p. 4269–4277, 1 set. 2012.

ACCORSI-MENDONÇA, D. et al. Are l-glutamate and ATP cotransmitters of the peripheral chemoreflex in the rat nucleus tractus solitarius? **Experimental Physiology**, v. 94, n. 1, p. 38–45, 1 jan. 2009.

ACCORSI-MENDONÇA, D. et al. Synaptic profile of nucleus tractus solitarius neurons involved with the peripheral chemoreflex pathways. **Neuroscience**, v. 197, p. 107–120, 1 dez. 2011.

ACCORSI-MENDONÇA, D. et al. Enhanced Firing in NTS Induced by Short-Term Sustained Hypoxia Is Modulated by Glia-Neuron Interaction. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 35, n. 17, p. 6903–6917, 29 abr. 2015.

ALMADO, C. E. L.; MACHADO, B. H.; LEÃO, R. M. Chronic intermittent hypoxia depresses afferent neurotransmission in NTS neurons by a reduction in the number of active synapses. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 47, p. 16736–16746, 21 nov. 2012.

ANDRESEN, M. C.; KUNZE, D. L. Nucleus tractus solitarius--gateway to neural circulatory control. **Annual Review of Physiology**, v. 56, p. 93–116, 1994.

ANDRESEN, M. C.; YANG, M. Y. Non-NMDA receptors mediate sensory afferent synaptic transmission in medial nucleus tractus solitarius. **The American Journal of Physiology**, v. 259, n. 4 Pt 2, p. H1307-1311, out. 1990.

BEATTIE, M. S.; FERGUSON, A. R.; BRESNAHAN, J. C. AMPA-receptor trafficking and injury-induced cell death. **The European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 2, p. 290–297, jul. 2010.

BEKKERS, J. M.; STEVENS, C. F. Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 346, n. 6286, p. 724–729, 23 ago. 1990.

CALBET, J. A. L. Chronic hypoxia increases blood pressure and noradrenaline spillover in healthy humans. **The Journal of Physiology**, v. 551, n. Pt 1, p. 379–386, 15 ago. 2003.

DEKIN, M. S.; GETTING, P. A. In vitro characterization of neurons in the ventral part of the nucleus tractus solitarius. II. Ionic basis for repetitive firing patterns. **Journal of Neurophysiology**, v. 58, n. 1, p. 215–229, jul. 1987.

DEL CASTILLO, J.; KATZ, B. Quantal components of the end-plate potential. **The Journal of Physiology**, v. 124, n. 3, p. 560–573, 28 jun. 1954.

DEL RIO, R. et al. Carotid body inflammation and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia. **The European Respiratory Journal**, v. 39, n. 6, p. 1492–1500, jun. 2012.

DENG, Y. et al. Amoeboid microglia in the periventricular white matter induce oligodendrocyte damage through expression of proinflammatory cytokines via MAP kinase signaling pathway in hypoxic neonatal rats. **Brain Pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 18, n. 3, p. 387–400, jul. 2008.

DONOGHUE, S. et al. The central projections of carotid baroreceptors and chemoreceptors in the cat: a neurophysiological study. **The Journal of Physiology**, v. 347, p. 397–409, fev. 1984.

ELTZSCHIG, H. K.; CARMELIET, P. Hypoxia and inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 7, p. 656–665, 17 fev. 2011.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 232, mar. 2006.

GONZÁLEZ, J. C. et al. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca(2+) signalling in hippocampal neurons. **The European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2481–2495, nov. 2007.

GUDES, S. et al. The role of slow and persistent TTX-resistant sodium currents in acute tumor necrosis factor- α -mediated increase in nociceptors excitability. **Journal of Neurophysiology**, v. 113, n. 2, p. 601–619, 15 jan. 2015.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335–346, maio 2006.

HAINSWORTH, R.; DRINKHILL, M. J. Cardiovascular adjustments for life at high altitude. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 158, n. 2–3, p. 204–211, 30 set. 2007.

HANSEN, J.; SANDER, M. Sympathetic neural overactivity in healthy humans after prolonged exposure to hypobaric hypoxia. **The Journal of Physiology**, v. 546, n. Pt 3, p. 921–929, 1 fev. 2003.

HARTMANN, G. et al. High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein. **Cytokine**, v. 12, n. 3, p. 246–252, mar. 2000.

HOCKER, A. D. et al. The impact of inflammation on respiratory plasticity. **Experimental neurology**, v. 287, n. Pt 2, p. 243–253, jan. 2017.

JENERICK, H. PHASE PLANE TRAJECTORIES OF THE MUSCLE SPIKE POTENTIAL. **Biophysical Journal**, v. 3, p. 363–377, set. 1963.

KANG, Y.-M. et al. Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 82, n. 3, p. 503–512, 1 jun. 2009.

KANNAN, H. et al. Activation of sympathetic outflow by recombinant human interleukin-1 beta in conscious rats. **The American Journal of Physiology**, v. 270, n. 2 Pt 2, p. R479-485, fev. 1996.

KAUR, G. et al. Microglia and central nervous system immunity. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 21, n. 1, p. 43–51, jan. 2010.

KIERNAN, E. A. et al. Mechanisms of microglial activation in models of inflammation and hypoxia: Implications for chronic intermittent hypoxia. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 6, p. 1563–1577, 15 mar. 2016.

KLEIN, N. C.; CUNHA, B. A. Tetracyclines. **The Medical Clinics of North America**, v. 79, n. 4, p. 789–801, jul. 1995.

KLINE, D. D.; RAMIREZ-NAVARRO, A.; KUNZE, D. L. Adaptive depression in synaptic transmission in the nucleus of the solitary tract after in vivo chronic intermittent hypoxia: evidence for homeostatic plasticity. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 17, p. 4663–4673, 25 abr. 2007.

KUBO, K. et al. Inflammatory cytokines in BAL fluid and pulmonary hemodynamics in high-altitude pulmonary edema. **Respiration Physiology**, v. 111, n. 3, p. 301–310, mar. 1998.

LEE, J.-W. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 36, n. 1, p. 1–12, 29 fev. 2004.

LIU, X. et al. Adaptation to chronic hypoxia involves immune cell invasion and increased expression of inflammatory cytokines in rat carotid body. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 296, n. 2, p. L158-166, fev. 2009.

MARCUS, N. J. et al. Carotid body denervation improves autonomic and cardiac function and attenuates disordered breathing in congestive heart failure. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 2, p. 391–408, 15 jan. 2014.

MING, Z.; CRISWELL, H. E.; BREESE, G. R. Evidence for TNF α Action on Excitatory and Inhibitory Neurotransmission in the Central Amygdala: A Brain Site Influenced by Stress. **Brain, behavior, and immunity**, v. 33, p. 102–111, out. 2013.

MORAES, D. J. A. et al. Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 9, p. 2013–2033, 1 maio 2014.

OGOSHI, F. et al. Tumor necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) induces rapid insertion of Ca²⁺-permeable alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA)/kainate (Ca-A/K) channels in a subset of hippocampal pyramidal neurons. **Experimental Neurology**, v. 193, n. 2, p. 384–393, jun. 2005.

OLIET, S. H.; MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. Bidirectional control of quantal size by synaptic activity in the hippocampus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 271, n. 5253, p. 1294–1297, 1 mar. 1996.

PAXINOS, G. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Sixth Edition** Spiral-bound. 6 edition ed. [s.l.] Academic Press, 2006.

POPA, D. et al. Ibuprofen blocks time-dependent increases in hypoxic ventilation in rats. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 178, n. 3, p. 381–386, 30 set. 2011.

SAKMANN, B.; NEHER, E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. **Annual Review of Physiology**, v. 46, p. 455–472, 1984.

SARA, Y. et al. An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. **Neuron**, v. 45, n. 4, p. 563–573, 17 fev. 2005.

SMITH, S. M. et al. Calcium regulation of spontaneous and asynchronous neurotransmitter release. **Cell calcium**, v. 52, n. 3–4, p. 226–233, set. 2012.

STELLWAGEN, D. et al. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 12, p. 3219–3228, 23 mar. 2005.

STIRLING, D. P. et al. Minocycline as a neuroprotective agent. **The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry**, v. 11, n. 4, p. 308–322, ago. 2005.

STOKES, J. A. et al. Minocycline blocks glial cell activation and ventilatory acclimatization to hypoxia. **Journal of Neurophysiology**, v. 117, n. 4, p. 1625–1635, 1 abr. 2017.

TADMOURI A, CHAMPAGNAT J, MORIN-SURUN MP. Activation of microglia and astrocytes in the nucleus tractus solitarius during ventilatory acclimatization to 10% hypoxia in unanesthetized mice. **J Neurosci Res**. 2014 May; 627-33.

TAYLOR, C. T. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 17, p. 4055–4059, 1 set. 2008.

VIVIANI, B. et al. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 25, p. 8692–8700, 24 set. 2003.

WOOLF, C. J. et al. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 3, p. 417–424, jun. 1997.

ZEMKE, D.; MAJID, A. The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 27, n. 6, p. 293–298, dez. 2004.

ZHANG, W. et al. Chronic sustained and intermittent hypoxia reduce function of ATP-sensitive potassium channels in nucleus of the solitary tract. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 5, p. R1555–R1562, nov. 2008.

ZHANG, W. et al. Chronic Sustained Hypoxia Enhances Both Evoked EPSCs and Norepinephrine Inhibition of Glutamatergic Afferent Inputs in the Nucleus of the Solitary Tract. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 10, p. 3093–3102, 11 mar. 2009.

FIGURES

Figure 1: Cardiovascular recordings of representative rats from each experimental group showing the tracings of pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP), and heart rate (HR).

Figure 2: Average of mean arterial pressure (panel A), systolic arterial pressure (panel B), diastolic arterial pressure (panel C) and heart rate (panel D) of control and SH rats treated with vehicle or minocycline.

Figure 3: *Photomicrographs of coronal sections of the brainstem showing the ventrolateral medulla (VLM) and NTS neurons identified by retrograde labeling.* Panel A: A photomicrograph showing the ventral aspect of the medulla containing the nucleus ambiguus, VLM, inferior olive and microinjection site of the retrograde tracer revealed by the fluorescence of the Green Beads. Panel B: An arrow indicating a healthy NTS neuron. Panel C: An arrow indicating the fluorescence observed in the same NTS neurons showed in B. Panel D: overlay of the neuron showed in B and fluorescence showed in C.

Figure 4: *Analysis of the active properties of NTS-VLM neurons from control and SH rats treated with vehicle or minocycline.* Panel A: Representative plot of an action potential with some of its intrinsic characteristics highlighted. Panel B: Mean values of the number of action potential for each depolarizing current amplitude injected into the NTS-VLM neurons of the different experimental groups. Panel C: Phase plan graph showing the variations of membrane potential during an action potential. Panel D: Mean values of the threshold. Panel E: maximum sodium conductance. Panel E: Hyperpolarization after the action potential in the neurons of the four experimental groups.

Figure 5: *Excitatory postsynaptic currents evoked by the tractus solitarius stimulus (TS-eEPSCs) of NTS-VLM neurons from SH rats treated with vehicle or minocycline.* Panel A: TS-eEPSCs recordings of representative neurons of each experimental group evidencing the increase in TS-eEPSCs amplitude just in the neuron of the SH animal treated with vehicle (arrow). Panel B: Mean values of amplitude of TS-

eEPSCs. Panel C: Cumulative distribution of the amplitude of *TS-eEPSCs*. Panel D: Mean values of $1/CV^2$ of the *TS-eEPSCs* from the NTS-VLM neurons of control and SH rats treated with minocycline or vehicle.

Figure 6: *Kinetic properties of TS-eEPSCs*. Panel A: Representative Tracing of a TS-eEPSC and its kinetic characteristics graphically represented. Panel B: Average values of Half-width of *TS-eEPSCs*; Panel C: The rise time *TS-eEPSC* and Panel D: Decay time of TS-eEPSC from NTS-VLM neurons of control and SH rats treated with vehicle or with minocycline.

Figure 7: *Short-term depression of TS-eEPSCs*. Panel A: Representative recording of EPSC resulting from a train of 5 stimulus with a frequency of 10 Hz to TS. Panel B: Graphic representation of the values of TS-eEPSC decay relative to the first evoked current in NTS-VLM neurons of the experimental groups.

Figure 8: *Evaluation of the desynchronized currents (TS-eaEPSCs)*. Panel A: Representative trace showing the desynchronization of TS-eaEPSCs resulting from the substitution of Ca^{2+} extracellular (left) by the Sr^{2+} (right). Panel B: Mean of relative distribution of the TS-eaEPSCs amplitudes of the NTS-VLM neurons from control and SH rats treated with vehicle (left) and the control and SH rats treated with minocycline (right). Panel C: Values of the mean amplitude of TS-eaEPSCs of the four experimental groups. Panel D: Mean values of the quantum content (m) of control and SH rats treated with vehicle or minocycline.

Figure 9: *Spontaneous and miniature excitatory post-synaptic currents of NTS neurons*. Panel A: Representative tracings showing the sEPSCs of neurons representative from each experimental group. Panel B: Average data of frequency of the sEPSCs of NTS-VLM neurons. Panel C: Average data of amplitude of the sEPSCs of NTS-VLM neurons. Panel D: Tracings showing the msEPSCs of neurons representative of each group. Panel E: Average data of frequency of the msEPSCs of NTS-VLM neurons. Panel F: Average data of amplitude of the msEPSCs of NTS-VLM neurons from control and SH rats treated with vehicle or minocycline.

Figure 10: Microglia cells in the NTS. Panel A: Fluorescence image showing microglia (green) identified by immunohistochemistry for the Iba-1 microglial marker in the NTS. Panel B: Average number of microglia cells in the NTS of control and SH rats treated with vehicle or with minocycline. Panel C: Images in a greater magnification showing the NTS of one rat representative of each experimental group. Panel D: Morphological characteristics of microglia in the NTS. Binary images of microglia were 'skeletonized' and analyzed with the "AnalyzeSkeleton" plugin; branches (orange); end points (blue). Average number of branch/ cell (Panel E); branch length (Panel F) and end points/ cell (Panel G). iNTS: NTS intermediário; CC: central channel; AP: Área postrema.

Table 1: Mean $\pm$ SEM of the number of action potential in response to increasing depolarizing current injection in NTS neurons of each experimental group.

Group	0 pA	12,5 pA	25 pA	37,5 pA	50 pA
Control vehicle (n=12)	3 $\pm$ 2	17 $\pm$ 6	27 $\pm$ 8	31 $\pm$ 9	32 $\pm$ 11
Control Minocycline (n=11)	0.3 $\pm$ 0.2	6 $\pm$ 2	20 $\pm$ 6	31 $\pm$ 8	35 $\pm$ 10
SH vehicle (n=10)	3 $\pm$ 2	16 $\pm$ 5	28 $\pm$ 7	31 $\pm$ 8	35 $\pm$ 9
SH minocycline (n=9)	0.17 $\pm$ 0.12	19 $\pm$ 4	34.6 $\pm$ 7	37 $\pm$ 9	33 $\pm$ 11

Table 2: Mean $\pm$ SEM of the values of the intrinsic characteristics of the first action potential triggered by the first hyperpolarizing current injected into the NTS neurons of each experimental group.

Group	Threshold (mV)	Na ⁺ máx (mV/ms)	HPA (mV)
Control vehicle (n=7)	-53 $\pm$ 3	199 $\pm$ 13	-65 $\pm$ 1
Control Minocycline (n=7)	-52 $\pm$ 1	208 $\pm$ 30	-63 $\pm$ 1
SH vehicle (n=8)	-52 $\pm$ 2	195 $\pm$ 31	-65 $\pm$ 2
SH minocycline (n=8)	-51 $\pm$ 2	190 $\pm$ 16	-68 $\pm$ 3

Table 3. Mean $\pm$ SEM of the relative amplitude of TS-eEPSCs resulting from a train of 5 stimulus with a frequency of 10 Hz to TS.

Groups	Relative amplitude (%)				
	stim1	stim2	stim3	stim4	stim5
Control vehicle (n=13)	100	72 $\pm$ 6	62 $\pm$ 6	58 $\pm$ 4	52 $\pm$ 6
Control Minocycline (n=10)	100	63 $\pm$ 8	55 $\pm$ 8	51 $\pm$ 8	47 $\pm$ 8
SH vehicle (n=12)	100	79 $\pm$ 4	74 $\pm$ 6	65 $\pm$ 5	63 $\pm$ 6
SH minocycline (n=12)	100	67 $\pm$ 6	62 $\pm$ 6	54 $\pm$ 7	53 $\pm$ 7

Table 4. Mean $\pm$ SEM of the percentage values of TS-eEPSCs failures.

Group	% failures				
	stim1	stim2	stim3	stim4	stim5
Control vehicle	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,5 $\pm$ 0,5	0 $\pm$ 0	1,7 $\pm$ 1
Control Minocycline	0 $\pm$ 0	0,4 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 1	1,2 $\pm$ 0,8
SH vehicle	0,3 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,3
SH minocycline	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,5 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,5	0 $\pm$ 0

FIGURE 1

FIGURE 2

A) Ventro Lateral medulla

Labeled neuron in the NTS

B)

C)

D)

FIGURE 3

FIGURE 4

FIGURE 5

FIGURE 6

FIGURE 7

FIGURE 8

Spontaneous excitatory currents (sEPSCs)

Miniature spontaneous excitatory currents (msEPSCs)

FIGURE 9

FIGURE 10

ANEXO B- Artigo publicado não relacionado à Tese

Pacemaking Property of RVLM Presympathetic Neurons

Daniela Accorsi-Mendonça[†], Melina P. da Silva[†], George M. P. R. Souza, Ludmila Lima-Silveira, Marlusa Karlen-Amarante, Mateus R. Amorim, Carlos E. L. Almado, Davi J. A. Moraes and Benedito H. Machado^{*}

Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Valdir Andrade Braga,
Federal University of Paraíba, Brazil

Reviewed by:

Simon McMullan,
Macquarie University, Australia
Julie Yu-Hwa Chan,
Kaohsiung Chang Gung Memorial
Hospital, Taiwan

*Correspondence:

Benedito H. Machado
bhmachad@fmrp.usp.br

[†] Joint first authors.

Specialty section:

This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 25 June 2016

Accepted: 07 September 2016

Published: 22 September 2016

Citation:

Accorsi-Mendonça D, da Silva MP, Souza GMPR, Lima-Silveira L, Karlen-Amarante M, Amorim MR, Almado CEL, Moraes DJA and Machado BH (2016) Pacemaking Property of RVLM Presympathetic Neurons. *Front. Physiol.* 7:424. doi: 10.3389/fphys.2016.00424

Despite several studies describing the electrophysiological properties of RVLM presympathetic neurons, there is no consensus in the literature about their pacemaking property, mainly due to different experimental approaches used for recordings of neuronal intrinsic properties. In this review we are presenting a historical retrospective about the pioneering studies and their controversies on the intrinsic electrophysiological property of auto-depolarization of these cells in conjunction with recent studies from our laboratory documenting that RVLM presympathetic neurons present pacemaking capacity. We also discuss whether increased sympathetic activity observed in animal models of neurogenic hypertension (CIH and SHR) are dependent on changes in the intrinsic electrophysiological properties of these cells or due to changes in modulatory inputs from neurons of the respiratory network. We also highlight the key role of I_{NaP} as the major current contributing to the pacemaking property of RVLM presympathetic neurons.

Keywords: neurogenic hypertension, sympathetic activity, presympathetic neurons

RVLM AND SYMPATHETIC OUTFLOW

Presympathetic neurons located in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) are responsible for generating the sympathetic drive to the cardiovascular system and ultimately determine cardiac output and vascular resistance (Dampney, 1994). Original studies by Owsjannikow and Dittmar, from Carl Ludwig's laboratory, suggested the presence of a vasomotor center in the medulla (apud Seller, 1996). These authors performed controlled lesions in the brainstem and simultaneously recorded arterial pressure. After several precise anteroposterior transections in the brain axis, they observed that a small area in the ventrolateral medulla was critical to keep the baseline arterial pressure and identified this region as a vasomotor area (apud Seller, 1996). These findings by the Germans physiologists, in the second half of the 19th century, were the first description of the pressor area and contributed to the identification of spinally projecting sympatho-excitatory neurons.

Additional evidence about the relevance of RVLM in the maintenance of baseline arterial pressure was provided in a study by Guertzenstein and Silver (1974), in which they demonstrated that bilateral inhibition of specific areas in the ventral medulla, using inhibitory amino acid glycine, produced a large fall in the arterial blood pressure, similar to that described by Dittmar after medullo-spinal transections. The role of RVLM in controlling the cardiovascular function was also described in a study by Granata et al. (1983), which reinforced the concept of a key region in the medullary surface for the maintenance of arterial blood pressure. Moreover, RVLM activation by either electrical stimulation or application of excitatory amino acid (glutamate) or even RVLM disinhibition by application of GABA receptor antagonist (bicuculline), in anesthetized

or conscious animals, elicited an increase in sympathetic activity and arterial blood pressure (Willette et al., 1983; Reis et al., 1984; Ross et al., 1984a; de Paula and Machado, 2000; Sakima et al., 2000; Moraes et al., 2011), while bilateral electrolytic lesions, microinjection of GABA or administration of tetrodotoxin, leads to a large fall in the arterial pressure to levels comparable to those observed after transection below brainstem (Dampney and Moon, 1980; Willette et al., 1983; Reis et al., 1984; Benarroch et al., 1986).

Fine anatomical studies by Amendt et al. (1979) and Ross et al. (1981, 1984a) using retrograde transport and immunocytochemical technique demonstrated that RVLM neurons project directly to the thoracic spinal cord, where preganglionic sympathetic neurons are located. Studies by Ross et al. (1984a,b) also demonstrated that terminals of RVLM neurons contain phenylethanolamine-N-methyl transferase (PNMT), characterizing these neurons as C1 adrenaline-synthesizing neurons. Photostimulation of this neuronal phenotype, using lentivirus that expresses channelrhodopsin-2, increased the sympathetic nerve activity and arterial blood pressure in rats *in vivo* confirming the involvement of these cells in the cardiovascular regulation (Abbott et al., 2009).

The direct neural projection from RVLM neurons to spinal cord was also electrophysiologically characterized using antidromic stimulation (Barman and Gebber, 1985; McAllen, 1986; Morrison et al., 1988). In addition to their spinally projection, RVLM neurons are also characterized by the reduction in their firing frequency or silence completely in face of baroreflex stimulation (Schreihofer and Guyenet, 1997). Therefore, it is very well documented that there are presympathetic neurons in RVLM and that their integrity is essential to maintain the level of sympathetic activity and, consequently, the baseline levels of arterial blood pressure.

ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PRESYPATHETIC NEURONS

After anatomical and functional evidence that cell bodies of presympathetic neurons were located at RVLM (Amendt et al., 1979; Ross et al., 1981, 1984a; Barman and Gebber, 1985; Morrison et al., 1988) several studies were performed to evaluate their pacemaker activity. Initially, studies using anesthetized animals described that RVLM neurons presented tonic activity, a state of continuous discharge of action potential, and their firing was highly synchronized with the sympathetic nerve discharge, the arterial pulse and respiration (Barman and Gebber, 1985; Haselton and Guyenet, 1989; Granata and Kitai, 1992). There is also experimental evidence that the firing frequency of RVLM presympathetic neurons is modulated by the afferents inputs from the arterial baroreceptors (Barman and Gebber, 1985; McAllen, 1986; Granata and Kitai, 1992).

A very important study by Sun et al. (1988a) considered two theories to explain the tonic activity of RVLM presympathetic neurons observed in anesthetized animals: (1) the *pacemaker theory*, suggesting that these neurons have intrinsic capacity to

generate rhythmic activity and (2) the *network theory* suggesting that the activity of these neurons is dependent on the balance of tonic excitatory and inhibitory synaptic inputs arising from other brain regions. Although, different studies have documented the presence of excitatory and inhibitory inputs to RVLM neurons (Brown and Guyenet, 1985; Cravo and Morrison, 1993; Dampney, 1994; Schreihofer et al., 2000; Schreihofer and Guyenet, 2002; Gao and Derbenev, 2013), the main issue about these cells was related to their pacemaking capacity. More recently, it was documented that glial cells are also involved in the control of arterial pressure, since selective stimulation of RVLM astrocytes, using optogenetic approach, induced ATP release, depolarization of the presympathetic neurons with consequent increase in the sympathetic nerve activity and arterial pressure (Marina et al., 2013). Therefore, the controversy about the capacity the RVLM neurons generate spontaneous and rhythmic activity persisted by several years.

In this context, Sun et al. (1988a) provided evidence supporting the concept that RVLM neurons, under experimental conditions in which synaptic activity is low, are pacemakers. These authors using anesthetized adult rats and *in vitro* experiments (bloc of vascularly perfused bulb), reduced the excitatory neurotransmission using glutamate-receptor antagonist (kynurenic acid) and recorded the firing frequency of RVLM neurons using extracellular recordings. Intracisternal injection of kynurenic acid increased the firing frequency of functionally identified barosensitive neurons. On the other hand, several studies documented that microinjections of kynurenic acid into RVLM produced no major changes in the sympathetic nerve activity (Sun and Guyenet, 1987; Kiely and Gordon, 1994; Araujo et al., 1999). In a subsequent study, Sun et al. (1988a) suggested that glutamatergic receptor antagonist may also reduce the neuronal activity in CVLM, which sends inhibitory inputs to RVLM neurons, as demonstrated previously by Willette et al. (1984). Studies performed under the effect of kynurenic acid, Sun et al. (1988a) showed that the majority of synaptic inputs to RVLM presympathetic neurons are reduced and that rhythmic firing pattern observed in these cells using extracellular recordings was due to pacemaker activity. Therefore, based on these experiments Sun et al. (1988a) suggested that presympathetic RVLM neurons have intrinsic pacemaker properties. In their study they stated: "The final proof of the pacemaker theory will have to await the result of intracellular recording experiments."

In order to explore in further detail the possible pacemaker activity of RVLM presympathetic neurons, Sun et al. (1988b) performed intracellular recordings in brainstem slices of young adult rats. They described that RVLM neurons display a typical pacemaker membrane potential trajectory with no evidence of excitatory synaptic inputs. However, in their study it was not used any pharmacological tool to exclude possible inputs from neuronal network. They ruled out neuronal network involvement in the generation of the regular firing frequency of these neurons because no excitatory post-synaptic potentials (EPSPs) were observed in response to intracellular hyperpolarizing currents. Moreover, an important methodological advancement of this study was the use of a dye to identify spinal cord-projecting

RVLM neurons, since the RVLM region is functionally, anatomically as well as chemically, heterogeneous. For this purpose, Sun et al. (1988b) performed injection of rhodamine microbeads into the spinal cord (T3 level) in anesthetized animal and few days later they visualized labeled cells on the slices of the ventral medulla. Taking the advantage of retrogradely identified cells and intracellular recordings, Sun et al. (1988b) confirmed that the RVLM presympathetic neurons present electrophysiological properties of auto-depolarization, i.e., characteristics of pacemaker neurons in accordance with the following criteria: (1) pacemaker firing frequency, (2) tonic discharge of at least 4 spikes per second, (3) loss of pacemaker activity during hyperpolarization around -80 mV, (4) absence of detectable EPSPs even during hyperpolarization. However, it is important to mention that the intracellular recordings may damage the neuronal membrane during the penetration of pipette into the cell, producing a leak current, depolarized resting potential (Li et al., 2004) and inactivation of voltage-dependent sodium channels with a consequent decrease in the frequency discharge (Staley et al., 1992).

After these important studies by Sun et al. (1988a,b), several others from different laboratories tried to identify the presence of pacemaker activity in RVLM neurons using different experimental approaches, such as whole-cell patch clamp technique. This approach is more appropriate for recording neuronal activity since it produces less damage to the membrane of recorded cell and provides more information about the intrinsic properties of neurons, such as ionic conductances related to the firing frequency, which is not feasible using extracellular records. In this context, Kangrga and Loewy (1995) performed experiments to analyze the membrane potential of these cells, using brainstem slices from neonatal rats, retrogradely labeled neurons and whole-cell patch clamp. They identified two types of labeled RVLM neurons: pacemaker and non-pacemaker neurons. The pacemaker cells were classified according to the following criteria: the regenerative spontaneous firing frequency at a constant rate and membrane potential trajectory presenting gradual depolarizing interspike ramps. Kangrga and Loewy (1995) also suggested that the intrinsic tonic firing frequency of RVLM neurons was due to the pacemaker activity and not due to the synaptic inputs. However, it is important to note that two factors make the interpretation of these experiments difficult: (1) identification of the intrinsic properties, since no pharmacological antagonism was used to isolate the recorded cell from the neuronal network and, (2) the results obtained using neonatal rats may be different from those observed in adult animals, since the density distribution of ionic channels in neurons is established in the brain development period between P17 and P19 (Beckh et al., 1989; Straka et al., 2005), and the expression and functional properties of several receptors involved in the synaptic transmission may also change during the development (Ben-Ari, 2002; Luján et al., 2005).

Studies by Lipski et al. (1996) also attempted to shed light on the controversy about the pacemaker activity of RVLM neurons and the possible role of the neural network, studying the activity of RVLM neurons using intracellular recordings in anesthetized adult rats. In their work, Lipski et al. (1996) identified RVLM

presympathetic neurons by 2 criteria: (1) inhibition of neuronal activity after stimulation of the aortic depressor nerve and (2) antidromic responses evoked by stimulation of RVLM bulbospinal axons. In contrast to the intrinsic pacemaker properties as previously suggested by Sun et al. (1988a,b) and Kangrga and Loewy (1995), the findings by Lipski et al. (1996) indicated that the spontaneous firing frequency in RVLM presympathetic neurons results from synaptic inputs based on the following evidence: (1) action potentials were normally preceded by depolarizing potentials showing features of fast EPSPs and (2) there was no evidence of regular, ramp-like depolarization between action potentials. Therefore, the results by Lipski et al. (1996) raised again new questions about the “pacemaker” activity of RVLM presympathetic neurons and brought for discussion the network theory related to the generation of action potential in RVLM neurons.

In another study, Lipski et al. (1998) evaluated spontaneous firing frequency in acutely dissociated retrogradely labeled RVLM neurons from neonatal rats (13- to 19-days old), in which all cell-to-cell interactions were eliminated. Using whole-cell patch clamp they verified that these cells presented no pacemaker activity and suggested that the depolarization of these neurons observed in the whole animal was dependent on the influence of inhibitory and excitatory tonic projections from different neuronal networks in the brainstem, such as excitatory projections from the nucleus of tractus solitarius to CVLM neurons, which in turn send monosynaptic inhibitory projections to RVLM presympathetic neurons (Agarwal and Calaresu, 1991).

Although, the pacemaker property of RVLM presympathetic neurons were evaluated in several studies (Sun et al., 1988a,b; Kangrga and Loewy, 1995; Lipski et al., 1996, 1998) there was no consensus about their spontaneous activity, probably due to different experimental conditions, such as the age of animal, presence of anesthesia and different electrophysiological methods used to recordings the neuronal activity (**Figure 1**). In addition, it is important to note that the electrophysiological record of RVLM neurons from juvenile and adult rats is not a simple task mainly due to the high degree of technical difficulties in recording neurons in the ventral medulla, a brainstem area presenting high density of myelin.

In our laboratory, using an *in situ* preparations of juvenile rats (P30-P31), we observed that all RVLM presympathetic neurons fire spontaneously and the frequency of these cells were heterogeneous ranging from 8 to 22 Hz, with depolarized (-52 mV) and hyperpolarized (-63 mV) values of membrane potential (Moraes et al., 2013). Moreover, we observed that respiratory network modulates the activity of RVLM presympathetic neurons, which allow us to classify them into four types, being three of them modulated by respiratory activity. These neurons receive multiple synaptic inputs, observed by a high level of synaptic “noise,” and their baseline firing frequency was probably determined by the balance of excitatory and inhibitory inputs, as observed previously in anesthetized rats by Lipski et al. (1996). However, after pharmacological blockade of fast synaptic transmission in the *in situ* preparation, we clearly verified the intrinsic properties of auto-depolarization in RVLM neurons, confirming their pacemaker properties (**Figure 2**,

FIGURE 1 | The activity of RVLM presympathetic neurons. Typical action potentials of two RVLM neurons (**A,B**) using intracellular recordings in brainstem slices of young adult rats (100–120 g), modified from Sun et al. (1988b, Copyright License Number: 3894201035959). The pacemaker activity of neurons is demonstrated by the resetting after a single spike and absence of detectable EPSPs. (**C,D**) Activity of RVLM neurons using intracellular recordings in anesthetized adult rats (380–500 g), modified from Lipski et al. (1996, Copyright License Number: 3894210262580). Synaptic activity and firing in RVLM neurons (membrane potential: -65 mV, **C**); Synaptic activity and firing during a continuous small polarizing current (-0.1 nA). Arrows indicate EPSPs initiating individual action potentials (**D**).

Moraes et al., 2013). Due to this discrepancy in the firing rate and resting membrane potential, we combined single cell RT-qPCR and immunohistochemistry to characterize the neurochemical profile of these neurons and we observed that all respiratory-modulated RVLM presympathetic neurons investigated were glutamatergic neurons. However, the expression of tyrosine hydroxylase was detected in the inspiratory-modulated and non-respiratory modulated RVLM presympathetic neurons, but not in the post-inspiratory modulated neurons, pointing out to the existence of different subpopulations of RVLM presympathetic pacemaker neurons (Moraes et al., 2013).

We also performed experiments designed to record retrogradely labeled RVLM presympathetic neurons in brainstem slices preparations from juvenile-adult animals (P35, Almado et al., 2014). Ten days after the surgical procedures to retrogradely label these cells, whole-cell recordings in brainstem slices revealed that RVLM neurons are under synaptic modulation and presented a regular and spontaneous firing frequency, which are in agreement with our findings in the *in situ* preparation. Moreover, after blockade of fast synaptic transmission, the firing frequency of RVLM neurons decreased significantly but their activity was not abolished, indicating that these cells have intrinsic properties required to auto-depolarization. Thus, RVLM presympathetic neurons in slices from juvenile/adults rats also behave as

pacemakers under our experimental condition. Therefore, our studies performed in the *in situ* preparation, as well as in the brainstem slices from juvenile-adults rats, support the concept that RVLM presympathetic neurons are indeed pacemakers (Figure 2).

RVLM NEURONS AND NEUROGENIC HYPERTENSION

Several studies have suggested that changes in the intrinsic properties of RVLM neurons are the main cause of cardiovascular disorders, such as neurogenic hypertension, which is characterized by the chronic increase of the arterial blood pressure mediated by sympathetic overactivity rather than vascular and renal dysfunctions (Han et al., 1998; Guyenet, 2006; Toney et al., 2010; Kumagai et al., 2012).

Considering that experimental models of neurogenic hypertension, such as rats submitted to chronic intermittent hypoxia (CIH) and spontaneously hypertensive (SH) rats, show a significant increase in sympathetic tone, more recently we became directly involved with this important issue. Our studies were designed to analyze whether RVLM neurons, from juvenile-adult animals, present an enhancement in their spontaneous firing frequency and whether this enhancement is

responsible for the sympathetic overactivity and hypertension observed in CIH and SH rats. To reach these goals, we used *in situ*, as well as *in vitro* preparations. Firstly, we performed blind whole cell patch clamp recordings of RVLM neurons, using *in situ* preparations of juvenile rats (Paton, 1996). This preparation has the advantage of being anesthesia-free with intact brainstem circuits, while the lack of pulsatility makes the brain amenable to whole-cell recordings (Moraes et al., 2013). Although, we have observed an increase in the firing frequency of RVLM presympathetic neurons from CIH rats in the late-expiratory phase of the respiratory cycle (late-E), the blockade of fast synaptic transmission revealed similar intrinsic firing frequency, membrane potential, input resistance as well as intrinsic excitability when compared with RVLM presympathetic neurons from control rats. These important findings show that the sympathetic overactivity observed in this model of neurogenic hypertension is not due to changes in the intrinsic properties of RVLM presympathetic neurons. Therefore, these cells are not in charge of sympathetic overactivity observed in CIH rats. Furthermore, in the intact respiratory and sympathetic brainstem networks, respiratory-modulated RVLM presympathetic neurons from SH rats revealed an increase in their activity, also in the late-expiratory phase, when compared with those neurons from normotensive rats. It is important to highlight that after synaptic blockade, the pacemaking capacity of RVLM presympathetic neurons was similar in either control, CIH or SH rats, indicating clearly that their increased firing frequency during the late-expiratory phase was driven by excitatory synaptic inputs

from neurons of the respiratory network (Moraes et al., 2013, 2014).

In a series of experiments performed in slices, we also analyzed the effects of CIH on the electrophysiological properties of RVLM presympathetic neurons. As described for the *in situ* approach, in the presence of synaptic blockade RVLM neurons from CIH rats presented no changes in their resting membrane potential, firing frequency and input resistance. Thus, the intrinsic properties of RVLM presympathetic neurons in brainstem slices from juvenile rats exposed to CIH were similar to those observed in neurons from control rats, as we observed in *in situ* preparations of CIH and SH rats. Although, our findings indicate that RVLM presympathetic neurons are pacemakers, our studies using two experimental models of neurogenic hypertension (CIH and SH) also indicate that the increased firing frequency of these cells is not due to changes in their intrinsic properties (Figure 3), but is associated with changes in their modulation by synaptic inputs from the respiratory network.

Taken together, our data, from *in situ* and *in vitro* preparations, allow us to consider that: (1) RVLM presympathetic neurons have intrinsic mechanism that allow them to behave as pacemaker neurons; and (2) the increased respiratory modulation to these neurons is mainly due to excitatory drives (Moraes et al., 2013, 2014), supporting the hypothesis that sympathetic overactivity, present in different models of neurogenic hypertension, might involve changes in the neurons from the respiratory network; the observed changes in these respiratory network neurons seems to increase the excitatory

inputs to the RVLM presympathetic neurons (Czyzyk-Krzeska and Trzebski, 1990; Moraes et al., 2013, 2014).

RVLM PRESYPATHETIC NEURONS: CONDUCTANCE AND ROLES IN THE AUTO-DEPOLARIZATION

Although, changes in the intrinsic electrophysiological properties of RVLM presympathetic neurons are not the cause of neurogenic hypertension in CIH and SH rats, a considerable amount of effort has been committed to understanding the mechanisms underlying the ability of these neurons to auto-depolarize. Studies by Lipski et al. (1998) using retrograde labeled isolated RVLM neurons demonstrated that these cells express high and low voltage-activated calcium channels. These type of channels presents several functionalities including: (1) neurotransmission, (2) activation of calcium-dependent potassium channels, and (3) neuronal excitability control (Llinás, 1988, 2014; Catterall, 2011). Furthermore, low voltage-activated Ca^{2+} channels have been implicated in the auto-depolarization of RVLM presympathetic neurons during short periods of hypoxia (Sun and Reis, 1994a). However, Kangrga and Loewy (1995), using brainstem slices observed that only in 2 out of 13 RVLM presympathetic neurons tested, the application of CdCl_2 , a broad-spectrum calcium channel blocker, abolished the spontaneous firing frequency of cells, while the majority showed a significant enhancement. These results by Kangrga and Loewy (1995) suggested that some RVLM neurons may require Ca^{2+} influx and/or synaptic drive for regenerative firing and are in agreement with studies by Sun and Reis (1994a) demonstrating that increases in the firing frequency of RVLM neurons are synchronized with the rapid increase in Ca^{2+} channel conductance.

In our laboratory, we also investigated the role of calcium channels in the auto-depolarization behavior of RVLM presympathetic neurons. Using *in situ* preparations, we observed that Ni^{2+} , a blocker of type T calcium channels, did not eliminate the activity of neurons, but increased their firing frequency (Moraes et al., 2013). However, we believe that type T calcium channels may play an indirect role in the RVLM neurons activity by stimulating calcium-activated potassium channel (BK_{Ca} channels), which in turn may influence the firing frequency of neurons as suggested by Pierrefiche et al. (1995). This suggestion is supported by a slight increase in the action potential duration and the marked decrease in the amplitude and duration of after-hyperpolarization observed previously by Kangrga and Loewy (1995). All together these studies revealed that calcium currents seems to be involved, but are not the main conductance in the intrinsic auto-depolarization observed in the majority of RVLM presympathetic neurons.

A second conductance that seems to be involved in the auto-depolarization of RVLM presympathetic neurons is related to voltage-dependent potassium channels. Previously, it was demonstrated in neonate rats that RVLM presympathetic neurons express a variety of voltage-dependent K^+ channels (Kangrga and Loewy, 1995; Li et al., 1995). Therefore,

this previous information leads us to investigate whether these channels could drive the intrinsic activity of RVLM presympathetic neurons. We documented that RVLM presympathetic neurons show a delay during the depolarizing phase of action potentials generation. In this case, the current that underlies this delayed excitation seems to be similar to transient potassium current. However, when we blocked this conductance using 4-aminopyridine, it resulted in a decrease in after-hyperpolarization amplitude and an increase in the firing frequency. These findings highlight the contribution of this conductance to the action potential kinetics, but not for the auto-depolarization characteristic of RVLM presympathetic neurons (Moraes et al., 2013).

Considering auto-depolarization as a possible summation of a set of smaller conductances operating at membrane potentials just below the spike threshold, we also explored the presence and contribution of such conductances to RVLM presympathetic neurons, mainly those involved in pacemaker activity. The first to be investigated was a current originated by hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated channels or HCN channels (McCormick and Pape, 1990; Wahl-Schott and Biel, 2009) that is responsible for keeping the resting potential near to the threshold value. Although, HCN channels strongly modulates spontaneous discharge of several cells (Gu et al., 2005; Rodrigues and Oertel, 2006; Kase and Imoto, 2012), it does not seem to be essential for auto-depolarization of RVLM presympathetic neurons and consequently for blood pressure control, since ZD7288, a specific blocker of these channels, did not change the excitability of RVLM presympathetic neurons, sympathetic activity or mean arterial pressure (Miyawaki et al., 2003; Moraes et al., 2013; Tallapragada et al., 2016).

Another conductance potentially involved in intrinsic auto-depolarization of RVLM neurons is the Na^+ conductance resistant to TTX, or the I_{NaP} currents. I_{NaP} has been implicated in the regulation of subthreshold excitability in a variety of excitable cells (French and Gage, 1985; Stafstrom et al., 1985). Computational modeling has shown that I_{NaP} is involved with spontaneous excitability due to its contribution for after-hyperpolarization phase increasing the cellular excitability by reducing threshold, and also by increasing the discharge frequency in response to depolarizing current (Vervaeke et al., 2006).

Studies by Kangrga and Loewy (1995) demonstrated that the spontaneous firing of RVLM presympathetic neurons is due to a cellular mechanism that is fully dependent on I_{NaP} . In a recent study from our laboratory, we obtained similar findings, since a blocker of sodium channels responsible for I_{NaP} (riluzole) abolished the spontaneous activity of these cells (Moraes et al., 2013) revealing the conductance responsible for the intrinsic auto-depolarization of the RVLM presympathetic neurons. Therefore, the I_{NaP} current is essential for the spontaneous activity of these neurons (Figure 4).

Although, our previous studies documented the absence of changes in the intrinsic properties of RVLM presympathetic neurons in neurogenic hypertensive models, we cannot ignore that under some conditions, their intrinsic properties may be altered. There are some studies reporting the

possibility that these neurons present chemosensitivity, especially to hypoxia (Sun et al., 1992; Sun and Reis, 1993, 1994a,b; Wang et al., 2001; Koganezawa and Terui, 2007; Koganezawa and Paton, 2014). Therefore, it is possible that RVLM presympathetic neurons present a detection system of brainstem hypoperfusion/ischaemia through specific membrane conductances. It has been emphasized that hypertension can be produced in response to brain hypoperfusion, but the mechanism for detecting this brain condition remains poorly understood (Paton et al., 2009; Cates et al., 2011). We suggest that RVLM presympathetic neurons can switch from synaptically modulated firing frequency to almost pure pacemaking-driven discharge, in a reversible way, during severe hypercapnic/hypoxia, such as gasping and it may represent the last physiological strategic response to increase sympathetic activity and to the survival of the animals under these challenges. It is also important to note that previous studies demonstrated the involvement of intrinsic membrane conductance such as potassium and

calcium currents as well as persistent sodium currents for the intrinsic response of RVLM presympathetic neurons exposed to hypoxia (Sun and Reis, 1994a; Koganezawa and Paton, 2014). The contribution of different intrinsic membrane conductances for generating changes in pacemaker RVLM presympathetic neuronal activity in hypoperfusion/ischemia awaits additional experiments and it is a critical step for our understanding of the electrophysiological complexity of the RVLM presympathetic neurons under physiological challenges.

CONCLUSION

In this review we described the functional characteristics of RVLM presympathetic neurons and discussed their intrinsic capacity to auto-depolarize and work as pacemakers, a controversial concept in the recent past. Experimental evidence that these neurons are not responsible for sympathetic overactivity observed in models of neurogenic hypertension, such as CIH and SH rats were also discussed. In addition, we highlighted that the main cause of the increased frequency discharge of RVLM presympathetic neurons in these experimental models of neurogenic hypertension is likely related to changes in synaptic inputs from the respiratory network.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BM, coordinate the group of Ph.D. students, post-docs and young faculty to write this review, wrote several parts of the manuscript and revised the final version; DM, wrote several parts of the manuscript and revised the final version; DA, revised the literature, wrote the manuscript, organized the figures and the revised the final version; MS, revised the literature, wrote the manuscript, organized the figures and the revised the final version; GS, wrote some sections of the manuscript and revised the final version; LS, wrote some sections of the manuscript and revised the final version; MK, wrote some sections of the manuscript and revised the final version; MA, wrote some sections of the manuscript and revised the final version; CA, wrote some sections of the manuscript and revised the final version.

FUNDING

The experiments and results from our laboratory presented in this review were part of the Thematic Project funded by FAPESP (2013/06077-5).

REFERENCES

- Abbott, S. B., Stornetta, R. L., Socolovsky, C. S., and West, G. H., Guyenet, P. G. (2009). Photostimulation of channelrhodopsin-2 expressing ventrolateral medullary neurons increases sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. *J. Physiol.* 587(Pt 23), 5613–5631. doi: 10.1113/jphysiol.2009.177535
- Agarwal, S. K., and Calaresu, F. R. (1991). Monosynaptic connection from caudal to rostral ventrolateral medulla in the baroreceptor reflex pathway. *Brain Res.* 555, 70–74. doi: 10.1016/0006-8993(91)90861-O
- Almado, C. E., Leão, R. M., and Machado, B. H. (2014). Intrinsic properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic and bulbospinal respiratory neurons of juvenile rats are not affected by chronic intermittent hypoxia. *Exp. Physiol.* 99, 937–950. doi: 10.1113/expphysiol.2013.077800

- Amenet, K., Czachurski, J., Dembowski, K., and Seller, H. (1979). Bulbospinal projections to the intermediolateral cell column: a neuroanatomical study. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1, 103–107. doi: 10.1016/0165-1838(79)90009-2
- Araujo, G. C., Lopes, O. U., and Campos, R. R. (1999). Importance of glycinergic and glutamatergic synapses within the rostral ventrolateral medulla for blood pressure regulation in conscious rats. *Hypertension* 34(4 Pt 2), 752–755. doi: 10.1161/01.HYP.34.4.752
- Barman, S. M., and Gebber, G. L. (1985). Axonal projection patterns of ventrolateral medullospinal sympathoexcitatory neurons. *J. Neurophysiol.* 53, 1551–1566.
- Beckh, S., Noda, M., Lübbert, H., and Numa, S. (1989). Differential regulation of three sodium channel messenger RNAs in the rat central nervous system during development. *EMBO J.* 8, 3611–3616.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728–739. doi: 10.1038/nrn920
- Benarroch, E. E., Granata, A. R., Ruggiero, D. A., Park, D. H., and Reis, D. J. (1986). Neurons of C1 area mediate cardiovascular responses initiated from ventral medullary surface. *Am. J. Physiol.* 250(5 Pt 2), R932–R945.
- Brown, D. L., and Guyenet, P. G. (1985). Electrophysiological study of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla in rats. *Circ. Res.* 56, 359–369. doi: 10.1161/01.RES.56.3.359
- Cates, M. J., Steed, P. W., Abdala, A. P. L., Langton, P. D., and Paton, J. F. R. (2011). Elevated vertebral artery resistance in neonatal spontaneously hypertensive rats. *J. Appl. Physiol.* 111, 149–156. doi: 10.1152/jappphysiol.00220.2011
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:a003947. doi: 10.1101/cshperspect.a003947
- Cravo, S. L., and Morrison, S. F. (1993). The caudal ventrolateral medulla is a source of tonic sympathoinhibition. *Brain Res.* 621, 133–136. doi: 10.1016/0006-8993(93)90308-A
- Czyżyk-Krzeska, M. F., and Trzebski, A. (1990). Respiratory-related discharge pattern of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. *J. Physiol.* 426, 355–368.
- Dampney, R. A. (1994). Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol. Rev.* 74, 323–364.
- Dampney, R. A., and Moon, E. A. (1980). Role of ventrolateral medulla in vasomotor response to cerebral ischemia. *Am. J. Physiol.* 239, H349–H358.
- de Paula, P. M., and Machado, B. H. (2000). Changes in regional vascular resistance in response to microinjection of L-glutamate into different antero-posterior coordinates of the RVLM in awake rats. *Auton. Neurosci.* 82, 137–145. doi: 10.1016/S0165-1838(00)00104-1
- French, C. R., and Gage, P. W. (1985). A threshold sodium current in pyramidal cells in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 56, 289–293. doi: 10.1016/0304-3940(85)90257-5
- Gao, H., and Derbenev, A. V. (2013). Synaptic and extrasynaptic transmission of kidney-related neurons in the rostral ventrolateral medulla. *J. Neurophysiol.* 110, 2637–2647. doi: 10.1152/jn.00155.2013
- Granata, A. R., and Kitai, S. T. (1992). Intracellular analysis *in vivo* of different barosensitive bulbospinal neurons in the rat rostral ventrolateral medulla. *J. Neurosci.* 12, 1–20.
- Granata, A. R., Ruggiero, D. A., Park, D. H., Joh, T. H., and Reis, D. J. (1983). Lesions of epinephrine neurons in the rostral ventrolateral medulla abolish the vasodepressor components of baroreflex and cardiopulmonary reflex. *Hypertension* 5(6 Pt 3), V80–V84. doi: 10.1161/01.HYP.5.6_Pt_3.V80
- Gu, N., Vervaeke, K., Hu, H., and Storm, J. F. (2005). Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not K_{Ca2}/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* 566(Pt 3), 689–715. doi: 10.1113/jphysiol.2005.086835
- Guertzenstein, P. G., and Silver, A. (1974). Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J. Physiol.* 242, 489–503. doi: 10.1113/jphysiol.1974.sp010719
- Guyenet, P. G. (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 335–346. doi: 10.1038/nrn1902
- Han, Y. M., Chan, Y. S., Lo, K. S., and Wong, T. M. (1998). Spontaneous activity and barosensitivity of the barosensitive neurons in the rostral ventrolateral medulla of hypertensive rats induced by transection of aortic depressor nerves. *Brain Res.* 813, 262–267. doi: 10.1016/S0006-8993(98)00963-9
- Haselton, J. R., and Guyenet, P. G. (1989). Central respiratory modulation of medullary sympathoexcitatory neurons in rats. *Am. J. Physiol.* 256(3 Pt 2), R739–R750.
- Kangrga, I. M., and Loewy, A. D. (1995). Whole-cell recordings from visualized C1 adrenergic bulbospinal neurons: ionic mechanisms underlying vasomotor tone. *Brain Res.* 670, 215–232. doi: 10.1016/0006-8993(94)01282-M
- Kase, D., and Imoto, K. (2012). The role of HCN channels on membrane excitability in the nervous system. *J. Signal Transduct.* 619747, 2012. doi: 10.1155/2012/619747
- Kiely, J. M., and Gordon, F. J. (1994). Role of rostral ventrolateral medulla in centrally mediated pressor responses. *Am. J. Physiol.* 267(4 Pt 2), H1549–H1556.
- Koganezawa, T., and Paton, J. F. (2014). Intrinsic chemosensitivity of rostral ventrolateral medullary sympathetic premotor neurons in the *in situ* arterially perfused preparation of rats. *Exp. Physiol.* 1453–1466. doi: 10.1113/expphysiol.2014.080069
- Koganezawa, T., and Terui, N. (2007). Differential responsiveness of RVLM sympathetic premotor neurons to hypoxia in rabbits. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H408–H414. doi: 10.1152/ajpheart.00881.2006
- Kumagai, H., Oshima, N., Matsuura, T., Igaya, K., Imai, M., Onimaru, H., et al. (2012). Importance of rostral ventrolateral medulla neurons in determining efferent sympathetic nerve activity and blood pressure. *Hypertens. Res.* 35, 132–141. doi: 10.1038/hr.2011.208
- Li, W. C., Soffe, S. R., and Roberts, A. (2004). A direct comparison of whole cell patch and sharp electrodes by simultaneous recording from single spinal neurons in frog tadpoles. *J. Neurophysiol.* 92, 380–386. doi: 10.1152/jn.01238.2003
- Li, Y. W., Bayliss, D. A., and Guyenet, P. G. (1995). C1 neurons of neonatal rats: intrinsic beating properties and alpha 2-adrenergic receptors. *Am. J. Physiol.* 269(6 Pt 2), R1356–R1369.
- Lipski, J., Kanjhan, R., Kruszewska, B., and Rong, W. (1996). Properties of presympathetic neurones in the rostral ventrolateral medulla in the rat: an intracellular study “*in vivo*.” *J. Physiol.* 490(Pt 3), 729–744. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021181
- Lipski, J., Kawai, Y., Qi, J., Comer, A., and Win, J. (1998). Whole cell patch-clamp study of putative vasomotor neurons isolated from the rostral ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.* 274(4 Pt 2), R1099–R1110.
- Llinás, R. R. (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242, 1654–1664.
- Llinás, R. R. (2014). Intrinsic electrical properties of mammalian neurons and CNS function: a historical perspective. *Front. Cell Neurosci.* 8:320. doi: 10.3389/fncel.2014.00320
- Luján, R., Shigemoto, R., and López-Bendito, G. (2005). Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* 130, 567–580. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.09.042
- Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M., Mastitskaya, S., Kasimov, V., Mohamed-Ali, V., et al. (2013). Purinergic signalling in the rostral ventro-lateral medulla controls sympathetic drive and contributes to the progression of heart failure following myocardial infarction in rats. *Basic Res. Cardiol.* 108:317. doi: 10.1007/s00395-012-0317-x
- McAllen, R. M. (1986). Identification and properties of sub-retrofacial bulbospinal neurones: a descending cardiovascular pathway in the cat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 17, 151–164. doi: 10.1016/0165-1838(86)90090-1
- McCormick, D. A., and Pape, H. C. (1990). Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J. Physiol.* 431, 291–318.
- Miyawaki, T., Goodchild, A. K., and Pilowsky, P. M. (2003). Maintenance of sympathetic tone by a nickel chloride-sensitive mechanism in the rostral ventrolateral medulla of the adult rat. *Neuroscience* 116, 455–464. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00705-4
- Moraes, D. J., Bonagamba, L. G., Zoccal, D. B., and Machado, B. H. (2011). Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, R1476–R1486. doi: 10.1152/ajpregu.00825.2010
- Moraes, D. J., da Silva, M. P., Bonagamba, L. G., Mecawi, A. S., Zoccal, D. B., Antunes-Rodrigues, J., et al. (2013). Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by respiratory

- network in rats. *J. Neurosci.* 33, 19233–19237. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3041-13.2013
- Moraes, D. J., Machado, B. H., and Paton, J. F. (2014). Specific respiratory neuron types have increased excitability that drive presympathetic neurones in neurogenic hypertension. *Hypertension* 63, 1309–1318. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02283
- Morrison, S. F., Milner, T. A., and Reis, D. J. (1988). Reticulospinal vasomotor neurons of the rat rostral ventrolateral medulla: relationship to sympathetic nerve activity and the C1 adrenergic cell group. *J. Neurosci.* 8, 1286–1301.
- Paton, J. F. (1996). A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J. Neurosci. Methods* 65, 63–68. doi: 10.1016/0165-0270(95)00147-6
- Paton, J. F. R., Dickinson, C. J., and Mitchell, G. (2009). Harvey Cushing and the regulation of blood pressure in giraffe, rat and man: introducing “Cushing’s mechanism.” *Exp. Physiol.* 94, 11–17. doi: 10.1113/expphysiol.2008.043455
- Pierrefiche, O., Champagnat, J., and Richter, D. W. (1995). Calcium-dependent conductances control neurones involved in termination of inspiration in cats. *Neurosci. Lett.* 184, 101–104.
- Reis, D. J., Ross, C. A., Ruggiero, D. A., Granata, A. R., and Joh, T. H. (1984). Role of adrenaline neurons of ventrolateral medulla (the C1 group) in the tonic and phasic control of arterial pressure. *Clin. Exp. Hypertens.* 6, 221–241. doi: 10.3109/10641968409062562
- Rodrigues, A. R., and Oertel, D. (2006). Hyperpolarization-activated currents regulate excitability in stellate cells of the mammalian ventral cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.* 95, 76–87. doi: 10.1152/jn.00624.2005
- Ross, C. A., Armstrong, D. M., Ruggiero, D. A., Pickel, V. M., Joh, T. H., and Reis, D. J. (1981). Adrenaline neurons in the rostral ventrolateral medulla innervate thoracic spinal cord: a combined immunocytochemical and retrograde transport demonstration. *Neurosci. Lett.* 25, 257–262. doi: 10.1016/0304-3940(81)90401-8
- Ross, C. A., Ruggiero, D. A., Joh, T. H., Park, D. H., and Reis, D. J. (1984a). Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline neurons. *J. Comp. Neurol.* 228, 168–185. doi: 10.1002/cne.902280204
- Ross, C. A., Ruggiero, D. A., Park, D. H., Joh, T. H., Sved, A. F., Fernandez-Pardal, J., et al. (1984b). Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. *J. Neurosci.* 4, 474–494.
- Sakima, A., Yamazato, M., Sesoko, S., Muratani, H., and Fukuyama, K. (2000). Cardiovascular and sympathetic effects of L-glutamate and glycine injected into the rostral ventrolateral medulla of conscious rats. *Hypertens. Res.* 23, 633–641. doi: 10.1291/hypres.23.633
- Schreihöfer, A. M., and Guyenet, P. G. (1997). Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling *in vivo*. *J. Comp. Neurol.* 387, 524–536. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19971103)387:4<524::AID-CNE4>3.0.CO;2-4
- Schreihöfer, A. M., and Guyenet, P. G. (2002). The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 514–521. doi: 10.1046/j.1440-1681.2002.03665.x
- Schreihöfer, A. M., Stornetta, R. L., and Guyenet, P. G. (2000). Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rat. *J. Physiol.* 529(Pt 1), 221–236. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00221.x
- Seller, H. (1996). Carl Ludwig and the localization of the medullary vasomotor center: old and new concepts of the generation of sympathetic tone. *Pflügers Arch.* 432(Suppl. 3), R94–R98.
- Stafstrom, C. E., Schwindt, P. C., Chubb, M. C., and Crill, W. E. (1985). Properties of persistent sodium conductance and calcium conductance of layer V neurons from cat sensorimotor cortex *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 53, 153–170.
- Staley, K. J., Otis, T. S., and Mody, I. (1992). Membrane properties of dentate gyrus granule cells: comparison of sharp microelectrode and whole-cell recordings. *J. Neurophysiol.* 67, 1346–1358.
- Straka, H., Vibert, N., Vidal, P. P., Moore, L. E., and Dutia, M. B. (2005). Intrinsic membrane properties of vertebrate vestibular neurons: function, development and plasticity. *Prog. Neurobiol.* 76, 349–392. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.10.002
- Sun, M. K., and Guyenet, P. G. (1987). Arterial baroreceptor and vagal inputs to sympathoexcitatory neurons in rat medulla. *Am. J. Physiol.* 252(4 Pt 2), R699–R709.
- Sun, M. K., Hackett, J. T., and Guyenet, P. G. (1988a). Sympathoexcitatory neurons of rostral ventrolateral medulla exhibit pacemaker properties in the presence of a glutamate-receptor antagonist. *Brain Res.* 438, 23–40. doi: 10.1016/0006-8993(88)91320-0
- Sun, M. K., Jeske, I. T., and Reis, D. J. (1992). Cyanide excites medullary sympathoexcitatory neurons in rats. *Am. J. Physiol.* 262(2 Pt 2), R182–R189.
- Sun, M. K., and Reis, D. J. (1993). Differential responses of barosensitive neurons of rostral ventrolateral medulla to hypoxia in rats. *Brain Res.* 609, 333–337. doi: 10.1016/0006-8993(93)90892-Q
- Sun, M. K., and Reis, D. J. (1994a). Hypoxia-activated Ca^{2+} currents in pacemaker neurons of rat rostral ventrolateral medulla *in vitro*. *J. Physiol.* 476, 101–116.
- Sun, M. K., and Reis, D. J. (1994b). Hypoxia selectively excites vasomotor neurons of rostral ventrolateral medulla in rats. *Am. J. Physiol.* 266(1 Pt 2), R245–R256.
- Sun, M. K., Young, B. S., Hackett, J. T., and Guyenet, P. G. (1988b). Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostral ventrolateral medulla with putative sympathoexcitatory function: an intracellular study *in vitro*. *Brain Res.* 442, 229–239. doi: 10.1016/0006-8993(88)91508-9
- Tallapragada, V. J., Hildreth, C. M., Burke, P. G., Raley, D. A., Hassan, S. F., McMullan, S., et al. (2016). Tonically active cAMP-dependent signaling in the ventrolateral medulla regulates sympathetic and cardiac vagal outflows. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 356, 424–433. doi: 10.1124/jpet.115.27488
- Toney, G. M., Pedrino, G. R., Fink, G. D., and Osborn, J. W. (2010). Does enhanced respiratory-sympathetic coupling contribute to peripheral neural mechanisms of angiotensin II-salt hypertension? *Exp. Physiol.* 95, 587–594. doi: 10.1113/expphysiol.2009.047399
- Vervaeke, K., Hu, H., Graham, L. J., and Storm, J. F. (2006). Contrasting effects of the persistent Na^{+} current on neuronal excitability and spike timing. *Neuron* 49, 257–270. doi: 10.1016/j.neuron.2005.12.022
- Wahl-Schott, C., and Biel, M. (2009). HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 470–494. doi: 10.1007/s00018-008-8525-0
- Wang, G., Zhou, P., Repucci, M. A., Golanov, E. V., and Reis, D. J. (2001). Specific actions of cyanide on membrane potential and voltage-gated ion currents in rostral ventrolateral medulla neurons in rat brainstem slices. *Neurosci. Lett.* 309, 125–129. doi: 10.1016/S0304-3940(01)02032-8
- Willette, R. N., Barcas, P. P., Krieger, A. J., and Sapru, H. N. (1983). Vasopressor and depressor areas in the rat medulla. Identification by microinjection of L-glutamate. *Neuropharmacology* 22, 1071–1079. doi: 10.1016/0028-3908(83)90027-8
- Willette, R. N., Punnen, S., Krieger, A. J., and Sapru, H. N. (1984). Interdependence of rostral and caudal ventrolateral medullary areas in the control of blood pressure. *Brain Res.* 321, 169–174. doi: 10.1016/0006-8993(84)90696-6

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Accorsi-Mendonça, da Silva, Souza, Lima-Silveira, Karlen-Amarante, Amorim, Almado, Moraes and Machado. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.