

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA**

**Efeitos da hipóxia tecidual aguda sobre as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios pré-simpáticos de ratos previamente submetidos à hipóxia crônica intermitente**

**Marlusa Karlen Amarante**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2015**

**MARLUSA KARLEN AMARANTE**

**Efeitos da hipóxia tecidual aguda sobre as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios pré-simpáticos de ratos previamente submetidos à hipóxia crônica intermitente**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito H. Machado

**RIBEIRÃO PRETO**

**2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico de divulgação, para fins de estudo e pesquisa desde que citada a fonte.

Karlen-Amarante, Marlusa

Efeitos da hipóxia tecidual aguda sobre as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios pré-simpáticos de ratos previamente submetidos à hipóxia crônica intermitente. Ribeirão Preto, 2015.

149 f. : il. : 30 cm

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

Orientador: Machado, Benedito H

1. hipóxia tecidual aguda, 2. tronco cerebral, 3. área rostro ventrolateral do bulbo (RVLM), 4. pré-condicionamento, 5. *whole-cell patch-clamp*

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nome:** Marlusa Karlen Amarante

**Título:** Efeitos da hipóxia tecidual aguda sobre as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios pré-simpáticos de ratos previamente submetidos à hipóxia crônica intermitente

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Fisiologia

**Aprovado em:**

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Wamberto Antonio Varanda**

Instituição: Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes**

Instituição: Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues**

Instituição: Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, UFTM

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino**

Instituição: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFG

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Benedito H. Machado (orientador)**

Instituição: Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico essa tese aos meus pais Gelse e Cesar  
e às minhas irmãs Marla e Karen  
pelo constante incentivo para  
que esse momento fosse possível.*

*Amo vocês!*

## *Agradecimentos*

A caminhada foi longa e muitos foram aqueles que contribuíram para que eu chegasse até aqui. De forma singela e verdadeira quero agradecer:

A Deus, por iluminar e abençoar todos os meus dias! Por providenciar ao longo de minha caminhada o encontro com pessoas maravilhosas que levo em meu coração e minha memória.

Aos meus amados pais Gelse e Cesar e minhas irmãs Marla e Karen. Meus maiores incentivadores, nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos e sempre vibraram com minhas conquistas. Nada teria acontecido sem o amparo amoroso de vocês. Obrigada por compreenderem a minha ausência e me ajudarem a superar tantos momentos. Meu eterno amor e gratidão!

Ao Prof. Dr. Benedito H. Machado por ter acreditado em meu potencial quando eu mesma duvidava e por não ter me deixado desistir nas dificuldades. Agradeço pelas oportunidades de aprendizado constante, pela confiança e incentivo fundamentais para o enriquecimento de meu aprimoramento. Foi uma honra tê-lo como orientador, um exemplo que levo para minha vida pela capacidade de direcionar, incentivar e nos fazer enxergar além. Minha profunda e eterna admiração, respeito e gratidão.

Aos queridos colegas e amigos Cadu, Melina e Davi. Anjos que apareceram na minha vida, me acolheram com o coração, abriram as portas de casa (literalmente) e me receberam com tanto carinho. A paciência, amizade valiosa, competência, os ensinamentos sobre a vida e a eletrofisiologia me fizeram acreditar que eu conseguiria ir adiante e que no final tudo valeria a pena. Muito obrigada por serem meus irmãos de coração!

Às queridas Daniela e Leni que sempre me incentivaram e estiveram disponíveis para me auxiliar em todos os momentos. Obrigada não apenas pelos ensinamentos de conduta ética dentro do laboratório, do profissionalismo e competência que fizeram toda a diferença em minha caminhada. Agradeço acima de tudo pelo companheirismo, amizade, pelos conselhos e abraços carinhosos. Vocês me fizeram ser uma pessoa muito melhor do que aquela que aqui chegou. Perdoem-me pelas inúmeras lágrimas e momentos de ansiedade.

Aos Professores Dr Wamberto A. Varanda, Dr Leonardo Resstel, Dr Gustavo R. Pedrino e Dr Aldo Rogelis Rodrigues pelas discussões enriquecedoras e por aceitarem participar da banca de defesa da tese.

Ao Prof. Dr. Wamberto A. Varanda pelos seus ensinamentos sobre a eletrofisiologia e pelo auxílio com o empréstimo de aparelhos e também de seus técnicos (André e Fernandinho), os quais foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Daniel B. Zoccal pelos sinceros conselhos, palavras de incentivo, amizade e oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Minha admiração e gratidão.

Aos amigos do laboratório George, Ludmila, Mateus, Raphael e aos queridos André Dagostin e Alexandra por todas as horas que passamos juntos, pelas discussões enriquecedoras, pela amizade e por toda a ajuda durante o desenvolvimento de minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ricardo Leão pela sua colaboração enriquecedora para meu aperfeiçoamento e por ajudar a resolver os “ruídos do sistema”.

Aos queridos amigos que conheci no departamento de Fisiologia: Paula Beatriz, João Paulo, Ligia, Renata, Daniel P., André Mecawi, Danilo, Natália, Victor, Beto, Junia; e às amigas que conheci ao longo de minhas diferentes moradas: Fernanda, Mariana, Thaís, Sara, Diandra. Agradeço pelo companheirismo, momentos de alegria e descontração, pela amizade sincera e fundamental que diminuíram a ausência sentida de minha família. Vocês são especiais!

Muitos foram os lugares onde eu morei nesses 4 anos em Ribeirão Preto. Portanto não posso deixar de agradecer a cada um(a) com quem dividi meus dias. Muito obrigada por terem feito meu lar doce lar enquanto estive com vocês!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia pelos ensinamentos.

Aos amigos da Secretaria do Departamento de Fisiologia: Elisa, Cláudia, Fernando, Andréia e Igor pela amizade e eficiente contribuição.

A todos os amigos do Departamento de Fisiologia, pós-graduandos, técnicos e funcionários obrigada pela acolhida e pela amizade dentro e fora da Universidade.

Ao Leonardo, bioterista do departamento, pelo cuidado com os animais e ao Rinaldo, bioterista do biotério central do campus, que sempre atendeu meus pedidos de animais, mesmo que nas horas mais impróprias.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processos: 2009/50113-0, 2011/19408-4 e 2013/06077-5), Capes e CNPQ pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas, que provavelmente por um momento de descuido, não mencionei os nomes, e que contribuíram direta ou indiretamente de uma maneira não menos importante para a realização deste trabalho, muito obrigada.



**Esse trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro da  
FAPESP (2009/50113-0, 2011/19408-4 e 2013/06077-5),  
CAPES e do CNPQ.**

*“Mesmo quando tudo parece desabar,  
cabe a mim decidir entre rir ou chorar,  
ir ou ficar, desistir ou lutar;  
porque descobri, no caminho incerto da vida,  
que o mais importante é o decidir.”*

**Cora Coralina**

## RESUMO

KARLEN-AMARANTE, M. **Efeitos da hipóxia tecidual aguda sobre as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios pré-simpáticos de ratos previamente submetidos à hipóxia crônica intermitente.** 2015. 149f. Tese (Doutorado) – Faculdade de medicina de Ribeirão preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Nesse estudo investigamos os efeitos da hipóxia tecidual aguda (HA) sobre as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos bulboespinais da área rostro-ventrolateral do bulbo (RVLM) de ratos jovens adultos submetidos previamente à hipóxia crônica intermitente (HCI) e os seus respectivos controle. Para marcarmos os neurônios pré-simpáticos bulboespinais da RVLM, ratos Wistar jovens (P19-P21) anestesiados com ketamina e xilazina, receberam microinjeções bilaterais de rodamina, um traçador fluorescente retrógrado, na coluna intermediolateral da medula espinhal (T3-T6) e 2 dias após a recuperação da cirurgia, os animais foram submetidos ao protocolo de HCI, enquanto que ratos controle foram mantidos em condições de normóxia, durante 10 dias. No décimo primeiro dia, os ratos foram novamente anestesiados para a remoção do cérebro e as fatias do tronco cerebral contendo neurônios pré-simpáticos com marcação positivas foram registrados. Utilizamos a técnica de *whole cell patch-clamp* para estudo das propriedades eletrofisiológicas desses neurônios. As propriedades eletrofisiológicas intrínsecas foram analisadas antes e após a HA, a qual foi produzida pela perfusão das fatias do tronco cerebral com uma solução hipóxica (95% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) durante 2 minutos na presença de bloqueadores sinápticos excitatórios e inibitórios. Todos os neurônios pré-simpáticos apresentaram característica intrínseca de autodespolarização e a frequência de disparos basal de potenciais de ação (PAs) desses neurônios de ratos do grupo controle e HCI foram similares [Controle= 5,03 ± 0,4 Hz (n=39) vs HCI= 6,31 ± 0,7 Hz (n=31);  $p > 0,05$ ]. No grupo controle, a HA não alterou a frequência média de disparos de PAs (BS = 5,03 ± 0,4 Hz vs HA = 5,24 ± 0,3 Hz (n=39);  $p > 0,05$ ], porém revelou diferentes perfis de disparo de PAs após 2 min de exposição à HA: *i*) 11 neurônios com aumento na frequência de disparos (BS = 5,1 ± 0,7 Hz vs HA = 7 ± 0,7 Hz;  $p < 0,05$ ); *ii*) 21 neurônios sem alteração na frequência de disparos (BS = 4,8 ± 0,5 Hz vs HA = 5,36 ± 0,6 Hz;  $p > 0,05$ ) e *iii*) 7 neurônios com diminuição na frequência de disparos (BS = 7,3 ± 1,1 Hz vs HA = 3,6 ± 0,7 Hz;  $p < 0,05$ ). No grupo HCI, a HA produziu aumento na frequência média de disparos (BS= 6,31 ± 0,7 Hz vs HA= 7,25 ±

0,8 Hz;  $n=31 - p < 0,05$ ) e na análise do perfil de disparo de PAs, a HA revelou 2 subpopulações: *i*) 9 neurônios com aumento na frequência de disparos (BS =  $4,7 \pm 0,8$  Hz vs HA =  $8,2 \pm 1,4$  Hz;  $p < 0,05$ ) e *ii*) 22 neurônios sem alteração na frequência de disparos (BS =  $7,0 \pm 1,0$  Hz vs HA =  $6,8 \pm 1,0$  Hz;  $p > 0,05$ ). Esse estudo nos permitiu revelar diferentes subpopulações de neurônios pré-simpáticos que responderam de forma distintas à HA. Os resultados também sugerem que a HCI teria um efeito pré-condicionante na excitabilidade intrínseca dos neurônios pré-simpáticos em resposta à HA.

**Palavras-chave:** Hipóxia tecidual aguda; tronco cerebral; área rostro ventrolateral do bulbo (RVLM); pré-condicionamento; *whole-cell patch-clamp*.

## ABSTRACT

KARLEN-AMARANTE, M. **Effects of acute tissue hypoxia on electrophysiological properties of the presympathetic neurons from rats submitted to chronic intermitente hypoxia.** 2015. 149f. Thesis (Ph.D.) – Faculdade de medicina de Ribeirão preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

In this study we evaluated the effects of acute hypoxia (AH) on the intrinsic electrophysiological properties of presympathetic neurons from rostro ventrolateral medulla (RVLM) of juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia (CIH) or normoxic condition (control group). To label the RVLM bulbospinal presympathetic neurons, young Wistar rats (P 19 - 21) anesthetized with ketamine and xylazine, received bilateral microinjections of a fluorescent retrograde tracer (rhodamine retrobeads) were performed into the intermediolateral column of spinal cord (T3-T6) and two days after recovery of the surgery, the animals were submitted to CIH or normoxic protocol, during 10 days. On the 11<sup>th</sup> day, under anesthesia, brainstem slices were obtained and only the labeled RVLM presympathetic neurons were recorded, using *whole-cell patch-clamp* approach to study the electrophysiological properties of these neurons. The intrinsic electrophysiological properties were analyzed before and after AH, which was produced by slice perfusion with hypoxic solution (95% N<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) during 2 min in the presence of excitatory and inhibitory synaptic antagonists. All recorded RVLM presympathetic neurons presented intrinsic pacemaker activity and the baseline firing frequency of these neurons from control and CIH group were similar [Control= 5,03 ± 0,4 Hz (n=39) vs HCI= 6,31 ± 0,7 Hz (n=31);  $p > 0,05$ ]. In the control group, AH do not change the firing rate (BS = 5,03 ± 0,4 Hz vs HA = 5,24 ± 0,3 Hz (n=39);  $p > 0,05$ ), but revealed different pattern of firing frequency after 2 min of AH: *i*) 11 neurons increased the firing frequency (BS = 4,9 ± 0,9 Hz vs HA = 6,9 ± 1,0 Hz;  $p < 0,05$ ); *ii*) 21 neurons do not change the firing frequency (BS = 4,8 ± 0,5 Hz vs HA = 5,36 ± 0,6 Hz;  $p > 0,05$ ) and *iii*) 7 neurons decreased the firing frequency (BS = 7,3 ± 1,1 Hz vs HA = 3,6 ± 0,7 Hz;  $p < 0,05$ ).

In the CIH group, the AH increased the firing rate comparing with basal condition (SB=  $6,31 \pm 0,7$  Hz vs AH=  $7,25 \pm 0,8$  Hz;  $n=31 - p < 0,05$ ) and analyzing the pattern of action potential, AH revealed 2 subpopulations in this group: *i*) 9 neurons increased the firing frequency (SB =  $4,7 \pm 0,8$  Hz vs AH =  $8,2 \pm 1,4$  Hz;  $p < 0,05$ ) and *ii*) 22 neurons do not change the firing frequency (SB =  $7,0 \pm 1,0$  Hz vs AH =  $6,8 \pm 1,0$  Hz;  $p > 0,05$ ).. The data shows that AH revealed different subpopulations of presympathetic neurons and suggest that CIH plays a preconditioning in the intrinsic excitability of presympathetic neurons in response to acute hypoxia.

**Key-words:** Acute hypoxia; brainstem; rostral ventrolateral medulla (RVLM); preconditioning; *whole-cell patch-clamp*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Traçado representativo de um neurônio pré-simpático do RVLM realizado na presença de bloqueadores sinápticos evidenciando o padrão auto-despolarizante de disparo de PAs, sendo à esquerda um neurônio representativo de ratos do grupo controle (Control) e à direita um neurônio representativo de ratos do grupo HCI (CIH) (Almado *et al.*, 2014)..... 40
- Figura 2:** Fotomicrografia representativa do segmento torácico T4 da medula espinhal de rato corado para acetilcolinesterase (Paxinos & Watson, 1998) ilustrando um sítio da microinjeção do neurotraçador fluorescente rodamina (círculos vermelhos) na CIL da medula espinhal, com a finalidade de se realizar a marcação retrógrada dos neurônios pré-simpáticos bulbo-espinhais da RVLM. Os cones verticais ilustram as pipetas de microinjeção contendo o neurotraçador (vermelho) as quais foram introduzidas no sentido dorso-ventral em direção à CIL..... 46
- Figura 3.** Representação das variações da fração inspirada de oxigênio (% Oxigênio) na câmara HCI durante 2 episódios de hipóxia. As barras acima dos traçados indicam o período de injeção de N<sub>2</sub> (barras vermelhas) e O<sub>2</sub> (barras cinzas) dentro da câmara. Durante o período não correspondente às barras, pequenas frações de N<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> eram injetadas para manter a concentração fracional de oxigênio próximo a 20,8%. O valor mínimo da fração inspirada de oxigênio (pico do estímulo hipóxico) foi de 6%, o qual foi mantido durante 30 a 40 segundos, conforme ilustra o painel direito da figura..... 48
- Figura 4. Painel A:** Fotomicrografia representativa de uma fatia do tronco cerebral contendo a área RVLM (Paxinos & Watson, 1998) e a área de interesse ampliada representada no **Painel B:** Fatia do tronco cerebral na câmara de registro na qual se pode identificar o núcleo ambíguo (ponto esbranquiçado) e ventralmente a ele se encontra a região do RVLM. Uma pipeta de registro está sobre a RVLM indicando um neurônio registrado. **Painel C:** Neurônio pré-simpático do RVLM marcado retrogradamente pelas microesferas recobertas com rodamina fluorescendo à estimulação com luz verde. **Painel D:** O mesmo neurônio da figura anterior visualizado por meio do sistema de iluminação oblíqua com magnificação de 2x e a pipeta de registro posicionada sobre o neurônio..... 51
- Figura 5:** Representação esquemática das condições experimentais dos registros eletrofisiológicos dos neurônios pré-simpáticos da RVLM e o tempo de duração da perfusão das fatias..... 55
- Figura 6 –** Método para determinação do potencial de membrana em repouso. O histograma representativo de um neurônio registrado mostra a distribuição dos valores de voltagem da membrana na qual o maior número de pontos corresponde ao potencial de membrana em repouso (RMP)..... 56

<b>Figura 7. Painel A</b> - Desenho representativo do protocolo da injeção de corrente hiperpolarizante em passos de -12,5 pA. <b>Painel B</b> - Registro representativo da voltagem da membrana de um neurônio em resposta à corrente injetada. <b>Painel C</b> – Gráfico da voltagem da membrana vs corrente injetada (V x I), representando o métodos empregado para cálculo da resistência de entrada, na qual a linha verde corresponde ao ajuste de uma reta à porção do gráfico mais linear e próxima ao RMP (0 pA) e a inclinação desta reta corresponde a resistência de entrada.....	57
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática do potencial de ação mostrando algumas das suas características eletrofisiológicas ativas analisadas nos neurônios pré-simpáticos da RVLM antes e após a HA. <i>AHP</i> - hiperpolarização pós-potencial; <i>Tau</i> – a constante de tempo entre a <i>AHP</i> e o limiar de disparo do próximo PA.....	59
<b>Figura 9. Painel A</b> - Registro eletrofisiológico representativo de um neurônio pré-simpático da RVLM com padrão irregular de disparos de PAs e <b>Painel B</b> - o decurso temporal representativo desse mesmo neurônio ilustrando as variações na frequência média de disparo de PAs durante 9 min de registro, refletindo a atividade intrínseca.....	60
<b>Figura 10:</b> Registro basal na configuração <i>current-clamp</i> de um neurônio pré-simpático da RVLM representativo do grupo, mostrando o padrão auto-despolarizante de disparo dos PAs.....	67
<b>Figura 11. Painel A:</b> Distribuição da frequência média de disparo basal dos neurônios pré-simpáticos da RVLM do grupo controle. <b>Painel B:</b> Distribuição dos valores médios do potencial de repouso da membrana (RMP) do grupo controle. <b>Painel C:</b> Distribuição dos valores da capacitância e <b>Painel D:</b> Distribuição dos valores médios da <i>Rinput</i> (n=75).....	68
<b>Figura 12. Painel A:</b> Traçado representativo do registro das correntes em <i>voltage-clamp</i> na condição basal e <b>Painel B:</b> após o bloqueio sináptico, condição na qual observamos a ausência das correntes.....	70
<b>Figura 13.</b> Registro eletrofisiológico representativo de um neurônio pré-simpático: <b>Painel A</b> – sob a perfusão de aCSF na condição controle e <b>Painel B</b> – na presença dos bloqueadores sinápticos. <b>Painel C</b> - Distribuição da frequência média de disparo dos PAs de 63 neurônios registrados antes (CON) e após o bloqueio sináptico (BS). * $p < 0,05$ – diferença em relação à condição basal.....	71
<b>Figura 14. Painel A</b> – Distribuição dos valores médios da capacitância dos neurônios pré-simpáticos após o BS (n= 60). <b>Painel B</b> – Distribuição dos valores do potencial de membrana em repouso (RMP) antes e após o BS (n= 60) e <b>Painel C</b> – resistência média de entrada ( <i>Rinput</i> ) dos registros basais dos neurônios pré-simpáticos realizados antes (n= 48) e após o BS (n= 41).....	72



<b>Figura 15. Painel A</b> – Distribuição dos valores médios da frequência de disparos de PAs dos neurônios pré-simpáticos antes (BS) e após a HA (n= 39). Os círculos representam os valores individuais de cada célula registrada. <b>Painel B</b> – Valores médios da variação da frequência de disparos de PAs ( $\Delta$ ) após a HA. <b>Painel C</b> – Distribuição dos valores do potencial de membrana em repouso (RMP) antes e após a HA. e <b>Painel D</b> – resistência média de entrada (Rinput) dos registros basais dos neurônios pré-simpáticos realizados antes (BS) e após a HA.....	74
<b>Figura 16:</b> Figura representativa dos efeitos de 2 min do protocolo de HA sobre a frequência intrínseca de disparo de PAs normalizados de 39 neurônios pré-simpáticos da RVLM na presença de bloqueadores sinápticos. Valores normalizados a partir da frequência intrínseca obtidos na condição do bloqueio sináptico (BS).....	76
<b>Figura 17:</b> Efeitos de 2 min de HA sobre a frequência intrínseca de disparo dos neurônios do grupo I na presença de bloqueadores sinápticos (n=11). <b>Painel A</b> – Traçado representativo do registro eletrofisiológico de um neurônio pré-simpático durante o bloqueio sináptico e após 2 min de exposição à HA. <b>Painel B</b> – Decurso temporal dos valores médios normalizados de frequência de despolarização a partir dos registros obtidos na condição de normóxia (BS) à esquerda do gráfico (em preto) e na condição da HA à direita (em vermelho) (n=11). Teste ANOVA, seguido de Post-teste de Tukey. * $p < 0.05$ para comparação do tempo 0 s com 120 s de HA. <b>Painel C</b> - distribuição dos valores médios da frequência intrínseca de disparos de PAs (** $p < 0,01$ ).....	79
<b>Figura 18:</b> Efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas passivas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que aumentaram a frequência de disparo (Grupo I) após a HA. <b>Painel A</b> – histograma de amplitude de todos os pontos de um segmento de 10 segundos na condição de bloqueio sináptico ( <b>Ai</b> ) e na hipóxia aguda ( <b>Aii</b> ), para um neurônio representativo. O pico de cada histograma representa o RMP do neurônio. <b>Painel B</b> – distribuição dos valores médios do potencial de membrana em repouso (RMP) na condição do BS e após 2 min de HA (* $p < 0,05$ ); <b>Painel C</b> – distribuição dos valores médios da resistência de entrada (Rinput) na condição do BS e após 2 min de HA (n=6).....	81
<b>Figura 19: Painel A</b> — Amplitude média dos PAs antes (BS) e após a HA e <b>Painel B</b> – a constante de tempo entre a <i>AHP</i> e o limiar para a deflagração do próximo PA ( <i>tau</i> ) antes e após a HA. ** $P < 0,01$ – diferente em relação à condição experimental do bloqueio sináptico (BS).....	82
<b>Figura 20</b> – Efeitos da exposição de 2 min à HA sobre as propriedades ativas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM do grupo I. <b>Painel A</b> - <i>Half-Width</i> ; <b>Painel B</b> - <i>Decay time</i> ; <b>Painel C</b> - <i>Rise time</i> ; <b>Painel D</b> – Hiperpolarização pós-potencial ( <i>AHP</i> ) e <b>Painel E</b> - Coeficiente de variação do intervalo interevento médio dos PAs na situação bloqueio sináptico (BS) comparada com a HA.....	83

**Figura 21:** Efeitos de 2 min de HA sobre a frequência intrínseca de disparo dos neurônios do grupo II na presença de bloqueadores sinápticos (n=21). **Painel A** – Traçado representativo do registro eletrofisiológico de um neurônio pré-simpático durante o BS e após 2 min de exposição à HA. **Painel B** – Decurso temporal dos valores normalizados da frequência de PAs a partir dos registros obtidos na condição de normóxia (BS) à esquerda do gráfico (em preto) e na condição da HA à direita (em verde). **Painel C** – distribuição dos valores médios da frequência intrínseca de disparos de PAs na condição do BS e após 2 min de HA (n=21)..... 85

**Figura 22:** Efeitos da HA sobre as propriedades passivas dos neurônios pré-motores simpáticos da RVLM que não alteraram a frequência de disparo (Grupo II) após o estímulo HA. **Painel A** – histograma de amplitude de todos os pontos de um segmento de 10 segundos para um neurônio representativo, na condição de bloqueio sináptico (**Ai**) e na HA (**Aii**). **Painel B** – distribuição dos valores médios do RMP na condição do BS e após 2 min de HA; e **Painel C** – distribuição dos valores médios da Rinput na condição do BS e após 2 min de HA (n=17)..... 86

**Figura 23:** Efeitos da exposição de 2 min à HA sobre as propriedades ativas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM do grupo II. **Painel A** - amplitude média dos PAs; **Painel B** - constante de tempo da membrana (Tau) e **Painel C** - *half-width* dos neurônios pré-simpáticos da RVLM. \* $P < 0,05$  – diferente em relação à condição experimental do bloqueio sináptico (BS)..... 87

**Figura 24:** Efeitos da exposição de 2 min à HA sobre as propriedades ativas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM do grupo II. **Painel A** - *decay time*. **Painel B** - *rise time*; **Painel C** - hiperpolarização pós-potencial (AHP) e **Painel D** - coeficiente de variação (CV) do intervalo interevento dos neurônios pré-simpáticos da RVLM, comparados com a condição de bloqueio sináptico (BS)..... 88

**Figura 25:** Efeitos de 2 min de exposição à HA sobre a frequência intrínseca de disparo dos neurônios do grupo III na presença de bloqueadores sinápticos (n=7). **Painel A** – Registro eletrofisiológico representativo de um neurônio registrado durante o bloqueio sináptico e após 2 min de HA. **Painel B** – Decurso temporal dos valores normalizados de frequência a partir dos registros obtidos na condição de normóxia (BS) à esquerda do gráfico (em preto) e na condição da HA à direita (em azul). (\*  $p < 0,05$ ). **Painel C** – distribuição dos valores médios da frequência intrínseca de disparos de PAs na condição do BS e após 2 min de HA (n=7)..... 90

**Figura 26:** Efeitos da HA sobre as propriedades passivas dos neurônios pré-motores simpáticos da RVLM que diminuíram a frequência de disparo (Grupo III) após o estímulo HA. **Painel A** – Histograma de amplitude de todos os pontos de um segmento de 10 segundos para um neurônio representativo, na condição de BS (**Ai**) e na HA (**Aii**). **Painel B** – distribuição dos valores médios do potencial de membrana em repouso (RMP) na condição do BS e após 2 min de HA; **Painel C** – distribuição dos valores médios da resistência de entrada (Rinput) na condição do BS e após 2 min de HA (n=6).... 91

<b>Figura 27:</b> Registro eletrofisiológico representativo de um neurônio pré-simpático da RVLM que silenciou o disparo de PA após a exposição à HA durante 2 min. <b>Painel A</b> - o registro eletrofisiológico mostrando os disparos regulares de PA e o momento do silenciamento dos disparos sob o efeito da HA. <b>Painel B</b> - o registro eletrofisiológico do mesmo neurônio pré-simpático silente durante a reoxigenação e o retorno dos disparos de PAs.....	92
<b>Figura 28:</b> Efeitos da exposição de 2 min à HA sobre as propriedades ativas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM do grupo III. <b>Painel A</b> – amplitude média dos PAs; <b>Painel B</b> – <i>half-width</i> ; <b>Painel C</b> - <i>decay time</i> ; <b>Painel D</b> - <i>rise time</i> e <b>Painel E</b> – <i>Tau</i> ; comparados com a condição de bloqueio sináptico (BS).....	94
<b>Figura 29:</b> <b>Painel A:</b> Distribuição da frequência de disparo dos 31 neurônios pré-simpáticos da RVLM dos animais previamente submetidos à HCI, após o bloqueio sináptico. <b>Painel B:</b> Distribuição dos valores do potencial de membrana em repouso (RMP) (n=31) e <b>Painel C:</b> Distribuição dos valores da resistência de entrada da membrana (Rinput) após o bloqueio sináptico (n=25).....	96
<b>Figura 30:</b> <b>Painel A</b> - Distribuição da frequência média de disparo de PAs após o bloqueio sináptico (BS) e após a exposição de 2 min à HA (* $p < 0,05$ , quando comparado com o protocolo de BS; n=31). <b>Painel B</b> – Distribuição da frequência normalizada de disparo de PAs dos neurônios pré-simpáticos da RVLM de animais que foram previamente submetidos à HCI. <b>Painel C</b> – Valores médios da variação da frequência de disparos de PAs ( $\Delta$ ) após a HA.....	98
<b>Figura 31:</b> Efeitos da HA sobre a frequência intrínseca de disparos de PAs dos neurônios pré-simpáticos da RVLM dos animais previamente submetidos à HCI classificados no grupo I. <b>Painel A</b> – Traçado representativo do registro eletrofisiológico de um neurônio pré-simpático durante o bloqueio sináptico e após 2 min de exposição à HA. <b>Painel B:</b> Distribuição da frequência de disparos (n=9); * $p < 0,05$ , teste <i>t</i> pareado.....	100
<b>Figura 32:</b> Efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas passivas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que aumentaram a frequência de disparo (Grupo I) após a HA. <b>Painel A</b> – histograma de amplitude de todos os pontos de um segmento de 10 segundos na condição de bloqueio sináptico ( <b>Ai</b> ) e na hipóxia aguda ( <b>Aii</b> ), para um neurônio representativo. O pico de cada histograma representa o RMP do neurônio. <b>Painel B</b> – distribuição dos valores médios do potencial de membrana em repouso (RMP) na condição do BS e após 2 min de HA; <b>Painel C</b> – distribuição dos valores médios da resistência de entrada (Rinput) na condição do BS e após 2 min de HA.....	101
<b>Figura 33:</b> Efeitos da HA sobre a frequência intrínseca de disparos de PAs e as propriedades passivas de membrana dos neurônios pré-simpáticos da RVLM dos animais previamente submetidos à HCI classificados no grupo II. <b>Painel A:</b> Distribuição da frequência de disparos (n=22). <b>Painel B:</b> distribuição do potencial de repouso da membrana (RMP) (n=22). <b>Painel C:</b> distribuição dos valores da resistência de entrada da membrana (Rinput) (n=17), na condição bloqueio sináptico (BS) após 2 min de HA.....	103

**Figura 34:** Efeitos da HA sobre as propriedades passivas dos neurônios pré-motores simpáticos da RVLM que não alteraram a frequência de disparo (Grupo II) após o estímulo HA. **Painel A** – histograma de amplitude de todos os pontos de um segmento de 10 segundos para um neurônio representativo, na condição de bloqueio sináptico (**Ai**) e na HA (**Aii**). **Painel B** – distribuição dos valores médios do RMP na condição do BS e após 2 min de HA; e **Painel C** – distribuição dos valores médios da Rinput na condição do BS e após 2 min de HA..... 104

**Figura 35** – Comparação dos dados agrupados apresentados nos painéis A e B para comparação do efeito da HA do grupo controle em relação ao grupo HCI e da condição BS e HA do grupo HCI. (Teste ANOVA, \*  $p < 0,05$ ;  $F_{1,138} = 2.09$ )..... 106

**Figura 36** – Comparação da proporção de neurônios pré-simpáticos do grupo controle e HCI classificados conforme a frequência de disparos após a exposição de 2 min à HA em valores absolutos (**Ai**) e porcentagem relativa ao número total de neurônios registrados no grupo controle e HCI (**Aii**)..... 108

**Figura 37** – Fotomicrografia de varredura confocal representativa de um corte coronal do tronco cerebral contendo um neurônio pré-simpático não-adrenérgico da RVLM que aumentou a frequência de disparos em resposta à HA. Com objetiva de 20 x: **Painel A** - neurônio registrado marcado pela biocitina (verde); **Painel B** - neurônios tirosina hidroxilase (rosa) e **Painel C** - a sobreposição das imagens mostrando a localização do neurônio registrado e os neurônios C1 adrenérgicos. Com objetiva de 63 x: **Painel D** - neurônio registrado e seus prolongamentos preenchidos pela biocitina (verde); **Painel E** – neurônio tirosina hidroxilase (rosa) e **Painel F** – a sobreposição das imagens nos mostra a localização do neurônio revelado pela biocitina (em verde) e o neurônio C1 adrenérgico (em rosa)..... 111

**Figura 38** – Fotomicrografia de varredura confocal representativa de um corte coronal do tronco cerebral contendo um neurônio pré-simpático C1 adrenérgico da RVLM que aumentou a frequência de disparos em resposta à HA. Com objetiva de 20x: **Painel A** - neurônio registrado marcado pela biocitina (verde); **Painel B** - neurônios com marcação positiva para TH (vermelho) e **Painel C** - a sobreposição das imagens mostrando a co-localização do neurônio registrado com o neurônio TH positivo (amarelo). Com objetiva de 63x: **Painel D** - neurônio registrado e seus prolongamentos preenchidos pela biocitina (verde); **Painel E** – neurônio TH positivo (vermelho) e **Painel F** – a sobreposição das imagens mostrando a co-localização da marcação com a biocitina e a TH (em amarelo)..... 113

**Figura 39 – Fotomicrografia de varredura confocal representativa de um corte coronal do tronco cerebral contendo um neurônio pré-simpático C1 adrenérgico da RVLM que não alterou a frequência de disparos em resposta à HA.** Com objetiva de 20x: **Painel A** - neurônio registrado marcado pela biocitina (verde); **Painel B** - neurônio tirosina hidroxilase (vermelho) e **Painel C** - a sobreposição das imagens mostrando a co-localização do neurônio registrado (em verde) com a marcação da TH positiva (em vermelho). Com a objetiva de 63x de imersão em óleo: **Painel D** - neurônio registrado e seus prolongamentos preenchidos pela biocitina (verde); **Painel E** – neurônios com marcação positiva para TH (vermelho) e **Painel F** – a sobreposição as imagens nos mostra a co-localização do neurônio registrado com a marcação positiva da TH, o que nos permite concluir que este neurônio registrado é C1 adrenérgico (amarelo)..... 115

**Figura 40 – Fotomicrografia de varredura confocal representativa de um corte coronal do tronco cerebral contendo um neurônio pré-simpático não-adrenérgico da RVLM que diminuiu a frequência de disparos em resposta à HA.** Com objetiva de 20x: **Painel A** - neurônio registrado marcado pela biocitina (verde); **Painel B** - neurônios com marcação positiva para TH (rosa) e **Painel C** - a sobreposição das imagens mostrando a localização do neurônio registrado e os neurônios com marcação positiva para a TH. Com objetiva de 63 x: **Painel D** - neurônio registrado e seus prolongamentos preenchidos pela biocitina (verde); **Painel E** – neurônio com marcação positiva para TH (rosa) e **Painel F** – a sobreposição das imagens nos mostra a localização do neurônio revelado pela biocitina e o neurônio com marcação positiva para a TH, não havendo co-localização..... 117

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Distribuição do número de neurônios pré-simpáticos classificados em cada uma das subpopulações reveladas pela HA do grupo controle e HCl..... 107

**Tabela 2** – Neurônios pré-simpáticos com registros eletrofisiológicos e a marcação fenotípica com a biocitina e imunohistoquímica para a TH..... 118

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Acsf - Líquido cefalorraquidiano artificial (*artificial cerebrospinal fluid*)

AD-DA - Analógico/digital-digital/analógico

AHP - Hiperpolarização posterior ao potencial de ação (*after hyperpolarization*)

ANOVA - Análise de variância

AOS - Apnéia obstrutiva do sono

AP-5 - Ácido 2-amino-5-fosfonoaléico

aug-E - Neurônio com atividade expiratória em crescendo

BS - Bloqueio sináptico

BötC - Complexo Bötzinger

C1 - Grupamento neuronal adrenérgico 1

Ca<sup>2+</sup> - Íons cálcio

CIL - Coluna intermediolateral da medula espinhal

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

CON - Controle

CRV - Coluna respiratória ventral

cVRG - Porção caudal do grupo respiratório ventral,

DNQX - 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona

EGTA - Etilenoglicol-ácido tetraacético

EPM - Erro padrão da média

EPSP - Potencial pós-sináptico excitatório

FiO<sub>2</sub> - Fração inspirada de oxigênio

GABA - Ácido gama-aminobutírico

GABAA - Receptor do ácido gama-aminobutírico do subtipo A (ionotrópico)

gaCSF - Líquido cefalorraquidiano artificial modificado, tendo todo cloreto de sódio substituído por glicerol

GΩ - Gigaohm

HA - Hipóxia aguda

HCI - Hipóxia crônica intermitente

HEPES - Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico

HIF - Fator induzido por hipóxia (*hypoxia-inducible factor*)

$I_h$  - Corrente catiônica ativada por hiperpolarização

$I_{NaP}$  - Corrente persistente de entrada de sódio ( )

KHz - Kiloherztz

KOH - Hidróxido de potássio

KS - Kolmogorov-Smirnov

$Mg^{2+}$  - Íons magnésio

mM - Milimolar

ms - Milissegundo

mV - Milivolt

MΩ - Megaohm

N<sub>2</sub> - Nitrogênio

NA - Núcleo ambíguo

NaCN - Cianeto de sódio

nL - Nanolitros

NMDA - Receptor glutamatérgico do subtipo NMDA

NTS - Núcleo do Trato Solitário

O<sub>2</sub> - Oxigênio

PaO<sub>2</sub> - Pressão parcial do oxigênio no sangue arterial



PAs - Potenciais de ação

pA – Picoampère

PA – Pressão arterial

PAM - Pressão arterial média

pF - Picofaraday

pré-BötC - Complexo pré-Botzinger

PVN - Núcleo paraventricular do hipotálamo

rVRG - Porção rostral do grupo respiratório ventral

RS - Resistência em série

RVLM - Área rostroventrolateral do bulbo

s - Segundos

SNC - Sistema nervoso central

TH - Tirosina hidroxilase

TS - Trato Solitário

V - Volt

$\mu$ M - Micromolar

$\mu$ m - Micrômetro

$\mu$ s - Microsegundo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
1.1. A região denominada “RVLM”.....	29
1.2. A hipóxia.....	35
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
3.1. Animais.....	45
3.2. Marcação dos neurônios pré-simpáticos da RVLM pela microinjeção bilateral de neurotraçador fluorescente na coluna intermediolateral (CIL) da medula espinhal.....	45
3.3. Hipóxia Crônica Intermitente.....	47
3.4. Registros eletrofisiológicos com a técnica de whole-cell patch-clamp.....	48
3.5. Critérios de exclusão das células registradas.....	59
3.6. Caracterização fenotípica dos neurônios pré-simpáticos da RVLM.....	61
3.7. Drogas.....	63
3.8. Análise estatística.....	64
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
4.1. As propriedades eletrofisiológicas passivas intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos controle.....	66
4.2. Efeitos da HA sobre as propriedades intrínsecas passivas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM.....	72
4.2.1 Efeitos da HA sobre as propriedades intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que apresentaram aumento na frequência de disparos de PAs – Grupo I.....	78
4.2.2 Efeitos da HA sobre as propriedades intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que não apresentaram alteração na frequência de disparos de PAs – Grupo II.....	84
4.2.3 Efeitos da HA sobre as propriedades intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que diminuíram a frequência de disparos de PAs – Grupo III.....	88
4.3. Efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM de animais previamente submetidos à HCl.....	94
4.4. Comparação dos efeitos da HA sobre a frequência intrínseca de disparos de PAs dos neurônios pré-simpáticos dos animais do grupo controle e HCl.....	105
4.5. Caracterização imunohistoquímica dos neurônios pré-simpáticos de animais do grupo controle.....	109
4.5.1 Caracterização imunohistoquímica dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que apresentaram aumento na frequência de disparos de PAs – Grupo I.....	110
4.5.2 Caracterização imunohistoquímica dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que não alteraram a frequência de disparos de PAs após a HA – Grupo II.....	114
4.5.3 Caracterização imunohistoquímica dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que diminuíram a frequência de disparos de PAs após a HA – Grupo III.....	116
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>119</b>
<b>6. SUMÁRIO.....</b>	<b>136</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>138</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>140</b>
<b>9. ANEXO.....</b>	<b>150</b>

## ***1. INTRODUÇÃO***

As alterações na pressão parcial do oxigênio no sangue arterial ( $\text{PaO}_2$ ) são detectadas pelos quimiorreceptores periféricos, localizados nos corpúsculos carotídeos e aórticos (Biscoe & Duchon, 1990; Lahiri *et al.*, 2006). Em situações de redução da  $\text{PaO}_2$  (hipóxia) de ratos não anestesiados e com livre movimentação, os quimiorreceptores periféricos são estimulados, desencadeando respostas autonômicas, respiratórias e comportamentais que incluem bradicardia (parassimpato-excitação), elevação da pressão arterial (PA) (simpato-excitação), aumento da atividade respiratória (taquipnéia) e exploração do ambiente (Franchini & Krieger, 1993; Barros *et al.*, 2002; Braga *et al.*, 2006). Esse conjunto de ajustes tem como objetivo restabelecer e manter em níveis normais a  $\text{PaO}_2$  (Machado 2001; Barros *et al.*, 2002; McGuire *et al.*, 2003).

Quando os quimiorreceptores periféricos são estimulados, os potenciais de ação (PAs) gerados pela despolarização das células do corpúsculo carotídeo se propagam por meio do nervo do seio carotídeo e da via do trato solitário (TS) em direção ao núcleo do trato solitário (NTS), sendo essa a primeira estação sináptica do sistema nervoso central (SNC) a receber as informações dos quimiorreceptores e a responsável por distribuí-las para outras áreas do tronco cerebral envolvidas com o controle autonômico e respiratório (Mifflin, 1992; Chitravanshi *et al.*, 1994; Spyer, 1994; Chitravanshi & Sapru, 1995; Machado 2001).

A geração das respostas autonômicas à ativação do quimiorreflexo envolve a ativação de duas vias anatômicas distintas no NTS: a via parassimpato-excitatória que tem projeções diretas para o núcleo ambíguo, onde estão localizados os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos responsáveis pela resposta de bradicardia; e a via simpato-excitatória que envolve projeções diretas do NTS para neurônios da região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), onde estão localizados os neurônios geradores da

atividade simpática que promovem a resposta pressora (Sun *et al.*, 1988; Urbanski & Sapru, 1988; Granata, 1994; Aicher *et al.*, 1996).

### **1.1. A região denominada “RVLM”**

A região *rostral ventrolateral medula* (região rostral ventral e lateral do bulbo que abreviaremos como RVLM) está localizada na superfície ventral do bulbo, caudal ao núcleo facial, rostral à área postrema, ventral ao núcleo ambíguo e lateral ao núcleo paragigantocelular (Hwang e Dun, 1999) e com aproximada extensão ântero-posterior de 700 µm. A RVLM abriga diferentes grupamentos neuronais responsáveis pelo controle autonômico e respiratório (Aicher *et al.*, 1996; Koshiya & Guyenet, 1996; Smith *et al.*, 2007).

Estudos de Guertzenstein & Silver (1974) mostraram em experimentos realizados em gatos, que a aplicação do neurotransmissor inibitório glicina na RVLM promoveu a queda dos níveis da PA, sugerindo assim que a RVLM é uma área responsável pela manutenção dos níveis da PA. A partir do estudo desses autores que mostraram a RVLM como fonte primária do tônus simpático, a qual abriga neurônios geradores da atividade simpática, estudos posteriores mostraram a existência de populações neuronais distintas, mas que estão co-localizadas na RVLM: *i*) os neurônios pré-simpáticos bulboespinhais, os quais enviam projeções excitatórias para os neurônios pré-ganglionares simpáticos na coluna intermédio-lateral (CIL) da medula espinhal e são considerados os geradores da atividade simpática (Guyenet, 2006) *ii*) os complexos neuronais responsáveis pela geração e controle do padrão respiratório (Feldman & Del Negro, 2006) e *iii*) os neurônios C1 que enviam projeções para áreas hipotalâmicas (Guyenet, 2006). Há evidências de que as projeções do NTS para neurônios localizados na região ventral do bulbo

representem o substrato neuroanatômico das vias funcionais simpato-excitatória e ventilatória do quimiorreflexo, as quais fazem sinapses com neurônios pré-simpáticos ou respiratórios, respectivamente (Guyenet & Koshiya, 1995; Koshiya & Guyenet, 1996; Moraes *et al.*, 2011).

Os neurônios pré-simpáticos e respiratórios localizados na RVLM apresentam características relevantes para o controle e manutenção dos níveis adequados da PA e da geração da atividade simpática, as quais serão descritas na sequência:

### *1.1.1. Os neurônios pré-simpáticos localizados na RVLM*

Os neurônios pré-simpáticos da RVLM são a fonte primária da atividade simpática para os diferentes territórios vasculares e o coração (Feldberg & Guertzenstein, 1972; Sun *et al.*, 1988; Dampney *et al.*, 2003). A modulação dos neurônios pré-simpáticos localizados na RVLM é feita por projeções neurais excitatórias e inibitórias oriundas de diferentes áreas do SNC, as quais influenciam diversos estados fisiológicos e patofisiológicos por meio da liberação de diferentes neurotransmissores e neuromoduladores nos contatos sinápticos com esses neurônios (Guertzenstein & Silver, 1974; Dampney, 1994; Guyenet, 2006; Mueller, 2007).

Com relação às propriedades eletrofisiológicas desses neurônios da RVLM existem controvérsias na literatura. Estudos anteriores realizados por Sun *et al.*, (1988), Kangrga & Loewy (1995) e Guyenet *et al.*, (2006) evidenciaram que neurônios bulbo-espinhais da RVLM apresentavam a capacidade intrínseca de gerar PAs, com características eletrofisiológicas que os classificariam como marca-passo.

Segundo Guyenet (1990), neurônios com atividade intrínseca de marca-passo são caracterizados pela habilidade única de gerar ritmicidade tônica mesmo na ausência de

inputs sinápticos. Os PAs resultam de uma despolarização da membrana celular causada pela abertura e fechamento de canais iônicos específicos. Para um neurônio auto-despolarizante ser caracterizado como marca-passo, ele deve apresentar os seguintes critérios: *i*) cada PA deverá resultar de uma despolarização gradual da membrana celular; *ii*) quando hiperpolarizado pela injeção de corrente negativa de baixa magnitude, os PAs deverão ser cessados devido à mínima alteração na voltagem da membrana, e os potenciais excitatórios pós-sinápticos (EPSPs) não deverão ocorrer; *iii*) a atividade de auto-despolarização deverá ser cessada por breves períodos de hiperpolarização e retomada pela despolarização da membrana; e *iv*) a atividade de auto-despolarização não deverá depender da liberação sináptica de neurotransmissores (Guyenet, 1990).

Estudos eletrofisiológicos realizados por nosso laboratório (Almado *et al.*, 2014) utilizando a técnica de *whole-cell patch-clamp* em fatias do tronco cerebral de ratos jovens adultos, mostraram que os neurônios pré-simpáticos da RVLM que se projetam para a CIL, apresentam um padrão de disparo de PAs com atividade intrínseca de auto-despolarização, típico de neurônios com características de marca-passo. Nosso estudo apresentou um grande avanço na caracterização eletrofisiológica dos neurônios pré-simpáticos que foi retomado após vários anos de contradições presentes na literatura.

Contrariamente à teoria de neurônios com característica auto-despolarizante, experimentos realizados por Oshima *et al.*, (2000) na preparação medula espinhal-tronco cerebral identificaram três tipos de neurônios bulbo-espinhais da RVLM em ratos neonatos, classificados de acordo com o padrão de geração de PAs: a) neurônios auto-despolarizantes – com alta frequência de despolarização de PAs; b) neurônios com despolarização irregular – neurônios dependentes da modulação de inputs sinápticos; e c) neurônios silenciosos – esses neurônios não geravam PAs espontaneamente e se encontravam num potencial de repouso mais negativo.

Entretanto, estudos de Lipski *et al.*, (1996) utilizando registros intracelulares *in vivo* feitos por impalamento de eletrodos de alta impedância e estudos de *whole-cell patch-clamp* em neurônios do RVLM agudamente isolados (Lipski *et al.*, 1998) sugeriram que a atividade intrínseca dos neurônios bulboespinhais do RVLM seria resultante da ação de uma rede neuronal, dependente do balanço das projeções inibitórias e excitatórias tônicas sobre esses neurônios, oriundas de outras regiões do SNC, e, portanto, não se caracterizariam como marca-passo. (Lipski *et al.*, 1996) e sugeriram que a atividade dos neurônios bulbo-espinhais do RVLM é resultante da ação de uma rede neuronal, ou seja, é dependente do balanço das influências inibitórias e excitatórias tônicas sobre esses neurônios, oriundas de outras regiões encefálicas. Além disso, estudos de Kangrga & Loewy (1995) sugeriram a existência de uma população heterogênea de neurônios pré-simpáticos na região RVLM em fatias do tronco cerebral de ratos jovens (P7-P12).

É importante ressaltarmos que os diferentes resultados obtidos por estes estudos provêm de abordagens experimentais distintas utilizadas por cada um desses pesquisadores, tendo em vista que a maioria desses estudos foi realizada em fatias do tronco cerebral de ratos neonatos ou com idade na qual a maturação neuronal ainda não estava completa.

Em relação à modulação sináptica sobre a atividade de auto-despolarização dos neurônios pré-simpáticos bulboespinhais, estudos mostraram que o bloqueio sináptico ionotrópico (excitatório e inibitório) foi capaz de reduzir a frequência de disparos espontâneos de PAs, mas não foi capaz de abolí-los (Sun *et al.*, 1988; Moraes *et al.*, 2013; Almado *et al.*, 2014), mostrando assim uma prevalência da modulação sináptica excitatória sobre esses neurônios. Essa propriedade intrínseca de auto-despolarização dos neurônios pré-simpáticos da RVLM teria como base a existência de uma corrente persistente de entrada de sódio ( $I_{NaP}$ ) nesses neurônios (Sun, 1995; Moraes *et al.*, 2013).



A característica de auto-despolarização desses neurônios seria responsável pela adequada manutenção da atividade simpática tônica basal para todo o sistema cardiovascular. Além dos neurônios pré-simpáticos da RVLM, neurônios de outras áreas como o NTS, área A5, núcleo paraventricular do hipotálamo enviam projeções sinápticas para os neurônios pré-ganglionares simpáticos, localizados na coluna intermediolateral da medula espinhal (CIL), os quais inervam os vasos de resistência (Guyenet, 2006).

A respeito da modulação sináptica sobre a atividade dos neurônios pré-simpáticos, estudo de Moraes *et al.*, (2013), utilizando a abordagem experimental preparação coração-tronco cerebral isolados na qual o tronco cerebral permanece intacto, caracterizou 4 subpopulações de neurônios pre-simpáticos localizados na RVLM em relação à rede respiratória: *i*) grupo I – neurônios adrenérgicos e sem modulação pela rede respiratória; *ii*) grupo II – neurônios adrenérgicos com modulação inspiratória; *iii*) grupo III – neurônios não-adrenérgicos com modulação pós-inspiratória e *iv*) grupo IV – neurônios não-adrenérgicos com inibição durante a fase inspiratória.

Além das características funcionais, os neurônios pré-simpáticos da RVLM podem ser distinguidos em subgrupos por seu conteúdo neuroquímico, expressão de receptores, e / ou atributos funcionais (Burke *et al.*, 2011) e todas essas características estruturais que distinguem esses neurônios são chamadas de fenótipos. Como descrito na literatura, a RVLM abriga 2 grupos de neurônios pré-simpáticos: *i*) o grupamento C1 adrenérgico, no qual os neurônios possuem em sua constituição a tirosina hidroxilase (TH) a qual é uma enzima integrante da via metabólica de produção de catecolaminas (Stornetta *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2001; Stornetta *et al.*, 2002; Guyenet *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2013) e *ii*) o grupamento não-adrenérgico que corresponde aos demais neurônios que não apresentam a TH, mas que sintetizam e liberam o aminoácido excitatório L-glutamato nas suas terminações sinápticas (Sun *et al.*, 1988; Ruggiero *et al.*,

1994; Lipski *et al.*, 1995; Schreihofner & Guyenet, 1997; Stornetta *et al.*, 2002; Guyenet *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2013). Os neurônios do grupamento C1 adrenérgicos correspondem a cerca de 70% da população de neurônios desta área (Ruggiero *et al.*, 1994; Stornetta *et al.*, 2002).

### *1.1.2. Os neurônios respiratórios localizados na RVLM*

O ritmo e o padrão respiratório são gerados por uma rede neuronal localizada no bulbo que contempla diversos complexos neuronais conhecidos coletivamente como coluna respiratória ventral (CRV). Esse grande grupamento de neurônios corresponde a uma coluna bilateral e longitudinal de neurônios na região ventrolateral do bulbo que se estende da medula espinhal cervical (nível C1) até o limite caudal do núcleo do nervo facial (Bianchi *et al.*, 1995). Essa coluna pode ser dividida em quatro grupamentos celulares distintos distribuídos longitudinalmente de caudal para rostral, segundo as características funcionais dos neurônios que os compõem: porção caudal do grupo respiratório ventral (cVRG), porção rostral do grupo respiratório ventral (rVRG), complexo pré-Botzinger (pré-BötC) e complexo Botzinger (BötC) (Smith *et al.*, 1991; Bianchi *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2007). Os neurônios que constituem os complexos Botzinger e pré-Botzinger estão localizados na região da RVLM, adjacentes aos neurônios pré-simpáticos (Dobbins & Feldman, 1994; Monnier *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007).

O complexo pré-Bötzinger é considerado o gerador central do ritmo respiratório sendo responsável pela gênese da atividade inspiratória (Smith *et al.*, 1991) e composto por interneurônios glutamatérgicos que enviam projeções para os complexos vizinhos,

mas não para a medula espinhal (Stornetta *et al.*, 2003). O complexo BötC, considerado a principal fonte de atividade expiratória da rede neuronal respiratória, é composto predominantemente de neurônios expiratórios que enviam projeções para os demais complexos da CRV modulando de forma inibitória a atividade dos seus neurônios (Fedorko *et al.*, 1989; Bianchi *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1991, Smith *et al.*, 2007), bem como para os motoneurônios inspiratórios espinhais, inclusive aqueles do núcleo do frênico, inibindo-os durante a fase expiratória do ciclo respiratório (Fedorko & Merrill, 1984; Miller & Nonaka, 1990).

## **1.2. A hipóxia**

A hipóxia sistêmica é uma situação crítica que coloca em risco todo o metabolismo celular e a vida. A exposição a baixos níveis de O<sub>2</sub> desencadeia respostas neuronais importantes com o objetivo de restaurar a PaO<sub>2</sub>. Como o cérebro tem reservas limitadas de oxigênio e limitações na utilização de processos anaeróbicos, os neurônios em geral respondem à hipóxia diminuindo seu metabolismo. O maior custo metabólico para um neurônio é a manutenção dos gradientes iônicos através das suas membranas celulares, o qual está relacionado ao nível de atividade neural e a necessidade de gerar energia em forma de trifosfato de adenosina (ATP) (Neubauer & Sunderram, 2004). No entanto, há neurônios que coordenam funções necessárias para a sobrevivência de todo o organismo, sendo essas populações neuronais importantes para adaptações em resposta à hipóxia a curto e em longo prazo (Bickler *et al.*, 2002; Neubauer & Sunderram, 2004). Esses neurônios indispensáveis para os ajustes neurovegetativos para a manutenção da

vida nas mais diferentes situações de desafio encontram-se na região da RVLM, como descrito anteriormente.

### **1.2.1. A hipóxia tecidual aguda (HA) e os neurônios pré-simpáticos da RVLM**

Além das funções desempenhadas pelos neurônios pré-simpáticos da RVLM no controle cardiovascular, sabe-se que esta área integra as respostas respiratórias à hipóxia provenientes da estimulação dos quimiorreceptores periféricos, resultando em ajustes cardiorrespiratórios como o aumento das respostas simpato-excitatórias e respiratórias do quimiorreflexo e aumento da pressão arterial média (PAM) (Sun & Reis, 1995; Braga *et al.*, 2006; Zoccal *et al.*, 2008; Zoccal *et al.*, 2010). Além disso, em situações de desafio hipóxico tecidual, os neurônios pré-simpáticos apresentam aumento na sensibilidade, a qual pode resultar no aumento da frequência de disparos de PAs (Neubauer *et al.*, 1990; Wasicko *et al.*, 1990; Sun & Reis, 1995). Especificamente em relação à excitabilidade desses neurônios em situações de hipóxia tecidual aguda, Kawai *et al.*, (1999) mostraram em neurônios isolados da RVLM de ratos jovens (P13-P19) que as variações na concentração de O<sub>2</sub> pode ser percebida pelos neurônios localizados nesta área. Nesta mesma direção, Mazza *et al.*, (2000) mostraram que os efeitos da hipóxia aguda citotóxica, induzida pelo cianeto de sódio (NaCN), em cultura de neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos neonatos promoveram um aumento da excitabilidade desses neurônios, com consequente aumento na frequência dos PAs.

A breve exposição (20 – 40 s) à hipóxia (N<sub>2</sub> ou NaCN) aumenta reversivelmente a frequência de disparo dos neurônios bulboespinhais do RVLM, no entanto os mecanismos responsáveis por este aumento são desconhecidos (Sun & Reis, 1994). Em

recente estudo de Boychuk *et al.*, (2012) utilizando fatias do tronco cerebral de ratos com até 9 dias de vida, relataram a existência de duas populações de neurônios pré-simpáticos da RVLM em relação à frequência de disparos de PAs: neurônios de baixa e alta frequência de disparo. Quando a fatia foi exposta por 10 minutos à hipóxia / hipercapnia aguda (85% N<sub>2</sub> + 6% O<sub>2</sub> + 9% CO<sub>2</sub>), a frequência de disparo de PAs dos neurônios de baixa frequência foi aumentada, enquanto que nos neurônios com alta frequência de disparo a exposição ao desafio foi diminuída, independentemente da influencia sináptica.

Estudos de Zhang *et al.*, (2012) mostraram que a sinalização purinérgica mediada por ATP ao nível do RVLM desempenha um papel importante na resposta ventilatória induzida pela hipóxia aguda. Estes autores observaram que a microinjeção de ATP no RVLM aumenta tanto a amplitude quanto a frequência de disparos do nervo frênico durante hipóxia enquanto que a microinjeção de PPADS (antagonista de receptores P2) atenuou significativamente as respostas respiratórias evocadas pela hipóxia, além de revelarem que a expressão dos receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub> está aumentada nos neurônios da RVLM após a hipóxia.

Em relação aos efeitos diretos da hipóxia tecidual aguda (HA) sobre a neurotransmissão, muitos estudos tem sido realizados em diferentes áreas cerebrais, como nos estudos eletrofisiológicos realizados no hipocampo que demonstraram que a HA determina uma pronunciada depressão da transmissão sináptica excitatória (Hershkowitz *et al.*, 1993; Dale *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2007). Entre os efeitos da HA, pode-se sugerir que a mesma seja um modulador crítico da função celular e que muitos dos efeitos da privação de O<sub>2</sub> podem ser atribuídos à mudanças na atividade e/ou expressão dos canais iônicos. No entanto, não há relatos dos efeitos da HA sobre a frequência intrínseca de disparo de PAs em neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos jovens adultos (P35).

### 1.2.2. A hipóxia crônica intermitente (HCI) e os neurônios pré-simpáticos da RVLM

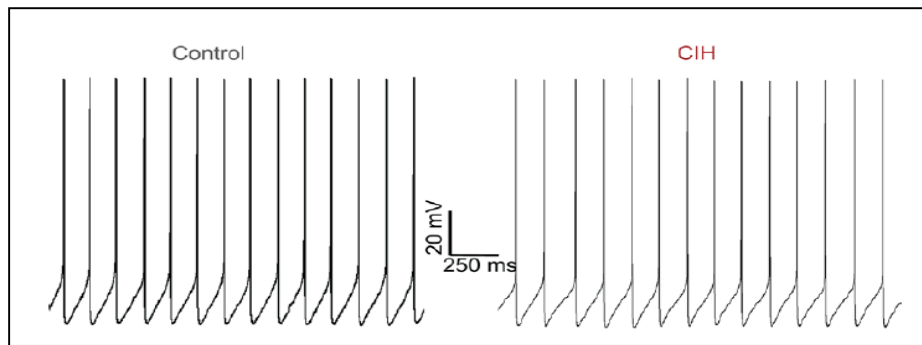
O pré-condicionamento hipóxico consiste na exposição de organismos, tecidos ou células a repetidos episódios de hipóxia ou isquemia moderada, a qual é capaz de desencadear uma série de mecanismos adaptativos endógenos, os quais podem resultar numa maior tolerância quando expostos a um novo desafio hipóxico (Neubauer, 2001; Jones & Bergeron, 2001; Gidday, 2006). Há evidências experimentais de que esse possível efeito protetor do pré-condicionamento hipóxico estimula a expressão de diversos genes, muitos deles envolvidos nos processos de angiogênese, vasodilatação, eritropoiese, transporte de glicose e espécies reativas de oxigênio (Semenza, 2000; Jones & Bergeron, 2001).

Um dos modelos experimentais de pré-condicionamento utilizado é a hipóxia crônica intermitente (HCI), a qual consiste na exposição dos animais a sucessivos episódios de hipóxia por horas ao longo de vários dias, promovendo a cada episódio a ativação dos quimiorreceptores periféricos e das suas vias neurais aferentes. A estimulação repetida dos quimiorreceptores periféricos que ocorre na HCI é também observada em situações fisiopatológicas como na apnéia obstrutiva do sono (AOS) em humanos (Somers *et al.*, 1995; Caples *et al.*, 2005). A exposição por longo prazo a episódios de HCI, como ocorre em pacientes com AOS, promove um aumento mantido da atividade simpática, aumentando o risco de complicações cardiovasculares, como a hipertensão arterial (Fletcher *et al.*, 1992; Narkiewicz *et al.*, 1998; Fletcher, 2001; Caples *et al.*, 2005; Dempsey *et al.*, 2010).

Estudos mostram que animais submetidos à HCI apresentam um aumento gradativo da ventilação basal, denominado de aclimatização ventilatória à hipóxia (Powel

*et al.*, 1998), o qual pode ser induzido tanto por alterações das respostas autonômicas e ventilatórias à ativação do quimiorreflexo (McGuire *et al.*, 2003; Braga *et al.*, 2006) quanto por alterações na atividade de neurônios respiratórios envolvidos com a geração do padrão respiratório (Zhang *et al.*, 2008). Além disso, evidências experimentais mostraram que ratos submetidos à HCI apresentam aumento da PAM (Fletcher, 2001; Prabhakar *et al.*, 2005; Zoccal *et al.*, 2007; Zoccal *et al.*, 2008) e alterações das respostas autonômicas e ventilatórias à ativação do quimiorreflexo (McGuire *et al.*, 2003; Braga *et al.*, 2006). O aumento observado na atividade simpática após HCI está provavelmente associado com alterações em importantes áreas do SNC, especialmente naquelas relacionadas à geração e/ou modulação da atividade simpática (Fletcher, 2001; Sica *et al.*, 2000; Prabhakar *et al.*, 2005; Zoccal *et al.*, 2008). Essas alterações observadas em resposta à HCI seriam decorrentes de alterações funcionais no padrão de acoplamento neural entre as atividades simpáticas e respiratórias (Zoccal *et al.*, 2007; Zoccal *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2013). O acoplamento simpático-respiratório em condições fisiológicas ocorre devido à modulação dos neurônios inspiratórios e pré-inspiratórios sobre os neurônios pré-simpáticos da RVLM (Zoccal *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2013).

Estudos realizados em nosso laboratório por Almadeo (tese de doutoramento, 2012), utilizando registro eletrofisiológico em *whole-cell patch-clamp* de neurônios pré-simpáticos bulboespinais em fatias do tronco cerebral de ratos jovens adultos (P35) mostraram que a prévia exposição dos animais a um protocolo de 10 dias de HCI não alterou a frequência intrínseca de disparos, como ilustrado na figura 1.



**Figura 1:** Traçado representativo de um neurônio pré-simpático do RVLM realizado na presença de bloqueadores sinápticos evidenciando o padrão auto-despolarizante de disparo de PAs, sendo à esquerda um neurônio representativo de ratos do grupo controle (Control) e à direita um neurônio representativo de ratos do grupo HCI (CIH) (Almado *et al.*, 2014).

Resultados semelhantes foram descritos no estudo de Moraes *et al.*, (2013), utilizando a preparação coração-tronco cerebral isolados em ratos jovens, o qual mostrou que a atividade intrínseca de auto-despolarização dos neurônios pré-simpáticos na RVLM não foi afetada pela prévia exposição à HCI.

As evidências indicam que o aumento da atividade simpática observada nos animais previamente submetidos à HCI independe de alterações nas propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM (Moraes *et al.*, 2013; Almado *et al.*, 2014). Dessa forma, nos deparamos com as seguintes questões: 1) os neurônios pré-simpáticos da RVLM de animais previamente submetidos a HCI, ao serem submetidos a um novo episódio de hipóxia tecidual aguda apresentariam alterações nas suas propriedades eletrofisiológicas? 2) Em caso afirmativo, haveria algum efeito protetor nesses neurônios quando expostos a uma nova situação de hipóxia tecidual aguda?



As nossas hipóteses de trabalho foram as seguintes: *i)* o aumento da atividade simpática observada em resposta à HA é devido ao aumento da frequência intrínseca de disparo dos neurônios pré-simpáticos da RVLM e *ii)* os neurônios geradores da atividade simpática do RVLM de ratos previamente submetidos à HCI são menos susceptíveis a um novo episódio de HA do que os neurônios de ratos controle.

## ***2. OBJETIVOS***

Para testar as hipóteses apresentadas, o presente estudo teve como seu principal objetivo avaliar se a hipóxia tecidual aguda altera as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas de neurônios pré-simpáticos bulboespinais da RVLM de ratos jovens submetidos à HCI e controle. Desse modo, os objetivos específicos do presente estudo foram:

- 1) Avaliar os efeitos da HA sobre as propriedades intrínsecas passivas e ativas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos controle;
- 2) Investigar os efeitos do pré-condicionamento pela exposição prévia à HCI sobre os efeitos da HA nas propriedades intrínsecas passivas de membrana dos neurônios pré-simpáticos da RVLM em ratos jovens adultos;
- 3) Correlacionar o perfil eletrofisiológico dos neurônios pré-simpáticos da RVLM com as respostas à HA em neurônios de ratos do grupo controle e HCI.

### ***3. MATERIAL E MÉTODOS***

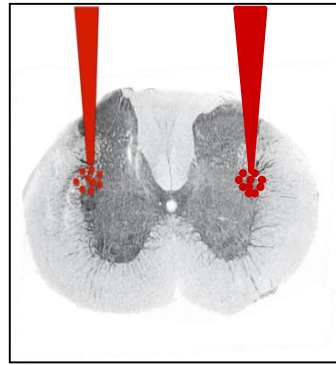
### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos (19-21 dias), provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Esses animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: i) Grupo Controle: no qual os animais foram mantidos em condições de normóxia e ii) Grupo HCI: conjunto de animais submetidos ao protocolo de hipóxia crônica intermitente, conforme descrição apresentada no item 3.3. Todos os procedimentos experimentais utilizados para o desenvolvimento desta tese foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (Processo nº 134/2011).

### **3.2. Marcação dos neurônios pré-simpáticos da RVLM pela microinjeção bilateral de neurotraçador fluorescente na coluna intermediolateral (CIL) da medula espinhal**

Para a identificação dos neurônios bulboespinhais pré-simpáticos na RVLM realizamos a cirurgia para a microinjeção do neurotraçador fluorescente retrógrado na medula espinhal previamente à exposição dos animais aos protocolos de HCI ou normóxia. Inicialmente os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (75 mg/Kg) e xilazina (5 mg/Kg) por meio de injeção intraperitoneal e após a realização da tricotomia na região torácica os mesmos foram posicionados num aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA, EUA) em decúbito ventral. Em seguida realizamos a laminectomia das vértebras torácicas de T3 à T6 para termos acesso à medula espinhal subjacente e utilizando uma micropipeta de vidro realizamos microinjeções bilaterais do

neurotraçador fluorescente retrógrado *rhodamine red retrobeads* (100 nL/microinjeção; LumaFluor Inc., Naples, FL, EUA) na CIL em três segmentos distintos, totalizando 6 microinjeções por animal (Figura 2).



**Figura 2:** Fotomicrografia representativa do segmento torácico T4 da medula espinhal de rato corado para acetilcolinesterase (Paxinos & Watson, 1998) ilustrando um sítio da microinjeção do neurotraçador fluorescente rhodamina (círculos vermelhos) na CIL da medula espinhal, com a finalidade de se realizar a marcação retrógrada dos neurônios pré-simpáticos bulbo-espinhais da RVLM. Os cones verticais ilustram as pipetas de microinjeção contendo o neurotraçador (vermelho) as quais foram introduzidas no sentido dorso-ventral em direção à CIL.

Como medida profilática, após o término da cirurgia os animais receberam dose única do antibiótico (pentabiótico veterinário, 1.200.000 UI/3 mL - Fontoura-Wyeth, Brasil) e do analgésico e anti-inflamatório flunixinina meglumina (Banamine; Schering-Plough, Cotia, SP, Brasil), conforme descrito por Almado *et al.*, (2014). Os animais foram acondicionados em caixas individuais para a recuperação pós-cirúrgica, contendo água e ração fornecidas *ad libitum*, até o momento de serem submetidos aos protocolos de normóxia ou HCI escolhidos aleatoriamente.

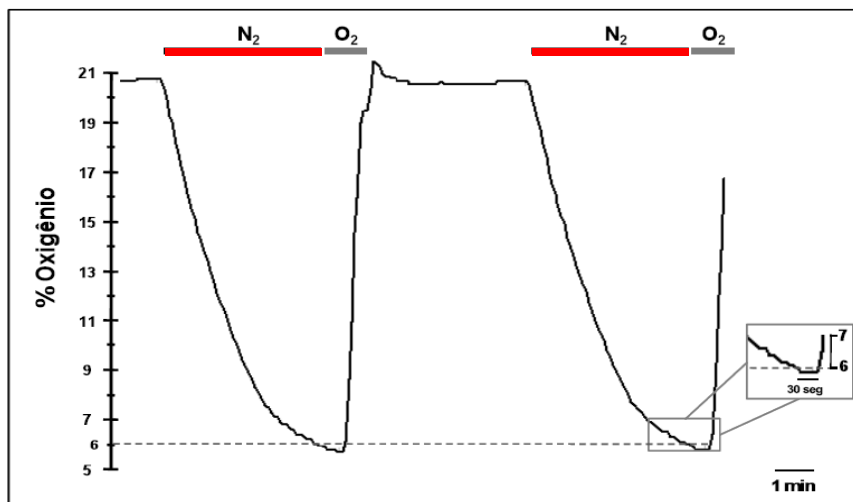
### 3.3. Hipóxia Crônica Intermitente

Os animais do grupo controle e HCI foram acondicionados em caixas coletivas de polipropileno (dimensões: 41x34x 16 cm), perfazendo um máximo de 10 animais por caixa com ração e água *ad libitum*, mantidos em câmaras acrílicas (78 x 52 x 52 cm, volume ~210 L) e equipadas com injetores de gases e sensores de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, temperatura e umidade.

O grupo HCI foi exposto aos episódios de hipóxia intermitente, os quais consistiam num período de 4 min de injeção de nitrogênio (N<sub>2</sub>) a fim de se reduzir a fração inspirada de O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub>) de 20,8% para 6%, permanecendo neste nível por 30-40 segundos. Em seguida, o O<sub>2</sub> era injetado dentro da câmara para retornar a FiO<sub>2</sub> para 20,8%, nível em que permanecia por 5 minutos antes de novo episódio de hipóxia. Desta forma, os ratos do grupo HCI foram submetidos a uma FiO<sub>2</sub> de 6% por 30-40 segundos a cada 9 minutos, como descrito por Zoccal *et al.*, (2008) e ilustrado na figura 3. Este protocolo de HCI foi repetido 8 horas por dia (das 08h30 às 16h30) durante 10 dias consecutivos. Nas 16 horas remanescentes (das 16h30 às 08h30), os animais foram mantidos em condições de normóxia. A injeção de N<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (White Martins, Sertãozinho/SP, Brasil) dentro das câmaras foi regulada por um conjunto de válvulas solenoides (Oxycycler, Modelo A84XOV, Biospherix, Redfield, EUA), as quais eram automaticamente operadas por um software apropriado (AnaWin 2, versão 2.4.17).

Na mesma sala na qual se encontravam as câmaras dos ratos HCI, os ratos do grupo controle foram mantidos em câmaras similares, porém em condições de normóxia, 24 h por dia, durante 10 dias. De modo semelhante ao grupo HCI, os ratos do grupo controle foram também expostos aos ruídos de injeção de gases dentro da câmara devido

à frequente injeção de  $N_2$  e  $O_2$  para manter a  $FiO_2$  em 20,8%. Em ambas as câmaras de ratos controle e HCI, a injeção de gases ocorreu na parte superior das câmaras para evitar jatos de ar diretamente sobre os animais, os quais poderiam causar desconforto aos mesmos.



**Figura 3.** Representação das variações da fração inspirada de oxigênio (% Oxigênio) na câmara HCI durante 2 episódios de hipóxia. As barras acima dos traçados indicam o período de injeção de  $N_2$  (barras vermelhas) e  $O_2$  (barras cinzas) dentro da câmara. Durante o período não correspondente às barras, pequenas frações de  $N_2$  e  $O_2$  eram injetadas para manter a concentração fracional de oxigênio próximo a 20,8%. O valor mínimo da fração inspirada de oxigênio (pico do estímulo hipóxico) foi de 6%, o qual foi mantido durante 30 a 40 segundos, conforme ilustra o painel direito da figura.

### 3.4. Registros eletrofisiológicos com a técnica de *whole-cell patch-clamp*

#### 3.4.1 Preparação das fatias do tronco cerebral

Ao término dos 10 dias do protocolo de HCI ou normóxia, os animais (P 35) foram profundamente anestesiados com halotano (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos



LTDA, Itapira, São Paulo, Brasil) e submetidos à perfusão transcardíaca com 50-60 mL de uma solução gelada ( $\sim 0^\circ \text{C}$ ) de fluido cérebro-espinhal artificial (aCSF) modificado (gaCSF) (Almado *et al.*, 2014), previamente borbulhada com mistura carbogênica (95 %  $\text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$ ), contendo (em mM): 250 glicerol; 2,5 KGlu; 4  $\text{MgCl}_2$ ; 1,25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 25  $\text{NaHCO}_3$ ; 25 glicose; 0,2  $\text{CaCl}_2$ ; 0,4 ácido ascórbico; realizada com velocidade aproximada de 15 mL/min. Esta solução foi mantida em temperatura baixa a fim de diminuir o metabolismo celular e preservar o maior número possível de neurônios viáveis para os registros eletrofisiológicos.

Ao término da perfusão, os animais foram decaptados com guilhotina, o tronco cerebral foi cuidadosamente exposto, removido e imerso na solução de gaCSF continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$ ) para oxigenação e manutenção do pH em 7.4, a fim de causar o menor dano possível ao tecido. A meninge foi delicadamente removida e o tronco cerebral foi fixado em uma placa metálica, tendo sua face dorsal apoiada em um bloco de ágar e submerso na solução de gaCSF. A seguir o conjunto tronco cerebral/bloco de ágar foi posicionado no vibrátomo (VT1200S – Leica, Nusslock, Alemanha), o qual teve sua lâmina para corte previamente calibrada. Na sequência foram obtidas fatias coronais de 200  $\mu\text{m}$  de espessura, na velocidade de 0,1mm/seg. A partir de cada um dos troncos cerebrais isolados, foi possível retirar de 3 à 4 fatias contendo segmentos antero-posteriores do RVLm. As fatias foram incubadas em uma solução contendo 50% de aCSF e 50% de gaCSF a  $31^\circ\text{C}$  durante 30 minutos e após esse período permaneceram em temperatura ambiente e constantemente borbulhadas com mistura carbogênica até o momento em que eram transferidas para uma câmara de registro. Para a realização dos experimentos, as fatias foram cuidadosamente transferidas para uma câmara de registro continuamente perfundida com aCSF contendo (mM): 125 NaCl; 2,5 KCl; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 1,25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 25  $\text{NaHCO}_3$ ; 25 glicose, 0,4 ácido

ascórbico e 2 CaCl<sub>2</sub>; borbulhada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) a um fluxo constante de 2-3 mL/min. Os registros foram realizados a temperatura de 31°C, mantida por meio de um controlador de temperatura de dois canais (TC-344B, Warner Instruments, Hamden, Connecticut, EUA).

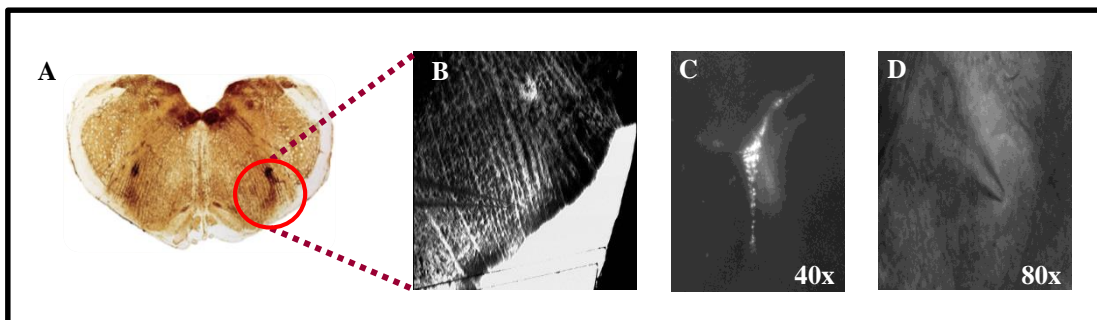
### *3.4.2. Identificação da região da RVLM*

As fatias foram transferidas para a câmara de registro e imobilizadas por meio de uma rede de fios de nylon montada sobre uma armação de platina de forma que a disposição dos fios não tocasse a região de interesse. Os neurônios foram visualizados por intermédio de um microscópio equipado com óptica de iluminação oblíqua (BX-51WI, Olympus, Tóquio, Japão) que se encontrava acoplado a uma câmera (C7500-50, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japão), a qual estava conectada a um monitor de vídeo.

A identificação da região RVLM nas fatias do tronco cerebral foi feita por meio de uma objetiva com aumento de 5 vezes, tendo como referência a formação compacta do núcleo ambíguo e o complexo olivar inferior (Saywell & Feldman, 2004). De acordo com estudos de Hwang & Dun (1999) a região RVLM pode ser reconhecida na fatia coronal do tronco cerebral como uma área mais escura com localização ventral ao núcleo ambíguo e lateral ao núcleo paragigantocelular, num plano rostral à área postrema, como demonstrado nos painéis A e B da figura 4.

### 3.4.3. Visualização dos neurônios pré-simpáticos da RVLM

Uma vez localizada a região RVLM, utilizamos uma objetiva com aumento de 40 x para visualizar os neurônios e identificar aqueles que estivessem viáveis (painel D, figura 4). Os neurônios pré-simpáticos da RVLM marcados retrogradamente foram visualizados (painel C, figura 4) por meio de um sistema de fluorescência, composto com lâmpada de mercúrio e um conjunto de filtros para fluorescência (excitação: 510-550 nm, emissão: 590 nm; U-MWG-2, Olympus, Tóquio, Japão), que se encontra acoplado ao microscópio. Os neurônios viáveis e que apresentavam marcação positiva foram selecionados para o registro eletrofisiológico.



**Figura 4. Painel A:** Fotomicrografia representativa de uma fatia do tronco cerebral contendo a área RVLM (Paxinos & Watson, 1998) e a área de interesse ampliada representada no **Painel B:** Fatia do tronco cerebral na câmara de registro na qual se pode identificar o núcleo ambíguo (ponto esbranquiçado) e ventralmente a ele se encontra a região do RVLM. Uma pipeta de registro está sobre a RVLM indicando um neurônio registrado. **Painel C:** Neurônio pré-simpático do RVLM marcado retrogradamente pelas microesferas recobertas com rodamina fluorescendo à estimulação com luz verde. **Painel D:** O mesmo neurônio da figura anterior visualizado por meio do sistema de iluminação oblíqua com magnificação de 2x e a pipeta de registro posicionada sobre o neurônio.

#### 3.4.4. Whole-cell patch-clamp

Para a realização dos registros eletrofisiológicos foram utilizadas micropipetas de capilares de vidro de borosilicato (Sutter Instruments, EUA) confeccionados em um estirador de capilares de vidro (horizontal; P-97 puller, Sutter Instruments, EUA), com pontas de 2-3 $\mu$ m de diâmetro. As pipetas foram preenchidas com solução contendo (mM): 130 gluconato de potássio; 20 KCl; 2 Mg-ATP; 0,3 Na-GTP; 5 ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-*N,N,N,N'*- tetraacetic acid (EGTA); 10 *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulphonic acid (HEPES); 10 fosfocreatina dissódica; pH 7,3 ajustado com KOH, com osmolalidade final entre 310 e 320 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O. A resistência final das pipetas quando preenchidas com essa solução ficou entre 4 e 7 M $\Omega$ , sendo esta considerada uma resistência ideal para a realização do experimento.

A pipeta, uma vez preenchida com a solução, foi fixada ao *probe* montado em um micromanipulador e conectado a um amplificador. Os sinais foram adquiridos utilizando-se o amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA) conectado a um computador via a interface analógico/digital-digital/analógico (AD-DA) DIGIDATA 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA). O software pClamp 10 (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA) foi utilizado para a aquisição e análise de dados, os quais foram filtrados a 2 kHz (filtro passa baixo Bessel 8-pole) e adquiridos a 10 kHz (filtro passa baixo Bessel 8-pole). A resistência em série (RS) foi verificada periodicamente ao longo dos experimentos e consideramos aceitáveis registros neuronais cuja RS era menor do que 30 M $\Omega$ .

Enquanto a pipeta de registro era aproximada do neurônio de interesse, aplicava-se uma pressão positiva constante para se remover possíveis resíduos de tecido que pudessem impedir o contato entre a pipeta e o corpo celular. Ao contato da ponta da pipeta

com a membrana do neurônio, a pressão positiva era subitamente interrompida e logo após se aplicava discreta pressão subatmosférica para o estabelecimento da configuração *cell-attached*. Após o estabelecimento desta configuração, nova aplicação de pressão subatmosférica era realizada a fim de se romper a membrana na área delimitada pelo selo de alta resistência e ter acesso elétrico ao compartimento intracelular na chamada configuração *whole-cell*, a qual se caracteriza pelo aparecimento das correntes capacitivas da membrana. Os neurônios foram mantidos em um potencial de *holding* de -70 mV e todos os registros foram realizados somente após um período de estabilização de 5 minutos depois da obtenção da configuração *whole-cell*, necessários para a diálise entre a solução interna da pipeta e o meio interno da célula (Push & Neher, 1988).

#### 3.4.5. Protocolos experimentais

Para o melhor entendimento do delineamento experimental é importante elucidarmos inicialmente as sequências das condições experimentais utilizadas durante os registros eletrofisiológicos dos neurônios pré-simpáticos. A sequência das condições experimentais e o tempo de perfusão de cada uma dessas etapas do protocolo experimental estão representados na figura 5.

##### 3.4.5.1. Protocolo de bloqueio sináptico (BS)

Inicialmente, após o estabelecimento da configuração *whole-cell* e decorrido o tempo necessário para diálise como descrito anteriormente, as fatias foram perfundidas com aCSF borbulhado com mistura carbogênica padrão (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) a um

fluxo constante de 2 à 3 mL/min e registradas em condições basais durante 5 minutos (controle). Com o intuito de avaliarmos as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios registrados, fez-se necessário o bloqueio dos neurotransmissores excitatórios e inibitórios. Para isso, uma segunda via de perfusão das fatias continha a solução de aCSF acrescida dos antagonistas da neurotransmissão sináptica ionotrópica [picrotoxina (100  $\mu$ M), AP-5 (40  $\mu$ M), DNQX (10  $\mu$ M) e estriquinina (1  $\mu$ M)] e igualmente borbulhada com mistura carbogênica padrão (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>). As fatias foram perfundidas com esta solução durante 5 minutos e os registros eletrofisiológicos realizados em *voltage-clamp* asseguravam a efetividade do bloqueio sináptico (BS) completo pela ausência do registro de correntes inibitórias e excitatórias.

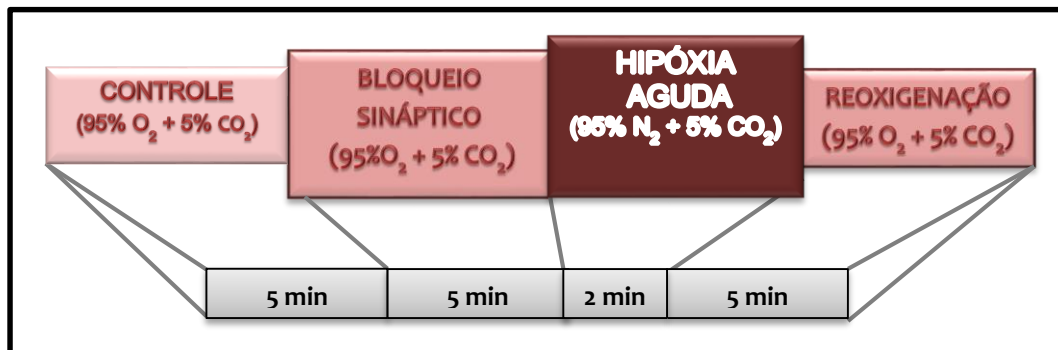
#### 3.4.5.2. Protocolo de hipóxia aguda (HA)

Decorrido o tempo necessário para o completo bloqueio da neurotransmissão sináptica, avaliamos os efeitos da redução drástica dos níveis de O<sub>2</sub> no tecido sobre as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos (protocolo HA). Uma terceira via de perfusão continha a solução de aCSF com os bloqueadores sinápticos descritos anteriormente, porém esta solução foi borbulhada com mistura anóxica (95% de N<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) abolindo o O<sub>2</sub> nesta solução. Os registros eletrofisiológicos foram realizados durante a perfusão das fatias com esta solução por 2 minutos e, decorrido este período, as fatias foram reoxigenadas durante 5 minutos com solução de aCSF oxigenada (borbulhada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>).

Devido ao fato de não dispormos de um sensor que pudesse nos certificar dos níveis exatos de O<sub>2</sub> tecidual, não podemos assegurar que o desafio da HA era uma anóxia,

pois acreditamos que durante o desafio da HA havia estoques de  $O_2$  remanescentes na fatia e provenientes do ar atmosférico que circundavam a câmara de registro e que não foram completamente abolidos.

Cabe salientar que a importância de reoxigenarmos as fatias após o desafio HA foi decorrente da necessidade de verificarmos a viabilidade dos neurônios registrados. Não objetivamos com o protocolo de reoxigenação avaliar os efeitos da mesma sobre as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios pré-simpáticos registrados. Dessa forma, foi possível mostrar que os efeitos observados nas propriedades eletrofisiológicas dos neurônios registrados eram decorrentes da HA e não de uma possível morte neuronal. Os neurônios que não resistiram ao estímulo hipóxico ou que apresentaram uma corrente de vazamento maior que -100 pA foram descartados da análise.

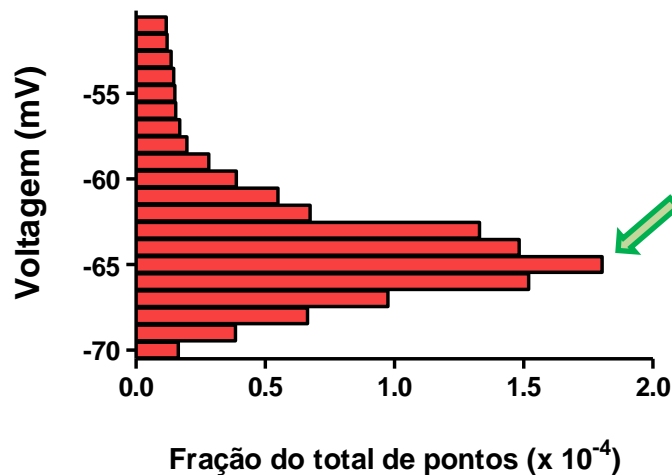


**Figura 5:** Representação esquemática das condições experimentais dos registros eletrofisiológicos dos neurônios pré-simpáticos da RVLM e o tempo de duração da perfusão das fatias.

### 3.4.6. Análise das propriedades eletrofisiológicas intrínsecas da membrana dos neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos jovens submetidos à HCI e controle

#### 3.4.6.1. Análise das propriedades eletrofisiológicas passivas

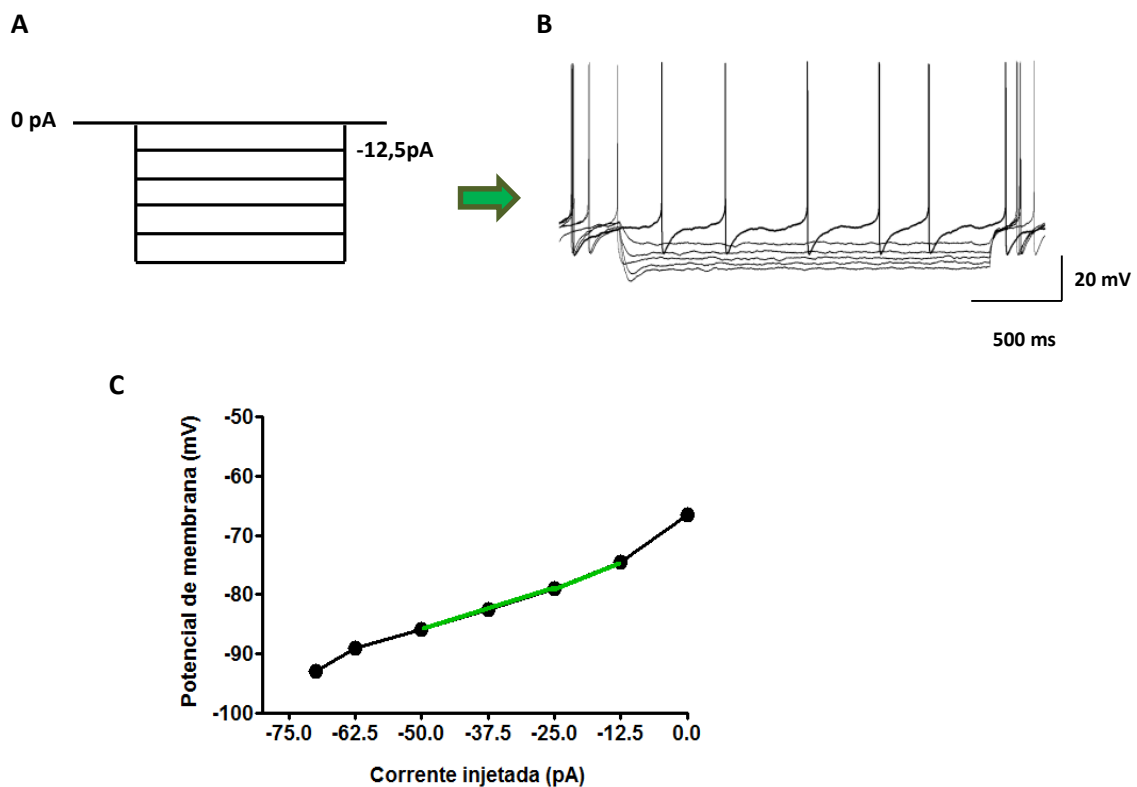
Este protocolo teve por objetivo avaliar se as propriedades passivas intrínsecas da membrana dos neurônios pré-motores simpáticos seriam ou não afetadas pela exposição à HA. Na condição experimental de BS, realizamos o registro eletrofisiológico no modo *current-clamp* do potencial de membrana (RMP) sem que houvesse a injeção de corrente e a partir desse registro construímos um histograma relacionando o número de pontos registrados por voltagem da membrana, o qual nos mostra as seguintes informações: o valor de voltagem em que a membrana da célula se manteve na maior parte do tempo de registro e o valor do potencial de membrana em repouso determinado pelo pico de maior número de pontos (da Silva *et al.*, 2013) (figura 6).



**Figura 6** – Método para determinação do potencial de membrana em repouso. O histograma representativo de um neurônio registrado mostra a distribuição dos valores de voltagem da membrana na qual o maior número de pontos corresponde ao potencial de membrana em repouso (RMP).



A resistência de entrada da membrana ( $R_{input}$ ) foi avaliada no modo *current-clamp* por meio da injeção de corrente hiperpolarizante de magnitude progressivamente decrescente (em passos de  $-12.5$  pA) até um limite de voltagem de membrana próximo a  $-120$  mV, como ilustrado no painel A da figura 7. A  $R_{input}$  foi obtida a partir da média de ao menos duas curvas de relação entre a corrente injetada e a resposta de voltagem (curvas  $V \times I$ ), realizadas para cada neurônio submetido ao presente protocolo. A  $R_{input}$  corresponde à inclinação da curva  $V \times I$  na sua porção mais linear e próxima ao potencial de repouso da célula.



**Figura 7.** **Painel A** - Desenho representativo do protocolo da injeção de corrente hiperpolarizante em passos de  $-12,5$  pA. **Painel B** - Registro representativo da voltagem da membrana de um neurônio em resposta à corrente injetada. **Painel C** - Gráfico da voltagem da membrana vs corrente injetada ( $V \times I$ ), representando o métodos empregado para cálculo da resistência de entrada, na qual a linha verde corresponde ao ajuste de uma reta à porção do gráfico mais linear e próxima ao RMP ( $0$  pA) e a inclinação desta reta corresponde a resistência de entrada.

Decorrido este período, em configuração *voltage-clamp* as correntes excitatórias e inibitórias foram registradas a finalidade de nos certificarmos da efetividade da completa inibição da neurotransmissão.

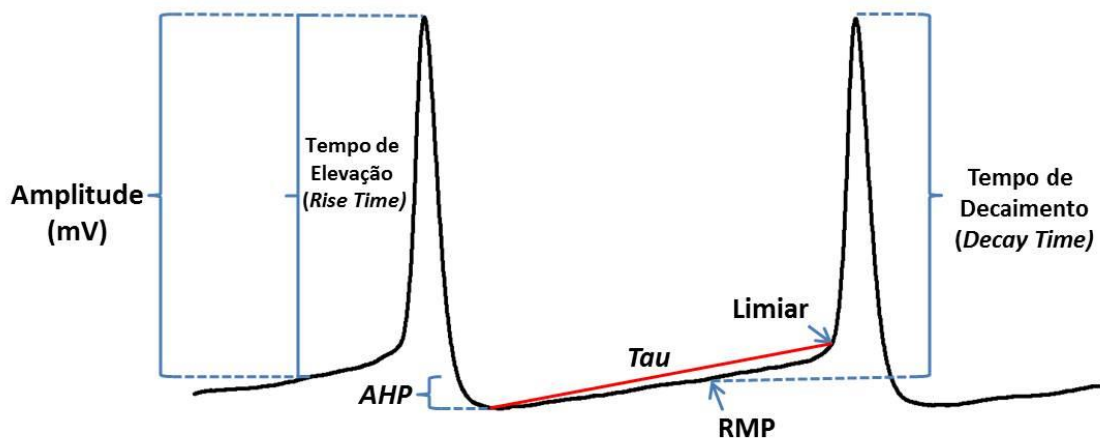
Com o objetivo de se avaliar os efeitos da HA sobre as propriedades passivas em neurônios pré-simpáticos da RVLM, a solução utilizada para perfusão das fatias foi substituída por solução borbulhada com mistura hipóxica (95% de N<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) contendo os bloqueadores sinápticos conforme descritos anteriormente. As fatias foram perfundidas durante 2 minutos com essa solução hipóxica e em seguida reperfundidas com solução aCSF oxigenada, como detalhado anteriormente. Os protocolos para avaliação das propriedades passivas foram repetidos em todas as condições experimentais e foram avaliadas individualmente para cada neurônio.

A capacitância da membrana foi estimada por meio do valor obtido a partir da compensação desse parâmetro pelo amplificador, mais especificamente, por meio da compensação dos transientes capacitivos gerados por um pulso de voltagem de 5 mV, no modo *voltage-clamp*.

#### 3.4.6.2. Análise das propriedades eletrofisiológicas ativas

Este protocolo teve por objetivo avaliar se as propriedades eletrofisiológicas ativas intrínsecas da membrana dos neurônios pré-motores simpáticos são afetadas pela exposição à HA. As propriedades ativas de excitabilidade dos neurônios pré-simpáticos avaliadas foram as seguintes: a frequência de disparos dos PAs, *half-width* (metade da largura da amplitude), *rise time* (tempo de elevação), *decay time* (tempo de decaimento), amplitude da hiperpolarização posterior ao potencial de ação (AHP) e a constante de

tempo entre a AHP e o limiar de disparo do próximo PA (figura 8). Como os neurônios pré-simpáticos apresentam a característica de serem auto-despolarizantes, utilizamos os 30 segundos do registro em *current-clamp* sem a injeção de corrente que antecederam à HA e comparamos ao final dos 2 minutos do protocolo de HA. As análises dos PAs foram realizadas por meio do programa pClamp 10 (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA).

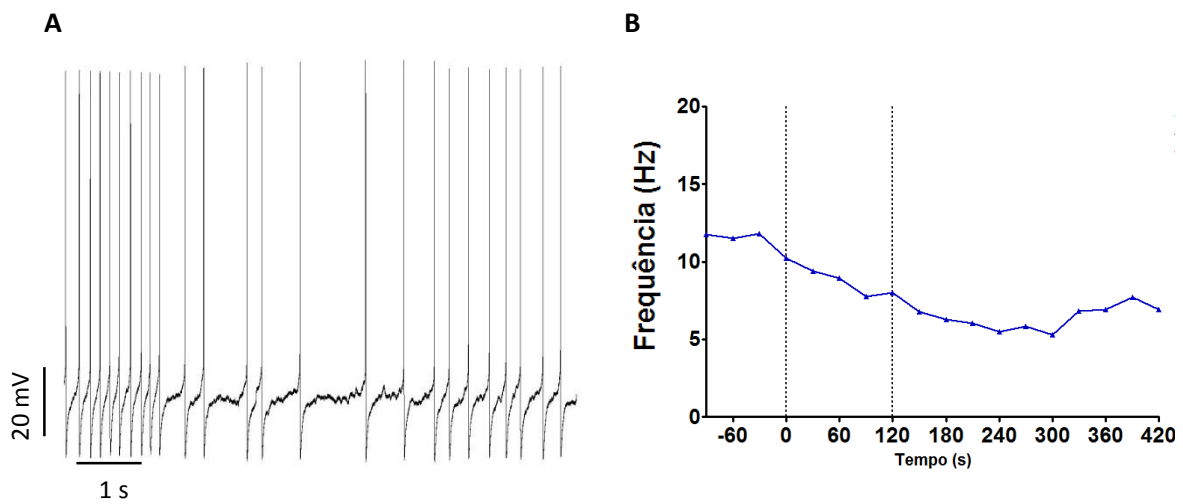


**Figura 8.** Representação esquemática do potencial de ação mostrando algumas das suas características eletrofisiológicas ativas analisadas nos neurônios pré-simpáticos da RVLM antes e após a HA. *AHP*- hiperpolarização pós-potencial; *Tau* – a constante de tempo entre a *AHP* e o limiar de disparo do próximo PA

### 3.5. Critérios de exclusão das células registradas

Numa primeira etapa foram avaliados registros eletrofisiológicos em condições basais e sem o BS com a finalidade de observarmos o perfil de disparos de PAs no decurso temporal. Para a análise da regularidade da frequência de disparo, utilizamos a análise do decurso temporal focando numa janela temporal de pelo menos 2 min de registro basal,

na ausência do BS, e calculamos a média de disparos para cada 30 segundos de registros. Consideramos como células estáveis e viáveis para a continuidade do experimento aquelas que apresentaram frequência média de disparo com baixo desvio padrão após o BS (frequência  $\pm 2$  DPM). As células que apresentaram irregularidade na frequência de disparo (painel A, figura 9) foram descartadas da análise deste trabalho, uma vez que o aumento ou a diminuição na frequência de disparos sem os efeitos do BS ou da HA seria um fator limitante para a interpretação dos possíveis efeitos da HA sobre as propriedades intrínsecas ativas e passivas destes neurônios. É importante destacar que a irregularidade na frequência de disparo das células que foram descartadas não foi devido à problemas com a obtenção do *whole-cell* ou a iminente morte celular. Pelos registros eletrofisiológicos não observamos células com padrão de disparo em *bursts*, sejam as células que foram consideradas para a análise ou as descartadas.



**Figura 9. Painel A** - Registro eletrofisiológico representativo de um neurônio pré-simpático da RVLN com padrão irregular de disparos de PAs e **Painel B** - o decurso temporal representativo desse mesmo neurônio ilustrando as variações na frequência média de disparo de PAs durante 9 min de registro, refletindo a atividade intrínseca.

Além desses critérios, os valores da frequência média de disparos de PAs de todas as células registradas foram analisadas pelo teste estatístico de Grubbs, o qual determina se algum dos valores listados nos resultados apresenta um comportamento diferente dos demais e pode ser considerado um *outlier*. As células cujos valores de frequência foram considerados *outliers*, de acordo com o teste de Grubbs ( $p < 0,05$ ), foram descartadas das nossas análises.

### **3.6. Caracterização fenotípica dos neurônios pré-simpáticos da RVLM**

Os neurônios pré-simpáticos da RVLM podem ser distinguidos em subgrupos de acordo com o seu conteúdo neuroquímico, expressão de receptores, e / ou atributos funcionais (Burke *et al.*, 2011). O fenótipo dos neurônios pode ser estudado pela imunohistoquímica, a qual tem por finalidade revelar marcadores moleculares específicos bem como a localização de biomarcadores por meio da reação antígeno-anticorpo. Essas características morfológicas que distinguem esses neurônios e reveladas pela técnica de imunohistoquímica são chamadas de marcações fenotípicas.

Como descrito na literatura, a RVLM abriga 2 grupos de neurônios pré-simpáticos: o grupamento C1, no qual os neurônios possuem as enzimas necessárias para a produção de adrenalina e abrange cerca de 70% da população de neurônios desta área; e o grupamento não-adrenérgico que corresponde aos demais neurônios não-catecolaminérgicos desta região (Ruggiero *et al.*, 1994; Stornetta *et al.*, 2002; Guyenet *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2013). Uma característica morfológica que diferencia esses grupos é a presença da tirosina hidroxilase (TH), uma enzima integrante da via metabólica de produção de catecolaminas, e a imunorreatividade à mesma se apresenta como um

marcador adequado para a identificação das células C1 (Stornetta *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2001).

Com o objetivo de verificar uma possível correlação entre os diferentes grupamentos neuroquímicos de neurônios pré-simpáticos da RVLM (grupo C1 e não-adrenérgico) com os diferentes padrões de resposta observados em resposta a exposição à HA, os neurônios registrados foram também processados para a avaliação por meio de procedimentos imunohistoquímicos. Para a identificação de cada uma das células registradas adicionamos o traçador celular biocitina (0,3%, Life Technologies Corporation, Carlsbad, EUA) à solução interna de pipeta, para que ao se difundir para o meio intracelular do neurônio registrado, nos permitisse a identificação dos mesmos.

Após os experimentos, as fatias do tronco cerebral contendo as células registradas foram removidas da câmara de registro e transferidas para um recipiente contendo paraformaldeído 4%. Após 24 horas nessa solução, as fatias foram lavadas com PBS, colocadas em uma solução crioprotetora (20% glicerol, 30% de etilenoglicol em 50 mM de tampão fosfato (PB), pH 7,4) com a finalidade de preservar a integridade do tecido neural e armazenadas em baixa temperatura (-20°C) até o processamento imunohistoquímico. Para os procedimentos de imunofluorescência, as fatias foram lavadas com PBS contendo 10% de soro de cavalo e 0.5% de Triton X-100 por 1 hora em temperatura ambiente. As fatias foram novamente lavadas com PBS e a seguir incubadas com anticorpo primário. A biocitina foi revelada incubando-se as secções em soluções de estraptavidina com o conjugado Alexa 488 (1:200, 3h; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA), enquanto que a tirosina-hidroxilase (TH) foi revelada incubando-se com o anticorpo primário anti-TH (camundongo, 1:10000; Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) durante 24 horas. A seguir, as fatias foram incubadas

com o anticorpo secundário (burro; Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) anti-IGG de camundongo conjugado com alexa 647 (camundongo, 1:500; Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) durante 1 hora. Ao final os cortes foram montados na sequência de rostral para caudal em lâminas e posteriormente cobertos com Fluoromount (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA).

Os neurônios foram visualizados usando um microscópio de varredura a laser confocal (Leica TCS SP5) equipado com laser de comprimento de ondas de 488 e 633 nm e detecção de emissão ajustável. Para cada corte, os neurônios que apresentaram marcação positiva para biocitina foram identificados e imagens sequenciais foram coletadas em outro canal utilizando outro comprimento de onda para identificar os neurônios positivos para a TH. A co-localização de neurônios registrados (biocitina) e imunorreativos à TH foi verificada pela sobreposição das imagens.

### **3.7. Drogas**

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes drogas: picrotoxina (Sigma, EUA), 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (DNQX, RBI, EUA), estriquinina (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). As soluções estoques de DNQX foram dissolvidas em DMSO, sendo que a concentração final deste no perfusato foi sempre menor do que 0,05%. A diluição final das drogas foi feita em aCSF. A perfusão da fatia em registro com a solução de aCSF foi realizada por um sistema controlado por válvulas-solenóides (VC-8, Warner Instruments, Hamden, Connecticut EUA) via perfusão por gravidade (fluxo de 2-3 ml/min). Os registros somente foram iniciados 2 minutos após o início da perfusão das drogas.

### 3.8. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). Primeiramente utilizamos o teste de Grubb a fim de detectar os possíveis *outliers* e descartar tais células de nossas análises. Aos dados obtidos foi aplicado o teste t pareado, quando comparada apenas uma variável, com distribuição normal, de um mesmo grupo.

Para a comparação de duas variáveis empregou-se a análise de variância (ANOVA) de duas vias e para a comparação de distribuições utilizou-se o teste de Kolmorov-Smirnov (KS). Entretanto, cabe salientar que após a descrição dos valores de cada resultado, destacamos o teste estatístico empregado para comparação dos grupos. Todas as operações gráficas e análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism (versão 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

Nos gráficos optamos por representar os dados na forma de dispersão a fim de que os valores individuais possam ser visualizados e não fiquem em sobreposição. Nesses, a média dos valores encontra-se representada por uma linha central, acima e abaixo da qual estão expressos os valores do EPM do grupo.



## ***4. RESULTADOS***

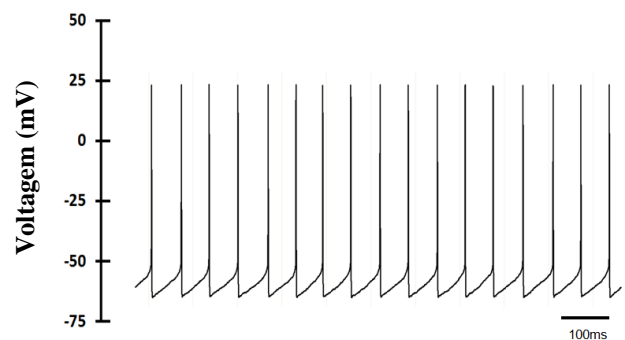
#### 4.1. As propriedades eletrofisiológicas passivas intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos controle

A região RVLM faz parte da formação reticular do bulbo e em ratos com idade superior à 21 dias a maturação da rede neuronal dificulta a visualização dos neurônios pré-simpáticos para a realização de registros eletrofisiológicos. Além disso, como descrito anteriormente, a RVLM abriga populações distintas de neurônios (pré-simpáticos e respiratórios) e o foco deste estudo foram os neurônios pré-simpáticos bulbo-espinhais da RVLM, ou seja, aqueles neurônios que enviam projeções excitatórias para a CIL e são responsáveis pela geração da atividade simpática.

Com o objetivo de se investigar os efeitos da exposição à HA sobre a atividade dos neurônios pré-simpáticos da RVLM, primeiramente nos atentamos para o registro eletrofisiológico basal, utilizando a técnica de *whole-cell patch-clamp*, de neurônios localizados nessa região e que foram marcados por meio da microinjeção de rodamina, um traçador fluorescente retrógrado, na CIL de animais jovens adultos (P35). Vale ressaltar as dificuldades técnicas utilizadas no desenvolvimento desse trabalho para se obter os registros eletrofisiológicos de neurônios pré-simpáticos bulboespinhais da RVLM em fatias do tronco cerebral de ratos com idade superior a 12 dias, uma vez que o índice de acerto da microinjeção na CIL e a manutenção da viabilidade das células para registro foram fatores limitantes. Além disso, é oportuno destacar que importantes avanços no registro eletrofisiológicos de neurônios pré-simpáticos da RVLM em fatias de tronco cerebral de animais adultos jovens (33-35 dias) foram realizados no nosso laboratório por Almado (Tese de Doutorado, 2012), pois nos estudos existentes na literatura os registros desses neurônios foram feitos em preparações obtidas de ratos

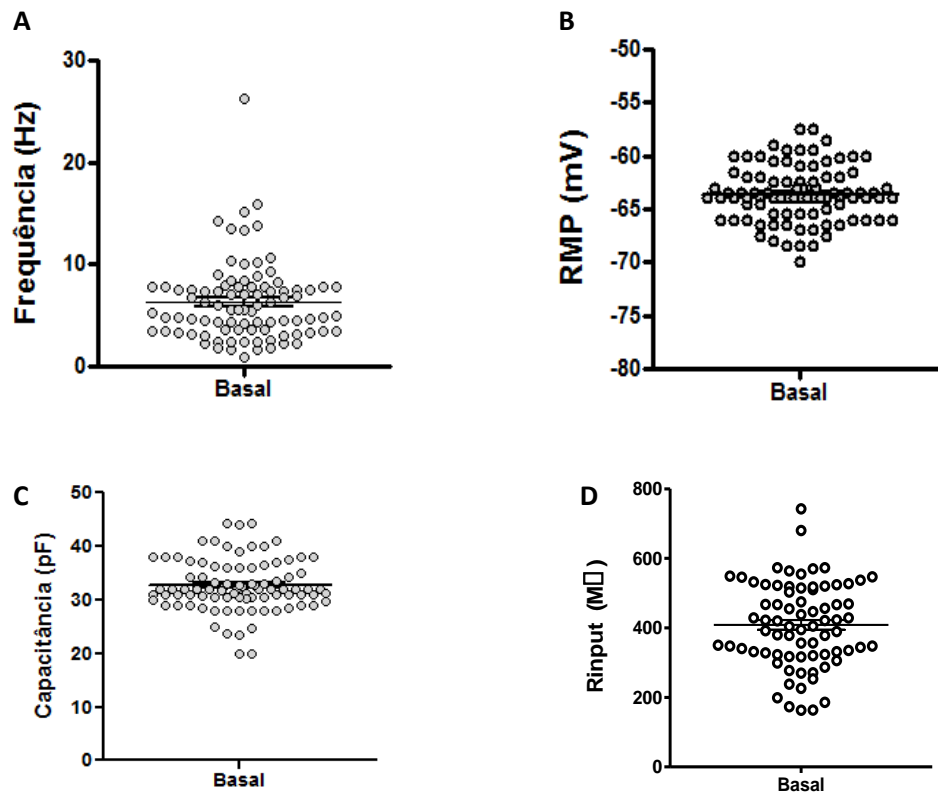
neonatos (Johnson *et al.*, 1994; Koshiya & Smith, 1999; Mellen *et al.*, 2004; Mazza *et al.*, 2009). A técnica da marcação retrógrada para identificar os neurônios pré-simpáticos bulboespinais descrita previamente (Sun *et al.*, 1988; Almado *et al.*, 2014) foi efetiva para a identificação dos neurônios pré-simpáticos a serem registrados, como mostrado na figura 4 em materiais e métodos.

Após a visualização dos neurônios pré-simpáticos da RVLM com marcação retrógrada positiva e a constatação da viabilidade da célula, utilizamos a configuração *whole-cell patch-clamp* para o registro eletrofisiológico da atividade elétrica da célula. Primeiramente, as fatias foram perfundidas com aCSF na condição controle e registramos um total de 104 neurônios pré-simpáticos de animais controle que apresentaram marcação positiva. Verificamos que todos os neurônios apresentaram padrão de auto-despolarização, característico das células marca-passo (figura 10) conforme mostrado em estudos de Almado *et al.* (2014) e de Sun *et al.* (1988) que utilizaram esta mesma abordagem experimental.



**Figura 10:** Registro basal na configuração *current-clamp* de um neurônio pré-simpático da RVLM representativo do grupo, mostrando o padrão auto-despolarizante de disparo dos PAs.

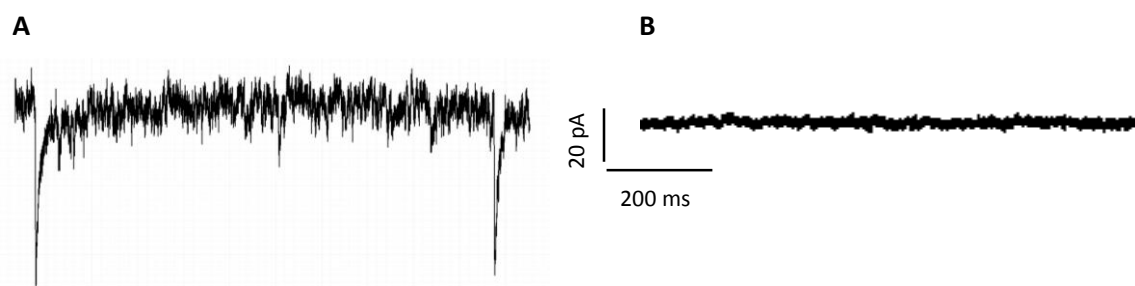
Do total de 104 neurônios pré-simpáticos registrados em fatias do tronco cerebral de animais controle, 15 foram descartados de acordo com os nossos critérios de exclusão descritos anteriormente. Numa primeira etapa foram avaliados nos registros eletrofisiológicos de 89 neurônios pré-simpáticos o potencial de membrana em repouso (RMP), a frequência de disparos de PAs, a capacitância e a resistência de entrada. Com o registro basal dos neurônios no modo *current-clamp*, observamos que a média de frequência de disparo de PAs foi de  $6,30 \pm 0,41$  Hz; o RMP de  $-63,62 \pm 0,28$  mV e capacitância  $32,64 \pm 0,51$  pF (painéis A, B e C da figura 11, respectivamente). Observamos que os 75 neurônios registrados apresentaram Rinput de  $488,6 \pm 41,49$  M $\Omega$  (painel D figura 11).



**Figura 11.** **Painel A:** Distribuição da frequência média de disparo basal dos neurônios pré-simpáticos da RVLM do grupo controle. **Painel B:** Distribuição dos valores médios do potencial de repouso da membrana (RMP) do grupo controle. **Painel C:** Distribuição dos valores da capacitância e **Painel D:** Distribuição dos valores médios da Rinput (n=75).

Como o primeiro objetivo de nosso trabalho foi avaliar os efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas passivas e ativas dos neurônios pré-simpáticos em fatias do tronco cerebral de ratos adultos jovens (P35), fez-se necessário o bloqueio completo dos receptores dos neurotransmissores excitatórios e inibitórios que poderiam modular o padrão de disparo de PAs e as características eletrofisiológicas desses neurônios. Para a realização deste protocolo, decorrido o tempo do registro em condições basais dos neurônios pré-simpáticos, as fatias foram perfundidas com solução de aCSF contendo um coquetel de bloqueadores sinápticos a fim de inibir as influências gabaérgicas (picrotoxina, 100  $\mu\text{M}$ ); glutamatérgicas (AP-5, 40  $\mu\text{M}$ ; DNQX, 10  $\mu\text{M}$ ) e glicinérgicas (estriquinina, 1  $\mu\text{M}$ ) e borbulhadas com mistura carbogênica padrão (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ).

Entre os 89 neurônios pré-simpáticos da RVLM que registramos em condições basais, obtivemos o registro de 60 deles sob o efeito do BS completo. A análise das propriedades intrínsecas dos neurônios registrados foi feita comparando os dados obtidos nas duas condições experimentais. A fim de verificarmos a efetividade do BS, decorridos 5 minutos de registros eletrofisiológicos, sob a perfusão com aCSF na presença dos bloqueadores sinápticos, registramos em *voltage-clamp* a ausência de correntes excitatórias e inibitórias (painel B, figura 12) comparadas ao seu respectivo controle (painel A, figura 12).

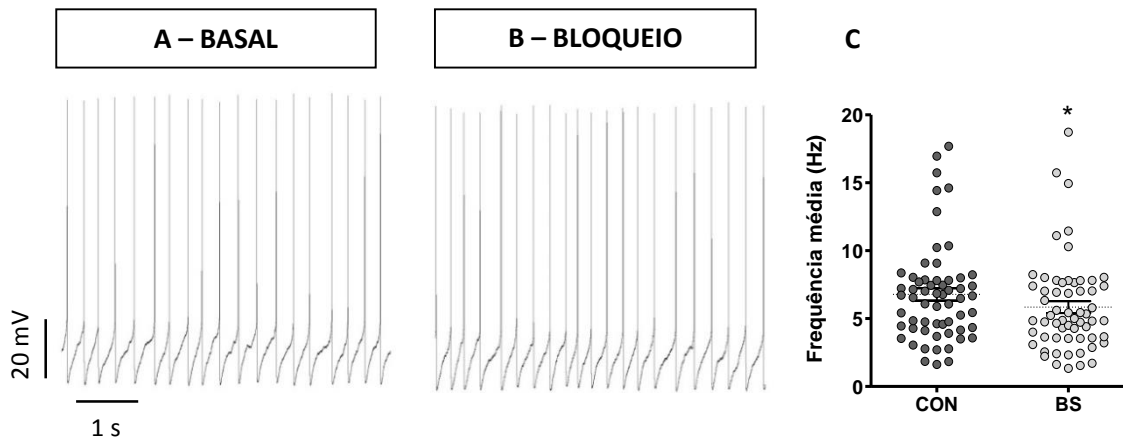


**Figura 12. Painel A:** Traçado representativo do registro das correntes em *voltage-clamp* na condição basal e **Painel B:** após o bloqueio sináptico, condição na qual observamos a ausência das correntes.

Verificamos que todos os neurônios pré-simpáticos registrados na presença do BS (n=60) continuaram apresentando um padrão intrínseco de auto-despolarização (figura 13). Com o registro eletrofisiológico no modo *current-clamp*, observamos que a média de frequência de disparo de PAs na condição basal foi de  $6,8 \pm 0,5$  Hz e que o bloqueio da atividade sináptica promoveu uma significativa redução na frequência de PAs desses neurônios [CON=  $6,8 \pm 0,5$  Hz vs BS=  $5,8 \pm 0,4$  Hz; (n=60), teste t pareado,  $p < 0,05$ ; figura 13 C)]. Esses resultados corroboram observações de Sun *et al.* (1988), Guyenet (2006) e Almado *et al.* (2014), os quais mostraram que os neurônios pré-simpáticos bulboespinais apresentam atividade intrínseca de auto-despolarização.

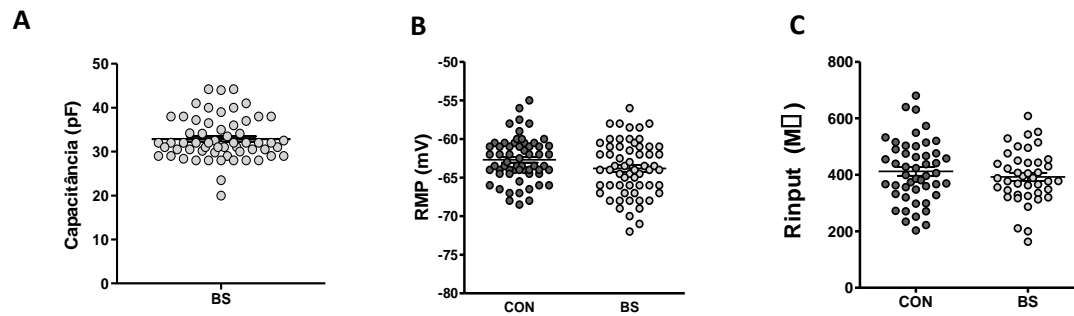
A diminuição da frequência de disparo de PAs após o BS reflete a existência de uma modulação sináptica excitatória tônica sobre esses neurônios na condição experimental basal na qual foram registrados. Embora muitas projeções neurais que estabeleçam contato sináptico com os neurônios registrados tenham sido seccionadas

quando da obtenção das fatias do tronco cerebral, esses neurônios continuaram recebendo influências excitatórias tônicas das projeções neuronais remanescentes na fatia.



**Figura 13.** Registro eletrofisiológico representativo de um neurônio pré-simpático: **Painel A** – sob a perfusão de aCSF na condição controle e **Painel B** – na presença dos bloqueadores sinápticos. **Painel C** - Distribuição da frequência média de disparo dos PAs de 63 neurônios registrados antes (CON) e após o bloqueio sináptico (BS). \*  $p < 0,05$  – diferença em relação à condição basal.

Quanto às propriedades eletrofisiológicas passivas desses neurônios, avaliamos a capacitância, o RMP e a  $R_{input}$  imediatamente após a verificação da efetividade do BS. Observamos que os 60 neurônios registrados apresentavam capacitância média de  $32,8 \pm 0,6$  pF, e que apesar do BS ter diminuído a frequência de disparos de PAs, não observamos alterações significativas nos valores médios do RMP (Con=  $-63 \pm 0,4$  mV vs BS=  $-64 \pm 0,5$  mV; teste t pareado,  $p > 0,05$ ); (figura 14 B)] ou nos valores médios da  $R_{input}$  (Con=  $412 \pm 16$  m $\Omega$  vs BS=  $393 \pm 15$  m $\Omega$ ; n=48; teste t pareado,  $p > 0,05$ ); (figura 14 C).



**Figura 14.** **Painel A** – Distribuição dos valores médios da capacitância dos neurônios pré-simpáticos após o BS (n= 60). **Painel B** – Distribuição dos valores do potencial de membrana em repouso (RMP) antes e após o BS (n= 60) e **Painel C** – resistência média de entrada (Rinput) dos registros basais dos neurônios pré-simpáticos realizados antes (n= 48) e após o BS (n= 41).

O protocolo de HA também foi realizado sob o efeito dos BS para evidenciarmos os possíveis efeitos da HA sobre as propriedades intrínsecas nos neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos jovens adultos e compararmos com os seus respectivos controle.

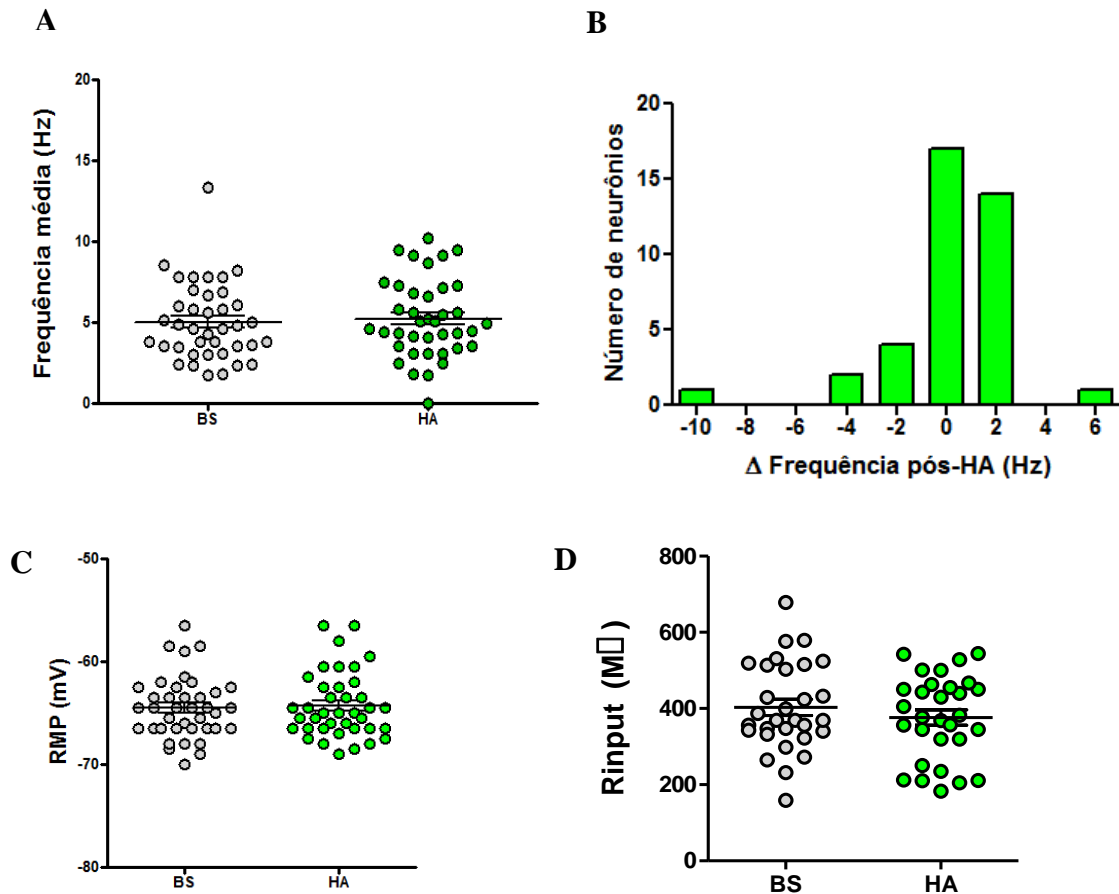
#### ***4.2 Efeitos da HA sobre as propriedades intrínsecas passivas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM***

Com o intuito de avaliarmos os possíveis efeitos da exposição durante 2 minutos a um protocolo de HA sobre as características eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM, as fatias foram na sequência subperfundidas com uma solução de aCSF contendo os BS e borbulhada com mistura anóxica (95% N<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). É importante salientar que dos 60 neurônios registrados sob o bloqueio sináptico, 39



neurônios pré-simpáticos foram incluídos na análise após o protocolo de 2 minutos de exposição à HA.

Primeiramente analisamos o efeito da HA ao final do tempo de exposição da fatia por 2 minutos sobre a frequência intrínseca de disparo de PAs dos neurônios pré-simpáticos. Vale ressaltar que cada célula foi comparada individualmente em relação ao seu respectivo controle. Verificamos que o desafio hipóxico não promoveu alterações significativas na média de frequência intrínseca de disparo de PAs quando comparado à média da frequência durante o bloqueio sináptico [BS:  $5,03 \pm 0,4$  Hz vs. HA:  $5,24 \pm 0,3$  Hz, (n=39); teste t pareado,  $p > 0,05$ ], RMP (BS=  $-64,5 \pm 0,5$  mV vs HA=  $-64,3 \pm 0,5$  mV; teste t pareado,  $p > 0,05$ ) e Rinput (BS=  $403 \pm 21$  M $\Omega$ ; vs HA=  $377 \pm 20$  M $\Omega$ ; n = 30; teste t pareado,  $p > 0,05$ ). A variação da frequência de disparos de PAs foi calculada pela diferença dos valores absolutos após a HA e o BS ( $\Delta$ ), com distribuição assimétrica com cauda à esquerda (teste de Skewness negativo, com valor de -1,862), os quais estão mostrados no painel B da figura 15.



**Figura 15. Painel A** – Distribuição dos valores médios da frequência de disparos de PAs dos neurônios pré-simpáticos antes (BS) e após a HA (n= 39). Os círculos representam os valores individuais de cada célula registrada. **Painel B** – Valores médios da variação da frequência de disparos de PAs ( $\Delta$ ) após a HA. **Painel C** – Distribuição dos valores do potencial de membrana em repouso (RMP) antes e após a HA. e **Painel D** – resistência média de entrada ( $R_{input}$ ) dos registros basais dos neurônios pré-simpáticos realizados antes (BS) e após a HA.

Vale ressaltar que após 2 min de exposição à HA um fato importante mereceu a nossa atenção: a frequência média de disparos apresentou uma grande variação no valor absoluto entre as células. Se levássemos em consideração a comparação da análise da frequência média dos neurônios pré-simpáticos registrados antes e após a exposição à HA, os possíveis efeitos da HA no perfil da frequência de disparo desses neurônios

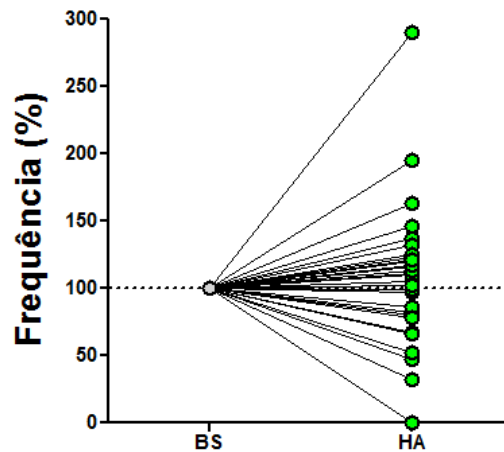
poderiam não ser identificados. Sob o efeito do BS, analisamos a frequência média absoluta de disparos de PAs dos 39 neurônios pré-simpáticos submetidos ao protocolo de HA, a qual foi de  $5,03 \pm 0,4$  Hz, sendo que no conjunto registramos células que variaram de 2 Hz até 14 Hz de frequência. Com isso, percebemos que se levássemos em consideração a variação da frequência absoluta de disparo de PAs ( $\Delta$ ) em cada neurônio em resposta ao desafio HA, não perceberíamos os possíveis efeitos que este estímulo estaria causando em cada célula. Por exemplo, se um neurônio apresentasse frequência média de disparos de PAs de 3 Hz e após o desafio HA, o delta de variação fosse 3 Hz, isso significaria um aumento de 100% na frequência de disparos. Por outro lado, se um dado neurônio registrado com frequência basal de 15 Hz também apresentasse delta de aumento de 3 Hz, isso significaria aumento de 20% na frequência de disparos. Ainda que o delta de variação seja o mesmo para ambas as células, os efeitos que esta variação causaria nessas 2 células seriam muito diferentes.

Como a frequência média de PAs dos neurônios registrados foi muito variável (de 2 à 18 Hz) a maneira que nos pareceu ser a mais adequada para observarmos esse comportamento foi normalizar os dados para cada célula, assumindo que a frequência de disparo de cada célula durante o BS representava sua frequência máxima (100%) e as respostas à HA foram normalizadas em relação a esse valor basal, como descrito na fórmula abaixo, na qual a frequência HA e a frequência basal são dadas em valores reais:

$$\text{FREQUÊNCIA HA NORMALIZADA} = \frac{\text{FREQUÊNCIA HA} \times 100}{\text{FREQUÊNCIA BASAL}}$$

Ainda que esta possa não ser a forma ideal de quantificarmos a frequência, essa análise nos permitiu mostrar as diferenças significativas após a HA e sugerir a possível

existência de subpopulações de neurônios que apresentam comportamentos distintos frente ao desafio hipóxico (figura 16).



**Figura 16:** Figura representativa dos efeitos de 2 min do protocolo de HA sobre a frequência intrínseca de disparo de PAs normalizados de 39 neurônios pré-simpáticos da RVLM na presença de bloqueadores sinápticos. Valores normalizados a partir da frequência intrínseca obtidos na condição do bloqueio sináptico (BS).

De acordo com essa análise, após 2 min de desafio hipóxico, os distintos padrões de frequência em resposta à HA indicam a existência de 3 subpopulações de neurônios pré-simpáticos. Para classificarmos a distribuição das células a partir dos dados normalizados, utilizamos o programa Clampfit 10, o qual nos forneceu a frequência média de PAs e o desvio padrão da média (DPM) para o intervalo de tempo selecionado (30 segundos). Na classificação das 3 diferentes subpopulações identificadas pela normalização dos dados, selecionamos os 30 segundos finais do tempo de exposição de 2 min à HA e comparamos com os registros obtidos no bloqueio sináptico da mesma célula, ou seja, imediatamente antes do início da HA.

Para que pudéssemos classificar adequadamente a distribuição das células a partir da análise dos dados normalizados, adotamos o mesmo critério utilizado para avaliar a regularidade da frequência de disparo (item 3.5 dos Materiais e Métodos). A célula foi classificada como sendo do grupo I se após a HA ela apresentasse valor de frequência absoluta maior do que a frequência basal mais 2 vezes o DPM de seu respectivo controle. O grupo III foi composto das células que após a HA apresentassem frequência menor que a frequência basal menos 2 vezes o DPM de seu respectivo controle. As células pertencentes ao grupo II foram aquelas que não apresentaram alterações na frequência de disparo quando comparado com seu respectivo controle, ou seja, o valor da frequência média nos 30 segundos finais da HA permaneceu numa faixa entre a frequência basal mais ou menos 2 vezes o DPM.

A partir desses critérios confirmamos a observação dos dados normalizados da frequência de disparo mostrados na figura 16. Além disso, fizemos a distribuição dos 39 neurônios registrados em cada uma das 3 subpopulações observadas, resultando nos seguintes números:

- Grupo I: 11 neurônios pré-simpáticos registrados apresentaram aumento na frequência de disparo após a HA;
- Grupo II: 21 neurônios pré-simpáticos não apresentaram alterações na frequência de disparo após a HA;
- Grupo III: 7 neurônios pré-simpáticos registrados apresentaram diminuição na frequência de disparo após a HA.

É importante ressaltar que no momento em que iniciávamos os registros de uma dada célula não era possível prever qual seria a resposta da mesma frente ao desafio de HA, uma vez que nossos critérios para a seleção dos neurônios pré-simpáticos a serem

registrados foram sempre a marcação retrógrada positiva e a sua viabilidade. Portanto, a classificação foi realizada posteriormente.

Considerando que o protocolo de exposição de 2 min ao protocolo de HA permitiu revelar as 3 subpopulações de neurônios pré-simpáticos da RVLM, avaliamos os efeitos da HA sobre o perfil eletrofisiológico de cada subpopulação separadamente.

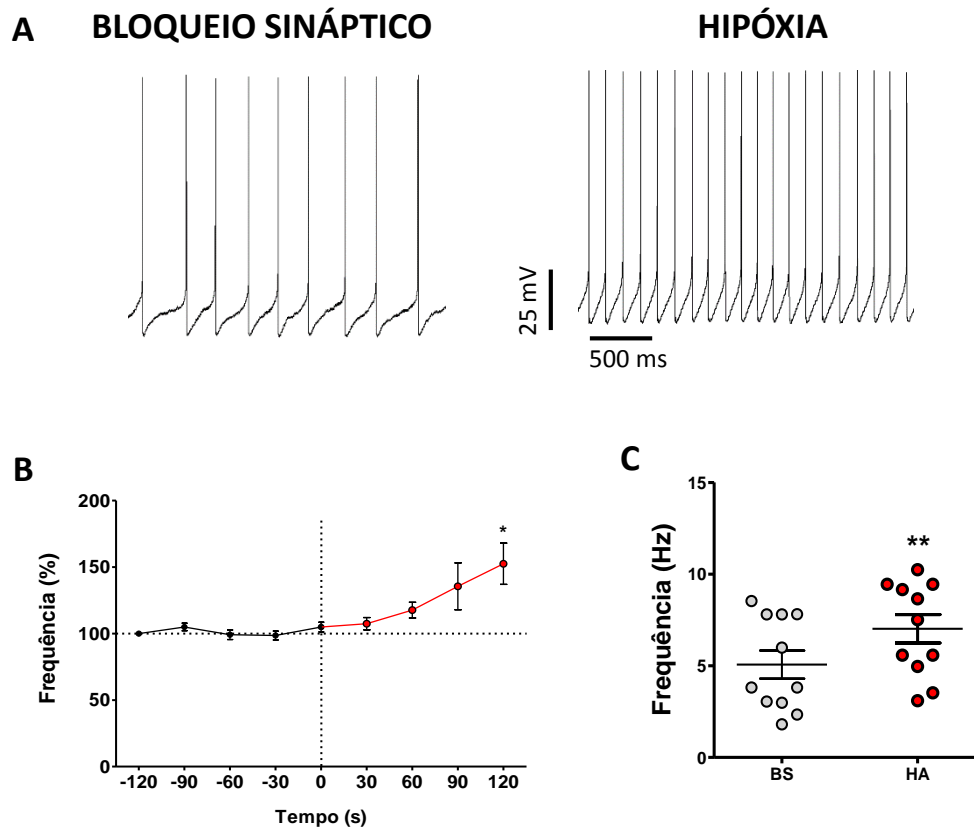
#### *4.2.1 Efeitos da HA sobre as propriedades intrínsecas dos neurônios pré- simpáticos da RVLM que apresentaram aumento na frequência de disparos de PAs – Grupo I*

##### *4.2.1.1 Efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas passivas*

Como descrito anteriormente, alguns neurônios pré-simpáticos da RVLM apresentaram aumento na frequência de disparos de PAs após o desafio hipóxico. Como a HA afetou a frequência de disparos, avaliamos se as características eletrofisiológicas passivas como o RMP e a Rinput também foram afetadas.

Inicialmente analisamos o decurso temporal da frequência de disparos de PAs normalizada dos 11 neurônios classificados no grupo I, no que diz respeito ao período que antecedeu o desafio hipóxico, bem como as alterações da frequência observadas durante os 2 min de HA (figura 17B). Analisando o decurso temporal, verificamos alterações significativas na frequência de disparo apenas ao final dos 2 min de exposição (BS:  $105 \pm 4\%$  vs HA:  $153 \pm 15\%$ ; \*  $p < 0,05$ , teste ANOVA, seguido de Post-teste de Tukey;  $F_{1,96} = 2,127$ ). Em relação à frequência de disparos de PAs, a HA promoveu um

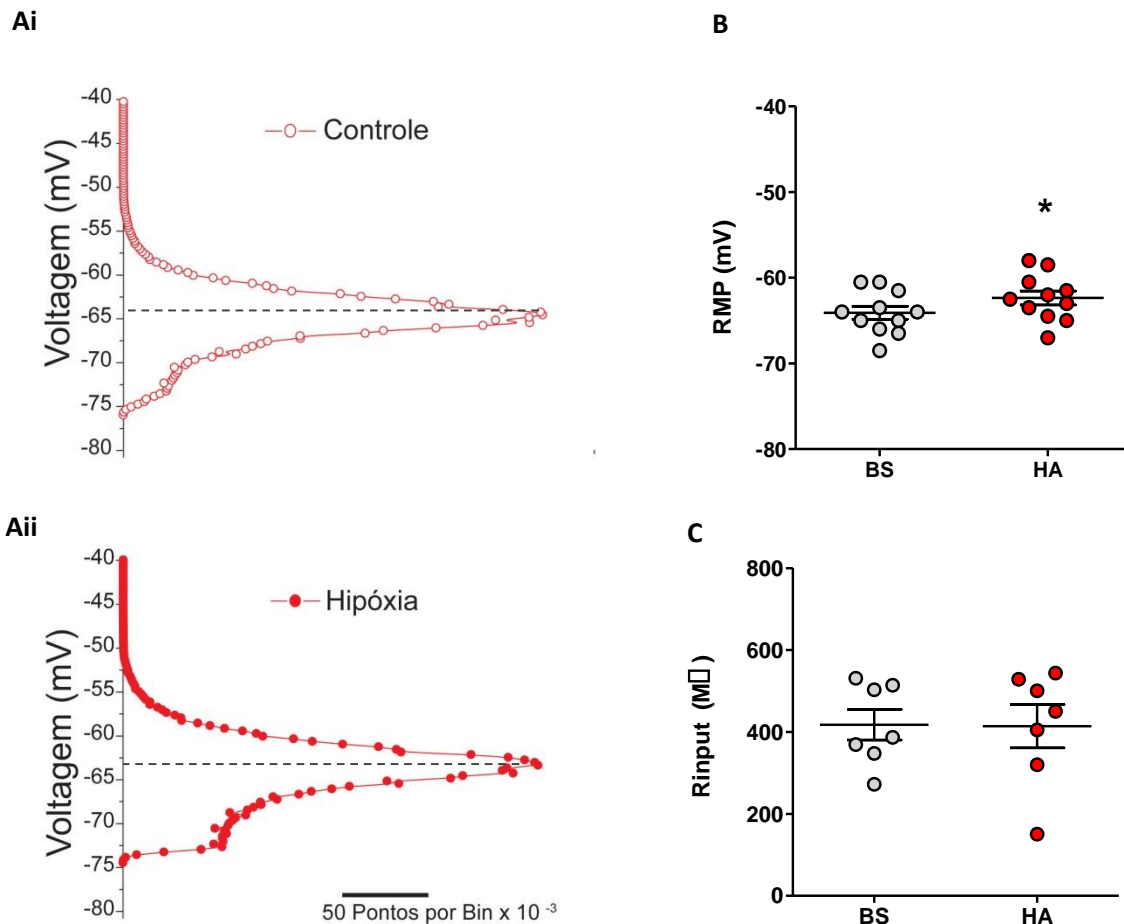
aumento significativo na frequência média de disparos quando comparado com o seu respectivo controle (BS:  $5,1 \pm 0,7$  Hz vs HA:  $7 \pm 0,7$  Hz;  $** p < 0,01$ ; teste t pareado; figura 17 C).



**Figura 17:** Efeitos de 2 min de HA sobre a frequência intrínseca de disparo dos neurônios do grupo I na presença de bloqueadores sinápticos (n=11). **Painel A** – Traçado representativo do registro eletrofisiológico de um neurônio pré-simpático durante o bloqueio sináptico e após 2 min de exposição à HA. **Painel B** – Decurso temporal dos valores médios normalizados de frequência de despolarização a partir dos registros obtidos na condição de normóxia (BS) à esquerda do gráfico (em preto) e na condição da HA à direita (em vermelho) (n=11). Teste ANOVA, seguido de Post-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  para comparação do tempo 0 s com 120 s de HA. **Painel C** - distribuição dos valores médios da frequência intrínseca de disparos de PAs ( $** p < 0,01$ ).

Avaliamos as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas passivas dos neurônios pré-simpáticos como o potencial de membrana em repouso (RMP) e a Rinput. O RMP foi avaliado por meio de registro eletrofisiológico no modo *current-clamp* durante aproximadamente 15 segundos que antecederam o desafio hipóxico e comparado com os 15 segundos finais do desafio hipóxico. Além de aumentar a frequência de disparos dos neurônios pré-simpáticos, a HA despolarizou o RMP em relação ao bloqueio sináptico (BS:  $-64,09 \pm 0,76$  mV vs HA:  $-62,36 \pm 0,14$  mV; \*  $p < 0,05$ , teste t pareado) (Figura 18 B). Em relação à Rinput, a HA não promoveu alterações significativas quando comparada ao bloqueio sináptico (BS:  $418 \pm 37$  M $\Omega$  vs HA:  $414 \pm 53$  M $\Omega$  ; n = 6;  $p > 0,05$ , teste t pareado) (Figura 18 C).

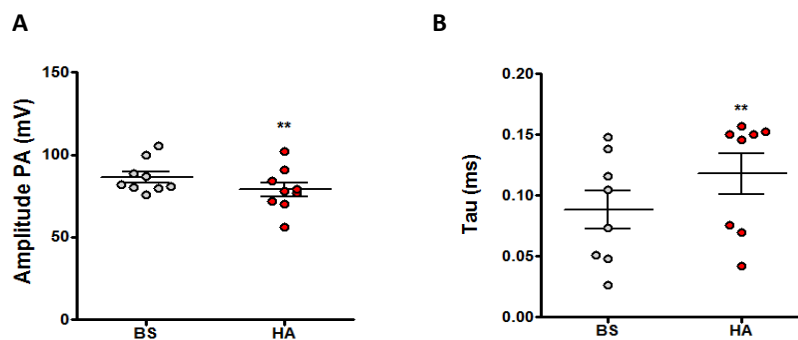




**Figura 18:** Efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas passivas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que aumentaram a frequência de disparo (Grupo I) após a HA. **Painel A** – histograma de amplitude de todos os pontos de um segmento de 10 segundos na condição de bloqueio sináptico (**Ai**) e na hipóxia aguda (**Aii**), para um neurônio representativo. O pico de cada histograma representa o RMP do neurônio. **Painel B** – distribuição dos valores médios do potencial de membrana em repouso (RMP) na condição do BS e após 2 min de HA (\*  $p < 0,05$ ); **Painel C** – distribuição dos valores médios da resistência de entrada (Rinput) na condição do BS e após 2 min de HA (n=6).

#### 4.2.1.2 Efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas ativas

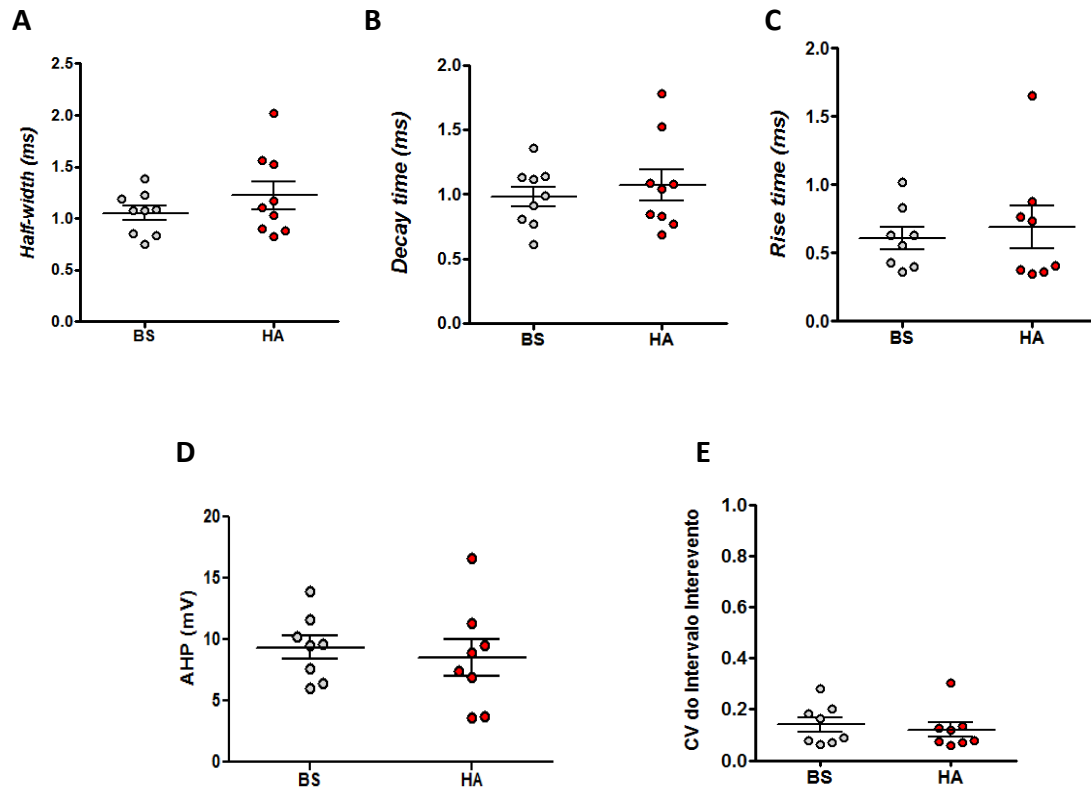
Uma vez que o protocolo de exposição por 2 min à HA promoveu o aumento da frequência intrínseca de disparos de PAs, analisamos quais foram os efeitos deste protocolo sobre as características do perfil do PA. Observamos que a HA reduziu a amplitude dos PAs [BS:  $86,57 \pm 3,3$  mV vs HA:  $78,84 \pm 4,3$  mV; (n=9); teste t pareado,  $p < 0.01$ ; painel B, figura 19] e a constante de tempo entre a hiperpolarização pós-potencial (AHP) e o limiar para a deflagração do próximo potencial de ação,  $\tau$  [BS:  $0,088 \pm 0,02$  ms vs HA:  $0,118 \pm 0,17$  ms, (n=9); teste t pareado,  $p < 0.01$ ; painel C, figura 19), modificando assim a cinética dos PAs.



**Figura 19: Painel A** — Amplitude média dos PAs antes (BS) e após a HA e **Painel B** — a constante de tempo entre a AHP e o limiar para a deflagração do próximo PA ( $\tau$ ) antes e após a HA.  $**P < 0,01$  — diferente em relação à condição experimental do bloqueio sináptico (BS).

As demais características ativas do perfil do PA não foram alteradas pela HA, tais como: *half-width* [BS:  $1,05 \pm 0,07$  ms vs HA:  $1,22 \pm 0,13$  ms, (n=9); teste t pareado,  $p > 0,05$ ]; *decay time* [BS:  $0,981 \pm 0,076$  ms vs HA:  $1,070 \pm 0,121$  ms, (n=9); teste t pareado,  $p > 0,05$ ]; *rise time* [BS:  $0,6048 \pm 0,80$  ms vs HA:  $0,6880 \pm 0,15$  ms, (n=9); teste t pareado,

$p > 0,05$ ]; *AHP* [BS:  $9,36 \pm 0,95$  mV vs HA:  $8,50 \pm 1,50$  mV, (n=9); teste *t* pareado,  $p > 0,05$ ] e o coeficiente de variação do intervalo interevento (CV) [BS:  $0,1405 \pm 0,027$  Hz vs HA:  $0,1205 \pm 0,028$  Hz, (n=9); teste *t* pareado,  $p > 0,05$ ].

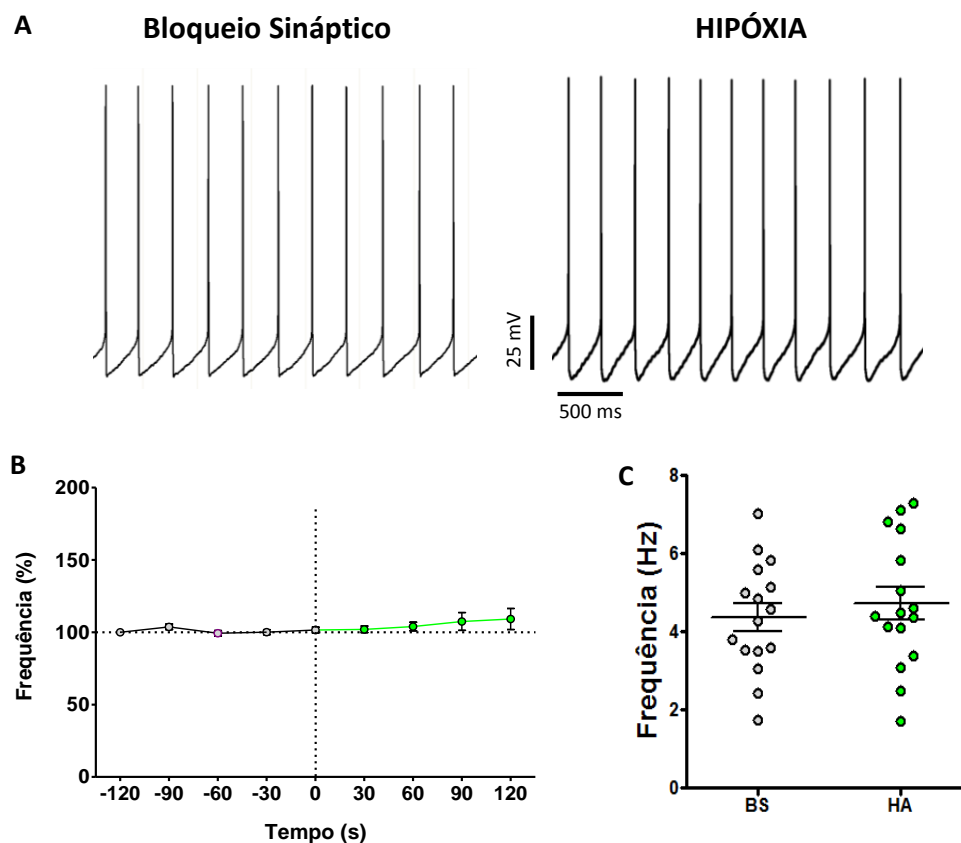


**Figura 20** – Efeitos da exposição de 2 min à HA sobre as propriedades ativas dos neurônios pré-simpáticos da RVLm do grupo I. **Painel A** - *Half-Width*; **Painel B** - *Decay time*; **Painel C** - *Rise time*; **Painel D** – Hiperpolarização pós-potencial (*AHP*) e **Painel E** - Coeficiente de variação do intervalo interevento médio dos PAs na situação bloqueio sináptico (BS) comparada com a HA.

#### *4.2.2 Efeitos da HA sobre as propriedades intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que não apresentaram alteração na frequência de disparos de PAs – Grupo II*

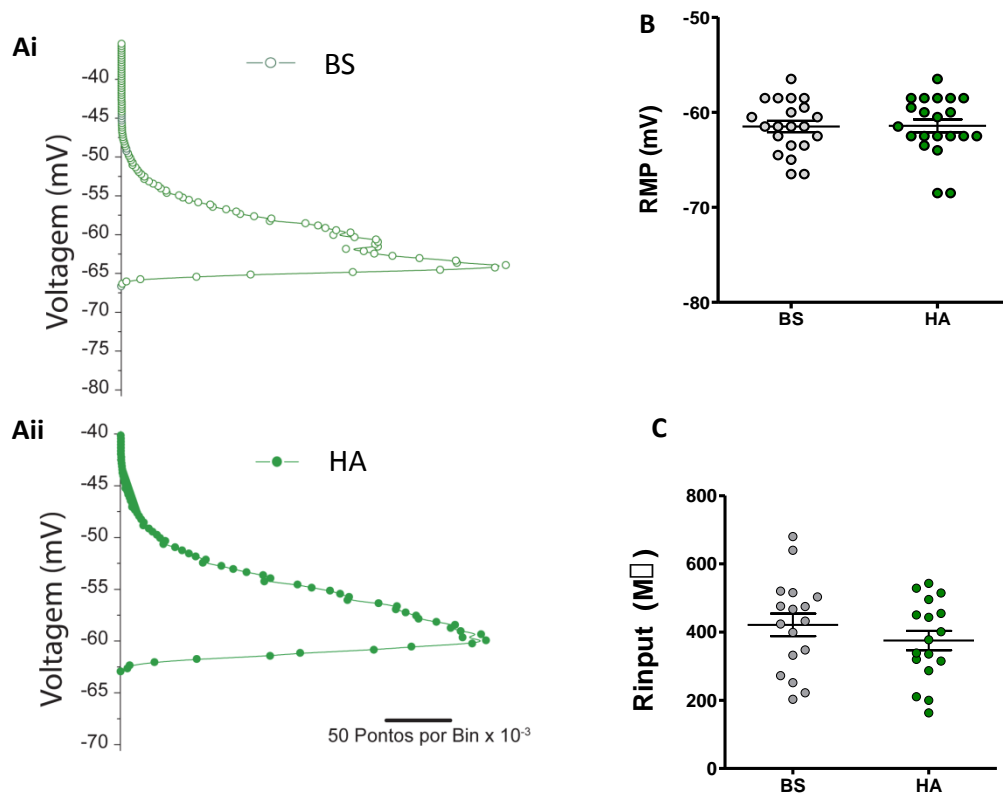
##### *4.2.2.1 Efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas passivas*

A maioria dos neurônios pré-simpáticos registrados (n=21) não apresentou alterações na frequência de disparo após a exposição à HA por 2 min (figura 20 A). Analisando o decurso temporal podemos observar que a frequência média de disparo de PAs normalizada não apresentou alteração significativa durante o bloqueio sináptico, bem como na HA (BS:  $101 \pm 2\%$  vs HA:  $109 \pm 7\%$ ;  $p > 0,05$ , teste ANOVA, seguido de Post-teste de Tukey;  $F_{1,188} = 1,875$ ) (figura 21 B). Em relação a frequência de disparos de PAs, a HA não promoveu alteração frequência média de disparos quando comparado com o seu respectivo controle (BS:  $4,80 \pm 0,5$  Hz vs HA:  $5,36 \pm 0,6$  Hz;  $p > 0,05$ , teste t pareado; figura 21 C).



**Figura 21:** Efeitos de 2 min de HA sobre a frequência intrínseca de disparo dos neurônios do grupo II na presença de bloqueadores sinápticos (n=21). **Painel A** – Traçado representativo do registro eletrofisiológico de um neurônio pré-simpático durante o BS e após 2 min de exposição à HA. **Painel B** – Decurso temporal dos valores normalizados da frequência de PAs a partir dos registros obtidos na condição de normóxia (BS) à esquerda do gráfico (em preto) e na condição da HA à direita (em verde). **Painel C** – distribuição dos valores médios da frequência intrínseca de disparos de PAs na condição do BS e após 2 min de HA (n=21).

Não foram observadas diferenças significativas em relação à RMP (BS:  $-61,5 \pm 0,6$  mV vs HA:  $-61,4 \pm 0,7$  mV;  $p > 0,05$ , teste t pareado) e  $R_{input}$  (BS:  $421 \pm 33$  M $\Omega$  vs HA:  $375 \pm 27$  M $\Omega$ ; n= 17;  $p > 0,05$ , teste t pareado) (Figura 22, painéis B e C, respectivamente) quando as duas condições experimentais foram comparadas.

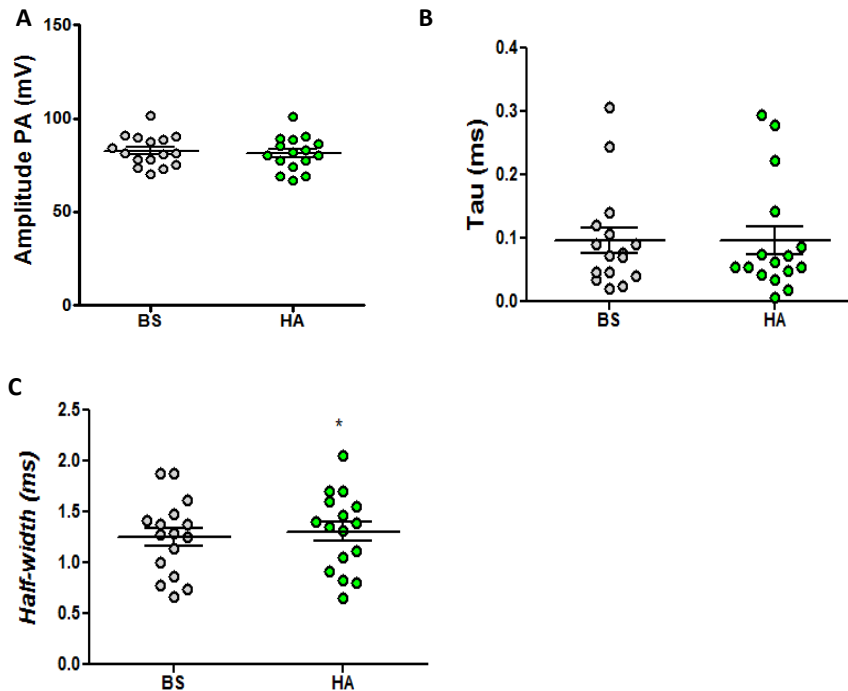


**Figura 22:** Efeitos da HA sobre as propriedades passivas dos neurônios pré-motores simpáticos da RVLM que não alteraram a frequência de disparo (Grupo II) após o estímulo HA. **Painel A** – histograma de amplitude de todos os pontos de um segmento de 10 segundos para um neurônio representativo, na condição de bloqueio sináptico (Ai) e na HA (Aii) . **Painel B** – distribuição dos valores médios do RMP na condição do BS e após 2 min de HA; e **Painel C** – distribuição dos valores médios da Rinut na condição do BS e após 2 min de HA (n=17).

#### 4.2.2.2 Efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas ativas

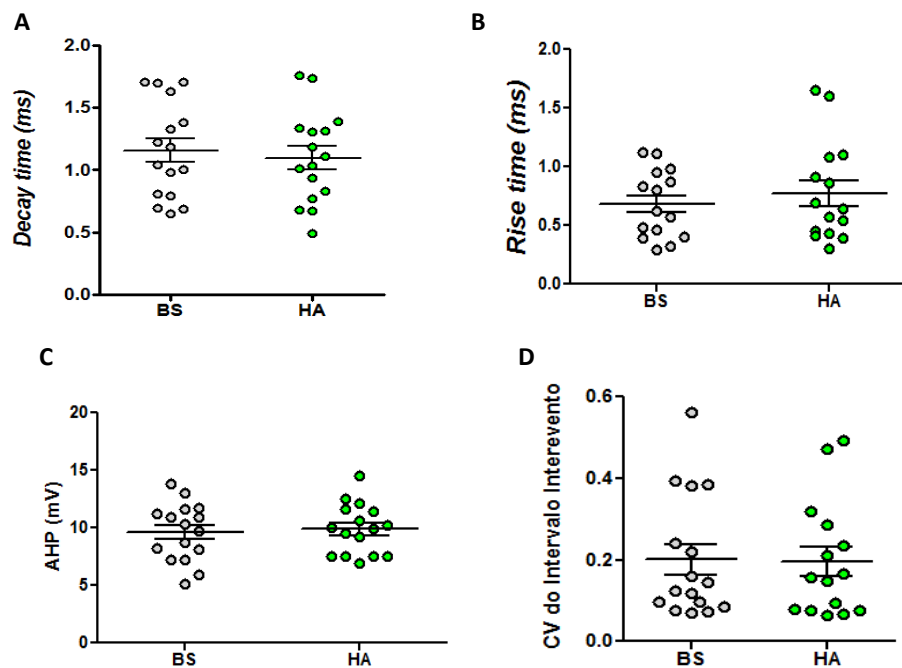
Assim como a frequência, as outras características ativas dos PAs também não foram afetadas pela HA, tais como: a amplitude [BS:  $82,7 \pm 2$  mV vs HA:  $81,2 \pm 2$  mV, (n=16); teste t pareado,  $p > 0,05$ ; (figura 23, painel A)] e a constante de tempo entre a

*AHP* e o limiar para a deflagração do próximo PA, *tau* [BS:  $0,096 \pm 0,02$  ms vs HA:  $0,097 \pm 0,02$  ms, (n=16); teste t pareado,  $p=0,9481$ ] (figura 23,painel B). No entanto, a HA aumentou a *half-width* nos neurônios pré-simpáticos [BS:  $1,25 \pm 0,09$  ms vs HA:  $1,31 \pm 0,09$  ms, (n=16); teste t pareado,  $p < 0,05$ ; (figura 23, painel C)].



**Figura 23:** Efeitos da exposição de 2 min à HA sobre as propriedades ativas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM do grupo II. **Painel A** - amplitude média dos PAs; **Painel B** - constante de tempo da membrana (Tau) e **Painel C** - *half-width* dos neurônios pré-simpáticos da RVLM. \* $P < 0,05$  – diferente em relação à condição experimental do bloqueio sináptico (BS).

As demais características ativas também não foram alteradas pela HA, tais como: *decay time* [BS:  $1,15 \pm 0,1$  ms vs HA:  $1,09 \pm 0,09$  ms, (n=16); teste t pareado,  $p < 0,05$ ]; *rise time* [BS:  $0,68 \pm 0,07$  ms vs HA:  $0,78 \pm 0,11$  ms, (n=16); teste t pareado,  $p < 0,05$ ]; *AHP* [BS:  $9,60 \pm 0,6$  mV vs HA:  $9,91 \pm 0,5$  mV, (n=16); teste t pareado,  $p < 0,05$ ] e o coeficiente de variação do intervalo interevento (CV) [BS:  $0,201 \pm 0,04$  Hz vs HA:  $0,195 \pm 0,04$  Hz, (n=16); teste t pareado,  $p < 0,05$ ].



**Figura 24:** Efeitos da exposição de 2 min à HA sobre as propriedades ativas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM do grupo II. **Painel A** - *decay time*. **Painel B** - *rise time*; **Painel C** - hiperpolarização pós-potencial (AHP) e **Painel D** - coeficiente de variação (CV) do intervalo interevento dos neurônios pré-simpáticos da RVLM, comparados com a condição de bloqueio sináptico (BS).

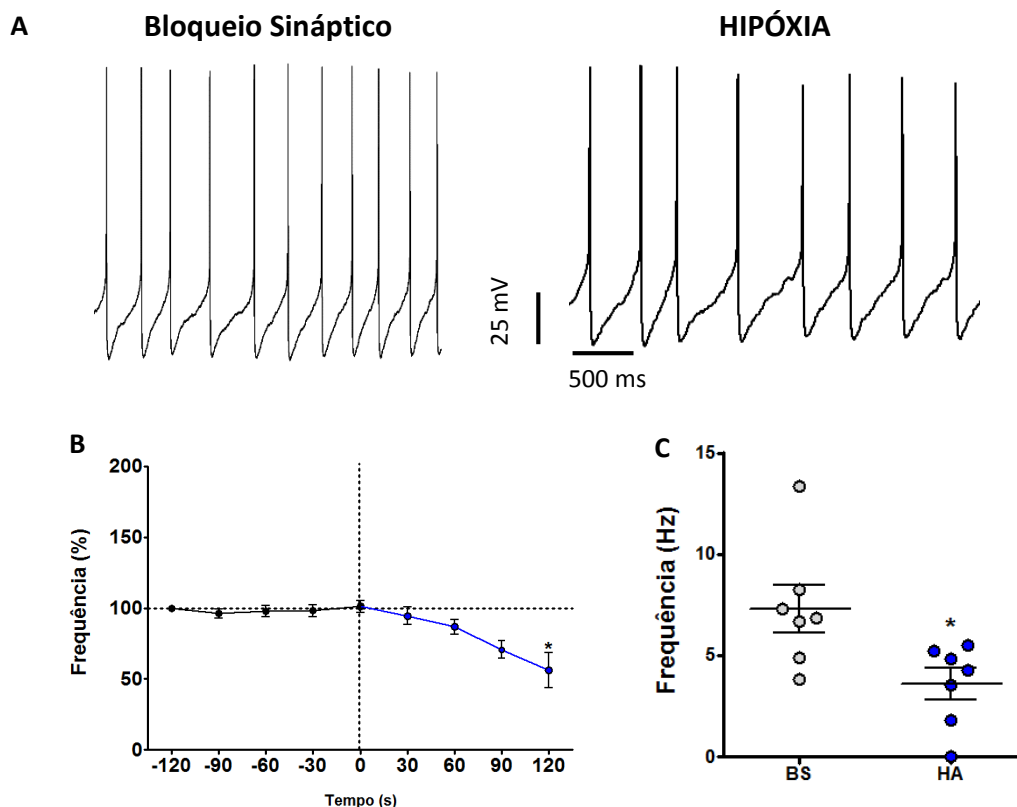
#### 4.2.3 Efeitos da HA sobre as propriedades intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que diminuíram a frequência de disparos de PAs – Grupo III

##### 4.2.3.1 Efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas passivas

Os neurônios pré-simpáticos da RVLM registrados e classificados neste grupo (n=7) apresentaram diminuição significativa na frequência normalizada de disparo após a exposição à HA por 2 min (figura 25). Analisando o decurso temporal podemos



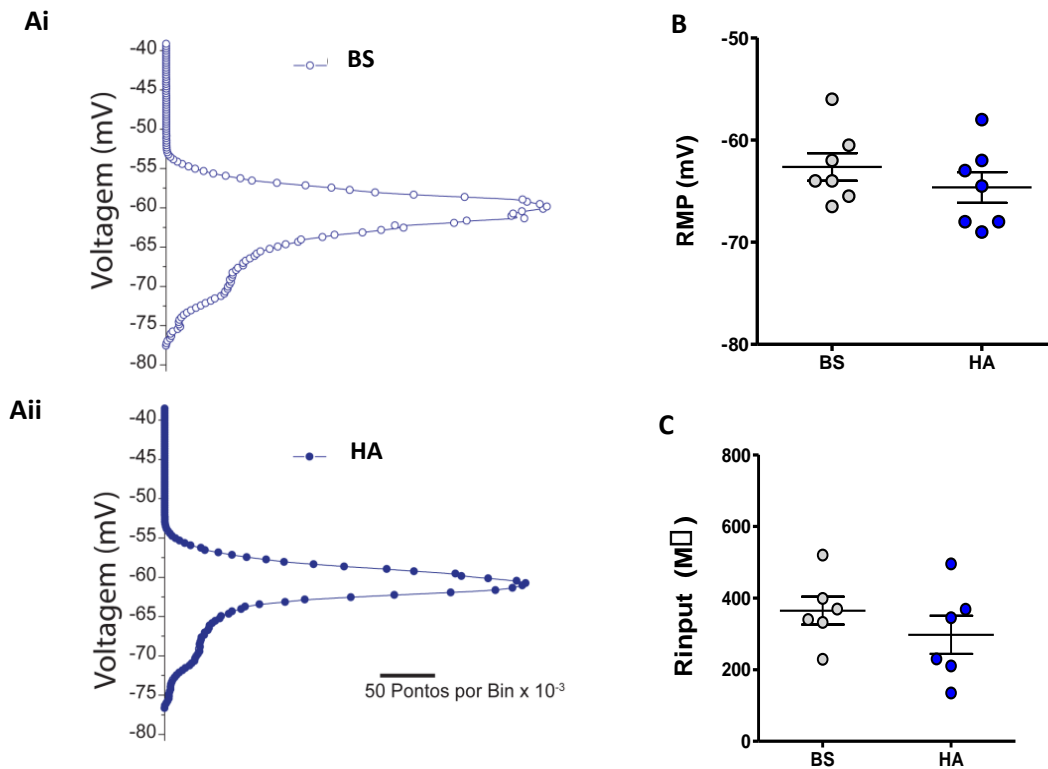
observar que a frequência média de disparos normalizada não apresentaram alterações significativas durante o bloqueio sináptico, porém ao final dos 2 min de exposição à HA a frequência foi significativamente menor (BS:  $101 \pm 4\%$  vs HA:  $56 \pm 12\%$ ;  $n=7$ ; \*  $p < 0,01$ , teste ANOVA, seguido de Post-teste de Tukey). Em relação à frequência de disparos de PAs, a HA promoveu uma diminuição significativa na frequência média de disparos quando comparado com o seu respectivo controle (BS:  $7,3 \pm 1,1$  Hz vs HA:  $3,6 \pm 0,7$  Hz;  $p < 0,05$ , teste t pareado; figura 25 C).



**Figura 25:** Efeitos de 2 min de exposição à HA sobre a frequência intrínseca de disparo dos neurônios do grupo III na presença de bloqueadores sinápticos (n=7). **Painel A** – Registro eletrofisiológico representativo de um neurônio registrado durante o bloqueio sináptico e após 2 min de HA. **Painel B** – Decurso temporal dos valores normalizados de frequência a partir dos registros obtidos na condição de normóxia (BS) à esquerda do gráfico (em preto) e na condição da HA à direita (em azul). (\*  $p < 0,05$ ). **Painel C** – distribuição dos valores médios da frequência intrínseca de disparos de PAs na condição do BS e após 2 min de HA (n=7).

A análise das propriedades eletrofisiológicas passivas intrínsecas de RMP e a Rinput dos neurônios classificados no grupo III mostrou que não há diferenças significativas em relação à RMP (BS:  $-62,6 \pm 1,3$  mV vs HA:  $-66,1 \pm 2,4$  mV;  $p > 0,05$ , teste  $t$  pareado) e à Rinput (BS:  $365 \pm 39$  M $\Omega$  vs HA:  $297 \pm 53$  M $\Omega$ ; n=6;  $p > 0,05$ , teste

*t* pareado) (Figura 26, painéis B e C respectivamente) quando as duas condições experimentais foram comparadas.

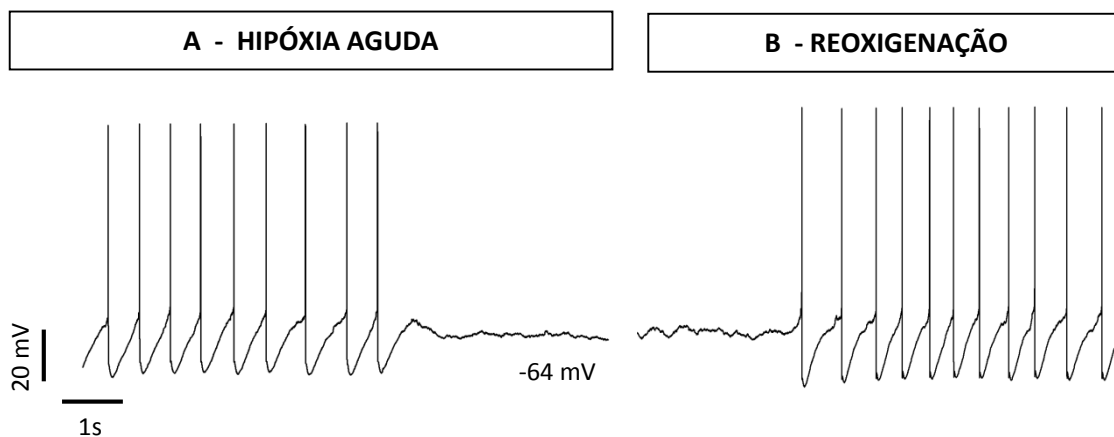


**Figura 26:** Efeitos da HA sobre as propriedades passivas dos neurônios pré-motores simpáticos da RVLM que diminuíram a frequência de disparo (Grupo III) após o estímulo HA. **Painel A** – Histograma de amplitude de todos os pontos de um segmento de 10 segundos para um neurônio representativo, na condição de BS (Ai) e na HA (Aii). **Painel B** – distribuição dos valores médios do potencial de membrana em repouso (RMP) na condição do BS e após 2 min de HA; **Painel C** – distribuição dos valores médios da resistência de entrada (Rinput) na condição do BS e após 2 min de HA (n=6).

Vale destacar que entre as células que apresentaram diminuição na frequência média de disparos, 1 das células registradas apresentou silenciamento no disparo de PAs após o desafio HA, como detalhado a seguir.

#### 4.2.3.2 – Neurônio pré-simpático que apresentou silenciamento na frequência de disparo após 2 min de HA

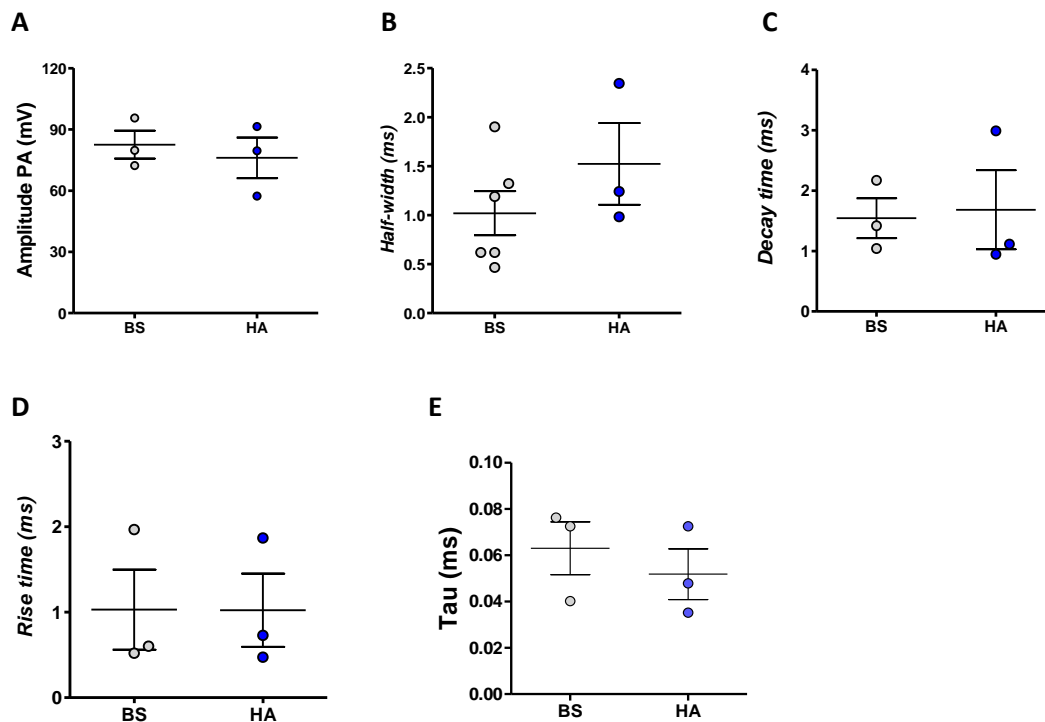
Analisando os neurônios pré-simpáticos que apresentaram diminuição na frequência de disparos após 2 min de HA, observamos o silenciamento de 1 neurônio como mostrado no registro eletrofisiológico representativo abaixo (figura 27). Verificamos primeiramente que ao final do desafio hipóxico, com o cessamento dos disparos de PAs essa célula apresentava potencial de membrana no valor de -64 mV. Durante o período de reoxigenação este neurônio retornou ao disparo de PAs, característico de auto-despolarização. Podemos sugerir que este neurônio poderia fazer parte de uma outra categoria além das 3 subpopulações que classificamos no presente trabalho e que poderão ser melhor investigadas em estudos adicionais com o aumento do número de neurônios registrados.



**Figura 27:** Registro eletrofisiológico representativo de um neurônio pré-simpático da RVLm que silenciou o disparo de PA após a exposição à HA durante 2 min. **Painel A** - o registro eletrofisiológico mostrando os disparos regulares de PA e o momento do silenciamento dos disparos sob o efeito da HA. **Painel B** - o registro eletrofisiológico do mesmo neurônio pré-simpático silente durante a reoxigenação e o retorno dos disparos de PAs.

#### 4.2.3.3 Efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas ativas

Após observarmos que a exposição à 2 min de desafio hipóxico diminuiu significativamente a frequência intrínseca de disparos dos neurônios pré-simpáticos da RVLM do grupo III [(BS:  $7,3 \pm 1,1$  Hz vs HA:  $3,6 \pm 0,7$  Hz;  $p < 0,05$ , teste t pareado], analisamos se a HA teria afetado alguma das características do PA. As características ativas dos PAs não foram afetadas pela HA, tais como: a amplitude [BS:  $82,57 \pm 6,86$  mV vs HA:  $76,10 \pm 9,98$  mV, (n=3); teste t pareado,  $p > 0,05$ ], a *half-width* [BS:  $1,02 \pm 0,22$  ms vs HA:  $1,52 \pm 0,48$  ms, (n= 3); teste t pareado,  $p > 0,05$ ]; o *decay time* [BS:  $1,54 \pm 0,33$  ms vs HA:  $1,68 \pm 0,65$  ms, (n=3); teste t pareado,  $p > 0,05$ ]; o *rise time* [BS:  $1,03 \pm 0,47$  ms vs HA:  $1,02 \pm 0,43$  ms, (n=3); teste t pareado,  $p > 0,05$ ] e *Tau* [BS:  $0,06 \pm 0,01$  ms vs HA:  $0,05 \pm 0,01$  ms, (n=3); teste t pareado,  $p > 0,05$ ] (figura 28).



**Figura 28:** Efeitos da exposição de 2 min à HA sobre as propriedades ativas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM do grupo III. **Painel A** – amplitude média dos PAs; **Painel B** – *half-width*; **Painel C** - *decay time*; **Painel D** - *rise time* e **Painel E** – *Tau*; comparados com a condição de bloqueio sináptico (BS).

#### ***4.3. Efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM de animais previamente submetidos à HCI***

Estudos anteriores do nosso laboratório realizados por Almado e cols. (2014) mostraram que neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos jovens adultos submetidos durante 10 dias ao protocolo de HCI não apresentam alterações na frequência intrínseca de disparos de PAs. Sabendo que o protocolo de HCI promove a ativação intermitente dos quimiorreceptores periféricos e das suas vias neurais, nos questionamos se o protocolo de exposição a 10 dias de HCI teria um efeito pré-condicionante para um

segundo desafio hipóxico. A questão colocada de forma objetiva foi a seguinte: as subpopulações de neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos jovens adultos do grupo controle reveladas pela HA seriam também observadas em animais previamente submetidos à HCI? Para respondermos a esse questionamento avaliamos os possíveis efeitos da prévia exposição de 10 dias à HCI sobre a frequência intrínseca de disparos de PAs e as propriedades eletrofisiológicas passivas e ativas dos neurônios pré-simpáticos quando submetidos a um protocolo de hipóxia tecidual aguda de 2 min.

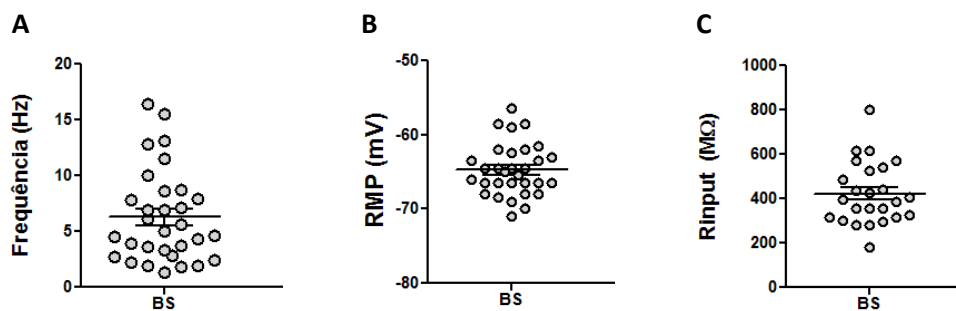
#### *4.3.1. Propriedades passivas dos neurônios pré-simpáticos do RVLM de animais submetidos à HCI*

Primeiramente comparamos os registros eletrofisiológicos em condições basais com a finalidade de avaliarmos se, sob as condições experimentais, a exposição à HCI promoveria alterações nas propriedades intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos de ratos jovens adultos (P35). Para a realização deste experimento, utilizamos animais que foram submetidos ao protocolo de HCI (10 dias) conforme descrito na metodologia. Os registros eletrofisiológicos dos neurônios pré-simpáticos bulboespinais das fatias do tronco cerebral foram realizados nas mesmas condições daquelas utilizadas para os animais do grupo controle.

Obtivemos os registros eletrofisiológicos de 31 neurônios pré-simpáticos bulboespinais da RVLM de ratos que foram submetidos à HCI e verificamos que todos os neurônios registrados apresentaram atividade intrínseca de marca-passo. Estes resultados estão de acordo com os estudos prévios de nosso laboratório feitos em ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de HCI (Almado *et al.*, 2014) utilizando a técnica de *whole-cell*

*patch-clamp* em fatias do tronco cerebral de ratos jovens adultos e a preparação coração-troncos cerebral isolados (Moraes *et al.*, 2013).

Analizamos as características eletrofisiológicas passivas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM em fatias do tronco cerebral de ratos previamente submetidos à HCI registrados na presença dos bloqueadores sinápticos ionotrópicos e obtivemos a frequência média intrínseca de disparo de PAs de  $6,31 \pm 0,7$  Hz (n=31), o potencial de membrana em repouso de  $-64,7 \pm 0,6$  mV (n=31); e resistência de entrada de  $423 \pm 27$  M $\Omega$ , (n=25) mostrados na figura 29 (painéis A, B e C respectivamente).



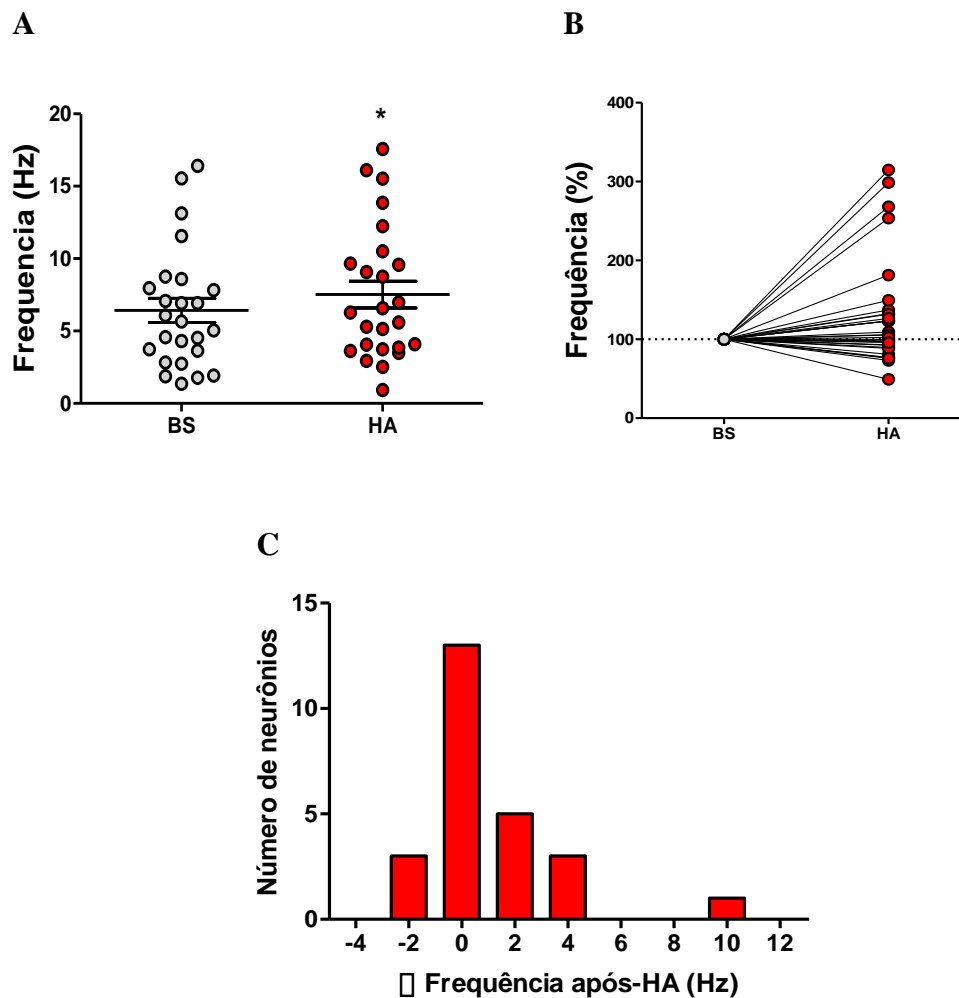
**Figura 29:** Painel A: Distribuição da frequência de disparo dos 31 neurônios pré-simpáticos da RVLM dos animais previamente submetidos à HCI, após o bloqueio sináptico. Painel B: Distribuição dos valores do potencial de membrana em repouso (RMP) (n=31) e Painel C: Distribuição dos valores da resistência de entrada da membrana (Rinput) após o bloqueio sináptico (n=25).

Após o registro eletrofisiológico na presença dos bloqueadores sinápticos, os 31 neurônios pré-simpáticos também foram submetidos ao protocolo de HA durante 2 min. Observamos que após a exposição à HA, os valores médios absolutos da frequência intrínseca de disparos de PAs dos neurônios pré-simpáticos foi significativamente aumentada (BS:  $6,31 \pm 0,7$  Hz vs HA:  $7,25 \pm 0,8$  Hz;  $p < 0,05$ , teste *t*; n=31; figura 30,



painel A). Utilizando o mesmo critério para a normalização da frequência de disparos realizada nos estudos referentes aos animais do grupo controle (item 4.1) descritos anteriormente, normalizamos a frequência de disparos para cada célula com a finalidade de observar a possível existência das 3 subpopulações de neurônios pré-simpáticos reveladas pela HA em animais previamente submetidos à HCI.

O painel B da figura 30 mostra os resultados referentes à normalização da frequência intrínseca de disparo dos neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos jovens previamente submetidos à HCI, após o registro na presença do bloqueio sináptico (BS) e após a exposição por 2 min à HA. A variação da frequência de disparos de PAs foi calculada pela diferença dos valores absolutos após a HA e o BS ( $\Delta$ ), com distribuição assimétrica com cauda à direita (teste de Skewness positivo, com valor de 2,358), os quais estão mostrados no painel C da figura 30.



**Figura 30: Painel A** - Distribuição da frequência média de disparo de PAs após o bloqueio sináptico (BS) e após a exposição de 2 min à HA (\*  $p < 0,05$ , quando comparado com o protocolo de BS;  $n=31$ ). **Painel B** – Distribuição da frequência normalizada de disparo de PAs dos neurônios pré-simpáticos da RVLm de animais que foram previamente submetidos à HCI. **Painel C** – Valores médios da variação da frequência de disparos de PAs ( $\Delta$ ) após a HA.

Após a normalização da frequência de disparo como mostrado no painel B da figura 30, classificamos os neurônios registrados quanto à possível subpopulação utilizando os mesmos critérios de classificação utilizados para os neurônios registrados no grupo controle, o qual levou em consideração o valor absoluto da frequência de

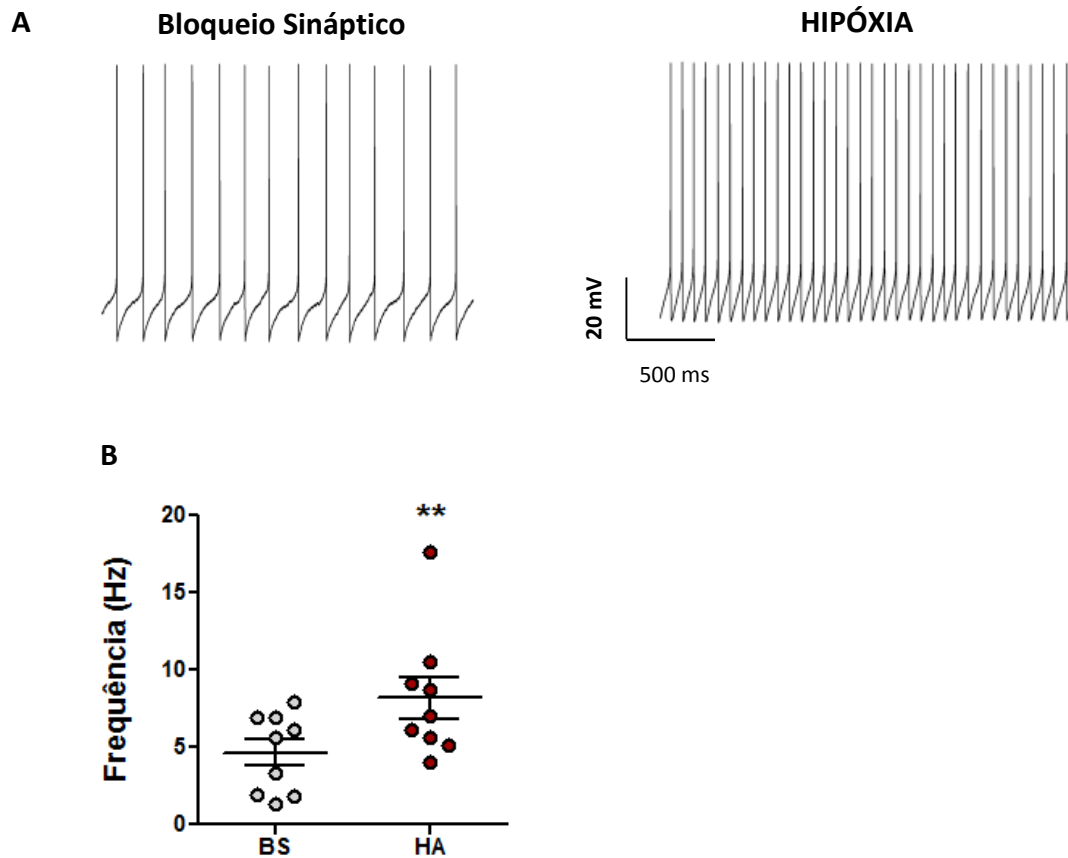
disparos de PAs  $\pm$  2DPM. Após analisarmos a frequência de disparo antes e após o desafio da HA por 2 min dos 31 neurônios pré-simpáticos registrados do grupo HCI, obtivemos a seguinte distribuição:

- 1) Grupo I: 9 neurônios apresentaram aumento médio de 205 % na frequência de disparo após a HA.
- 2) Grupo II: 22 neurônios não apresentaram alterações na frequência de disparo.

Com base nesta distribuição, o primeiro achado que nos chamou a atenção foi que entre os 31 neurônios registrados não observamos nenhum neurônio que apresentasse diminuição significativa na frequência intrínseca de disparos e que pudesse ser classificado no grupo III. A partir da classificação de 2 subpopulações de neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos previamente submetidos à HCI, analisamos as características eletrofisiológicas passivas e ativas de cada subpopulação por ora observada neste protocolo experimental.

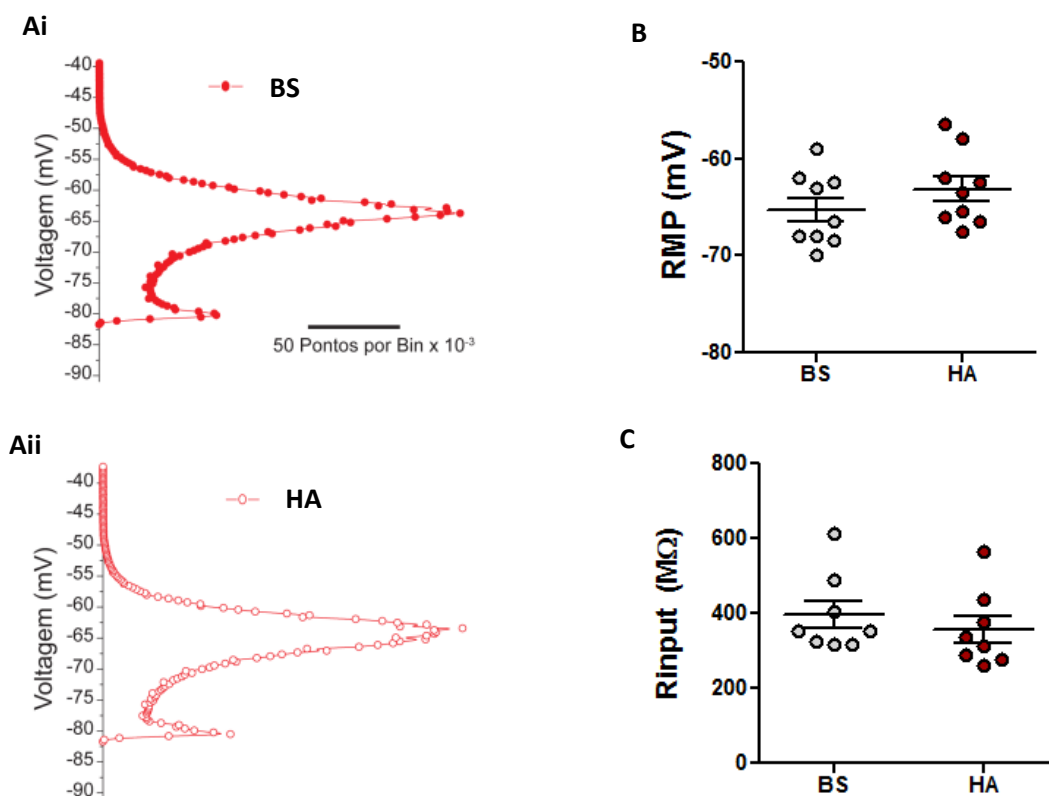
*4.3.1.1 – Análise das características eletrofisiológicas passivas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM de animais previamente submetidos à HCI classificados no grupo I após o protocolo de 2 min de HA.*

Observamos primeiramente que esses neurônios apresentaram uma frequência média de disparos basal de  $4,66 \pm 0,85$  Hz e que a HA aumentou significativamente a frequência média de disparos dos neurônios classificados neste grupo (BS:  $4,7 \pm 0,8$  Hz vs HA:  $8,2 \pm 1,4$  Hz, teste t pareado,  $**p < 0,01$ ,  $n=9$ ; painel A, figura 31).



**Figura 31:** Efeitos da HA sobre a frequência intrínseca de disparos de PAs dos neurônios pré-simpáticos da RVLM dos animais previamente submetidos à HCI classificados no grupo I. **Painel A** – Traçado representativo do registro eletrofisiológico de um neurônio pré-simpático durante o bloqueio sináptico e após 2 min de exposição à HA. **Painel B:** Distribuição da frequência de disparos (n=9); \*  $p < 0.05$ , teste  $t$  pareado.

A HA não alterou o potencial de membrana em repouso (BS=  $-63 \pm 0,8$  mV vs. HA=  $-62,5 \pm 0,5$  mV, teste  $t$  pareado,  $p > 0,05$ ; painel B, figura 31) e a Rinput (BS=  $396 \pm 37$  M $\Omega$  vs. HA=  $357 \pm 36$  M $\Omega$ , teste  $t$  pareado,  $p > 0,05$ , n=8; painel C, figura 32).



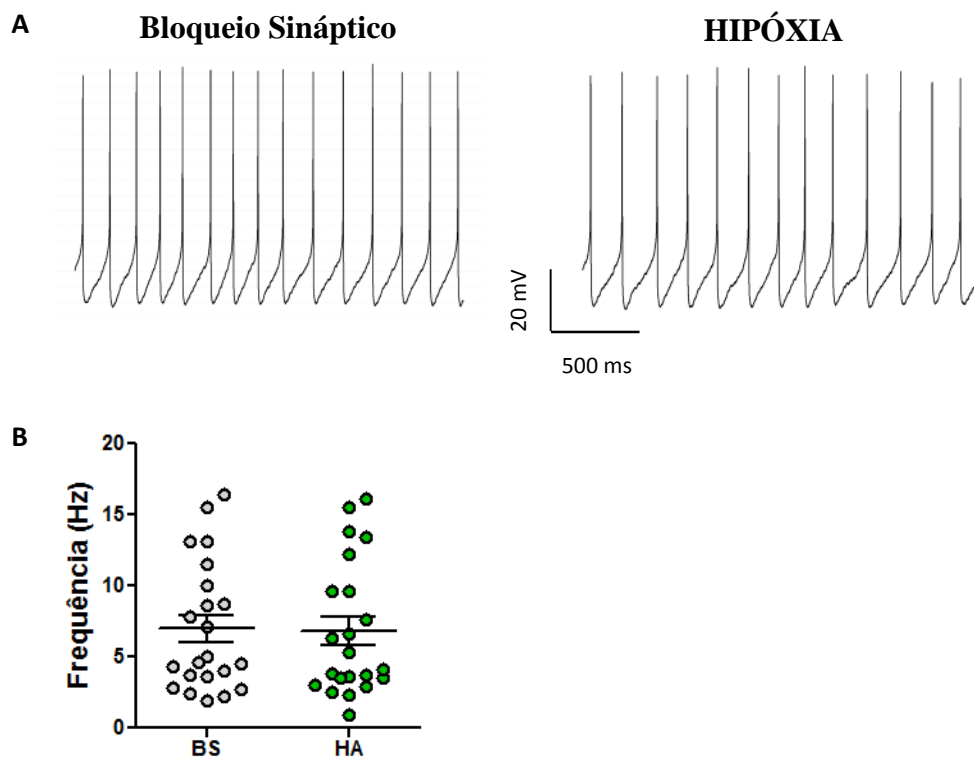
**Figura 32:** Efeitos da HA sobre as propriedades eletrofisiológicas passivas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que aumentaram a frequência de disparo (Grupo I) após a HA. **Painel A** – histograma de amplitude de todos os pontos de um segmento de 10 segundos na condição de bloqueio sináptico (**Ai**) e na hipóxia aguda (**Aii**), para um neurônio representativo. O pico de cada histograma representa o RMP do neurônio. **Painel B** – distribuição dos valores médios do potencial de membrana em repouso (RMP) na condição do BS e após 2 min de HA; **Painel C** – distribuição dos valores médios da resistência de entrada (Rinput) na condição do BS e após 2 min de HA.

Como mostrado nos resultados acima descritos, a exposição a 2 min de HA aumentou significativamente a frequência intrínseca de disparos de PAs sem afetar o

RMP e a Rinput da análise das propriedades passivas dos neurônios pré-simpáticos dos animais previamente expostos à HCI classificados no grupo I.

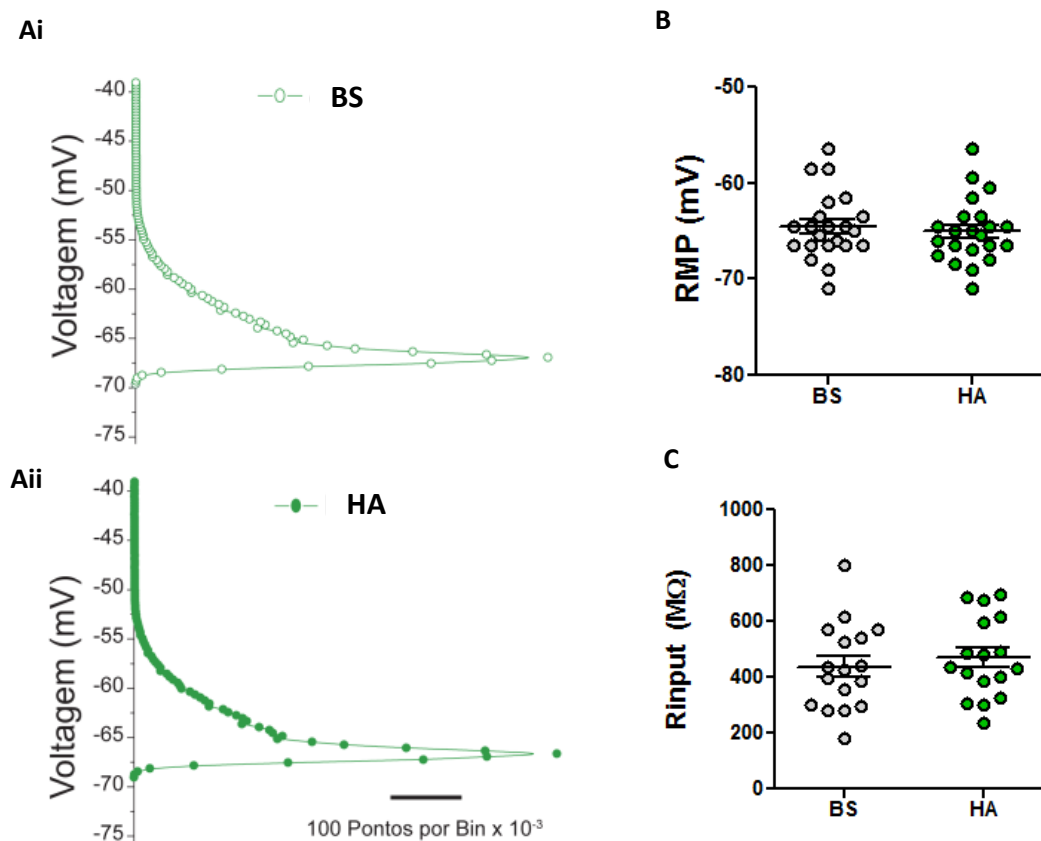
*4.3.1.2 – Análise das características eletrofisiológicas passivas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM de animais previamente submetidos à HCI classificados no grupo II após o protocolo de 2 min de HA*

A maioria dos neurônios pré-simpáticos de animais previamente submetidos à HCI não alterou a frequência intrínseca média de disparos após serem submetidos à 2 min de HA (BS:  $7,0 \pm 1,0$  Hz vs HA:  $6,8 \pm 1,0$  Hz, teste t pareado,  $p > 0,05$ , n=22).



**Figura 33:** Efeitos da HA sobre a frequência intrínseca de disparos de PAs e as propriedades passivas de membrana dos neurônios pré-simpáticos da RVLN dos animais previamente submetidos à HCI classificados no grupo II. **Painel A:** Distribuição da frequência de disparos (n=22). **Painel B:** distribuição do potencial de repouso da membrana (RMP) (n=22). **Painel C:** distribuição dos valores da resistência de entrada da membrana ( $R_{input}$ ) (n=17), na condição bloqueio sináptico (BS) após 2 min de HA.

Além disso, as propriedades passivas não foram alteradas pela HA: potencial de membrana em repouso (BS=  $-64,50 \pm 0,74$  mV vs. HA=  $-65,02 \pm 0,71$  mV, teste *t* pareado,  $p=0,2638$ , n=22; painel B, figura 31) e a  $R_{input}$  (BS=  $435,9 \pm 37,5$  M $\Omega$  vs. HA=  $469 \pm 34,6$  M $\Omega$ , teste *t* pareado,  $p>0,05$ , n=17; painel C, figura 34).



**Figura 34:** Efeitos da HA sobre as propriedades passivas dos neurônios pré-motores simpáticos da RVLM que não alteraram a frequência de disparo (Grupo II) após o estímulo HA. **Painel A** – histograma de amplitude de todos os pontos de um segmento de 10 segundos para um neurônio representativo, na condição de bloqueio sináptico (**Ai**) e na HA (**Aii**). **Painel B** – distribuição dos valores médios do RMP na condição do BS e após 2 min de HA; e **Painel C** – distribuição dos valores médios da Rin na condição do BS e após 2 min de HA.

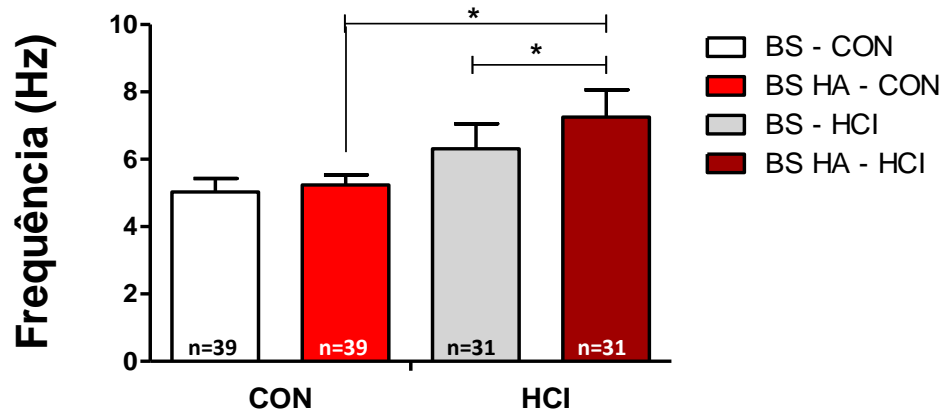
Após a caracterização dos diferentes padrões de respostas observadas dos neurônios pré-simpáticos à exposição de 2 min à HA, passamos a considerar a possibilidade de que essas diferentes subpopulações de neurônios apresentariam características neuroquímicas distintas que compõem o fenótipo da célula e portanto passamos a realizar estudos com vistas à caracterização imunohistoquímica desses neurônios, como será descrito a seguir (item 4.5).



#### ***4.4. Comparação dos efeitos da HA sobre a frequência intrínseca de disparos de PAs dos neurônios pré-simpáticos dos animais do grupo controle e HCI***

Em virtude dos resultados descritos anteriormente, realizamos a comparação da frequência intrínseca média de disparos de PAs de todos os neurônios pré-simpáticos dos animais do grupo controle (n= 39) e HCI (n= 31) registrados e incluídos nas análises anteriores de classificação nos grupos I, II e III, com o objetivo de avaliar um possível efeito pré-condicionante da HCI sobre as respostas eletrofisiológicas desses neurônios quando expostas a uma nova situação de HA.

Primeiramente avaliamos se a HCI promoveria algum efeito sobre a frequência intrínseca de disparos de PAs sob o efeito dos bloqueadores sinápticos. Podemos observar que não houve diferença significativa na frequência de disparos basal dos animais do grupo controle quando comparado com o grupo HCI [Controle:  $5,03 \pm 0,4$  Hz, (n=39) vs. HCI:  $6,3 \pm 0,7$  Hz, (n=31); teste Mann Whitney,  $p > 0,05$ ; figura 35]. Uma vez que a HCI não alterou a frequência intrínseca de disparos basal, avaliamos se uma exposição à HA promoveria alterações na frequência intrínseca de disparos. Nossos resultados mostram que os neurônios pré-simpáticos de animais previamente expostos à HCI apresentaram uma elevação significativa na frequência de disparos após a HA [Controle:  $5,24 \pm 0,3$  Hz, (n=39) vs. HCI:  $7,25 \pm 0,8$  Hz, (n=31); teste  $t$ ,  $p < 0,05$ ; figura 32].



**Figura 35** – Comparação dos dados agrupados apresentados nos painéis A e B para comparação do efeito da HA do grupo controle em relação ao grupo HCI e da condição BS e a do grupo HCI (Teste ANOVA, \*  $p < 0,05$ ;  $F_{1,138} = 2.09$ ).

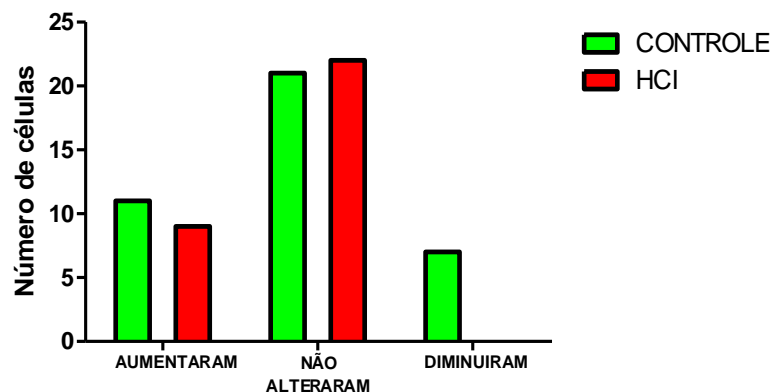
Esses achados sugerem que a HCI teria um efeito pré-condicionante sobre a frequência intrínseca de disparos de PAs induzindo um aumento na excitabilidade dos neurônios pré-simpáticos da RVLM quando submetidos à um segundo desafio hipóxico. No entanto, ao compararmos a distribuição do número de neurônios pré-simpáticos classificados em cada subpopulação reveladas pela HA (tabela 1), observamos que foram registrados 21 neurônios que não alteraram a frequência média de disparos dentro de um conjunto total de 39 células registradas do grupo controle. No entanto, no grupo HCI foram registrados 22 neurônios pré-simpáticos que não tiveram a frequência média de disparos afetadas pela HA dentre as 31 células registradas.

**Tabela 1** – Distribuição do número de neurônios pré-simpáticos classificados em cada uma das subpopulações reveladas pela HA do grupo controle e HCI.

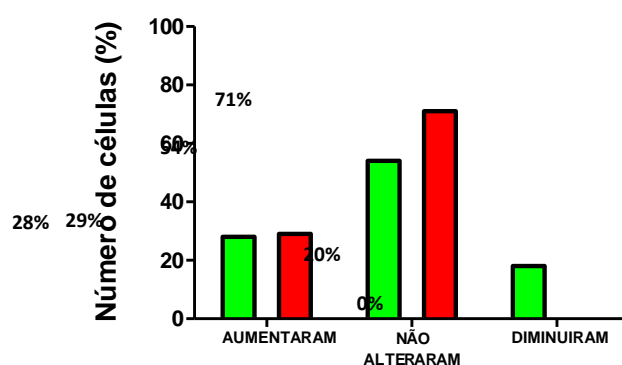
GRUPO CONTROLE (n=39)		GRUPO HCI (n=31)	
	Número de neurônios		Número de neurônios
AUMENTARAM A FREQUÊNCIA	11	AUMENTARAM A FREQUÊNCIA	9
NÃO ALTERARAM A FREQUÊNCIA	21	NÃO ALTERARAM A FREQUÊNCIA	22
DIMINUIRAM A FREQUÊNCIA	7	DIMINUIRAM A FREQUÊNCIA	0

Para melhor observarmos os efeitos pré-condicionantes da HCI, realizamos a distribuição da porcentagem do número de células registradas no grupo controle e HCI em relação à cada subpopulação revelada pela HA, conforme mostrado na figura 36. A comparação da porcentagem do número de neurônios pré-simpáticos registrados que aumentaram a frequência de disparos após a HA foi semelhante entre os dois grupos (CON 28 %, n = 11 vs HCI 29%, n=9) enquanto que o número de neurônios pré-simpáticos que não alteraram a frequência de disparos foi maior no grupo HCI quando comparado com o grupo controle (CON 54%, n= 21 vs HCI 71%, n=22).

Ai



Aii



**Figura 36** – Comparação da proporção de neurônios pré-simpáticos do grupo controle e HCI classificados conforme a frequência de disparos após a exposição de 2 min à HÁ em valores absolutos (Ai) e porcentagem relativa ao número total de neurônios registrados no grupo controle e HCI (Aii).

Essas análises nos permitem sugerir que o número de neurônios pré-simpáticos do grupo HCI que não alteraram a frequência de disparos após a HA é maior quando comparada com o grupo controle, indicando assim um efeito pré-condicionante da HCI. Ainda que a frequência média de disparos dos neurônios pré-simpáticos do grupo HCI após a HA seja maior quando comparada com o grupo controle, não registramos neurônios que diminuíram a frequência de disparos no grupo HCI, sugerindo então que este seria mais um efeito do pré-condicionamento pela HCI.

#### ***4.5. Caracterização imunohistoquímica dos neurônios pré-simpáticos de animais do grupo controle***

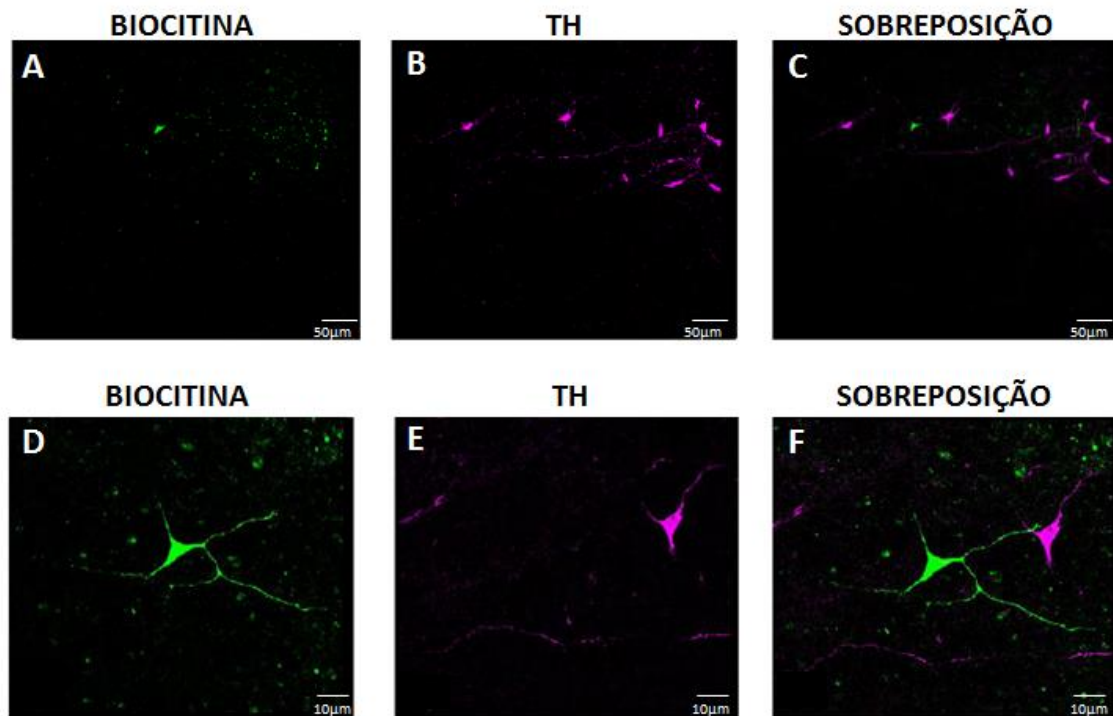
Os neurônios pré-simpáticos que estão localizados na RVLM podem ser fenotipicamente identificados por dois tipos de células as quais apresentam os seguintes fenótipos: *i*) neurônios imunorreativos para a tirosina hidroxilase (TH), os quais são caracterizados como sendo neurônios C1 adrenérgicos e *ii*) neurônios não-adrenérgicos (não-C1), as quais não apresentam a TH, enzima responsável pela biossíntese de noradrenalina (Morrison *et al.*, 1988; Sun *et al.*, 1988; Stornetta *et al.*, 1999; Stornetta *et al.*, 2002), mas que sintetizam e liberam o aminoácido excitatório L-glutamato nas suas terminações sinápticas.

Para essa abordagem experimental, utilizamos a biocitina (0,3%) na solução interna da pipeta de registro, a qual se difundiu para o meio intracelular. Após o término dos registros eletrofisiológico, que tiveram duração de aproximadamente 35 min, a pipeta de registro foi cuidadosamente retirada, as fatias foram processadas como descrito na metodologia e posteriormente visualizadas e analisadas num microscópio de varredura confocal (Leica TCS SP5).

Apresentamos a seguir as fotomicrografias da imunofluorescência de 1 neurônio representativo de cada uma das 3 subpopulações reveladas eletrofisiologicamente pela exposição à HA. Devido às dificuldades inerentes à realização desses procedimentos, seja na retirada da pipeta de registro ou no processamento das fatias para a imunofluorescência, conseguimos as fotomicrografias de 11 dos 39 neurônios registrados.

*4.5.1 Caracterização imunohistoquímica dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que apresentaram aumento na frequência de disparos de PAs – Grupo I*

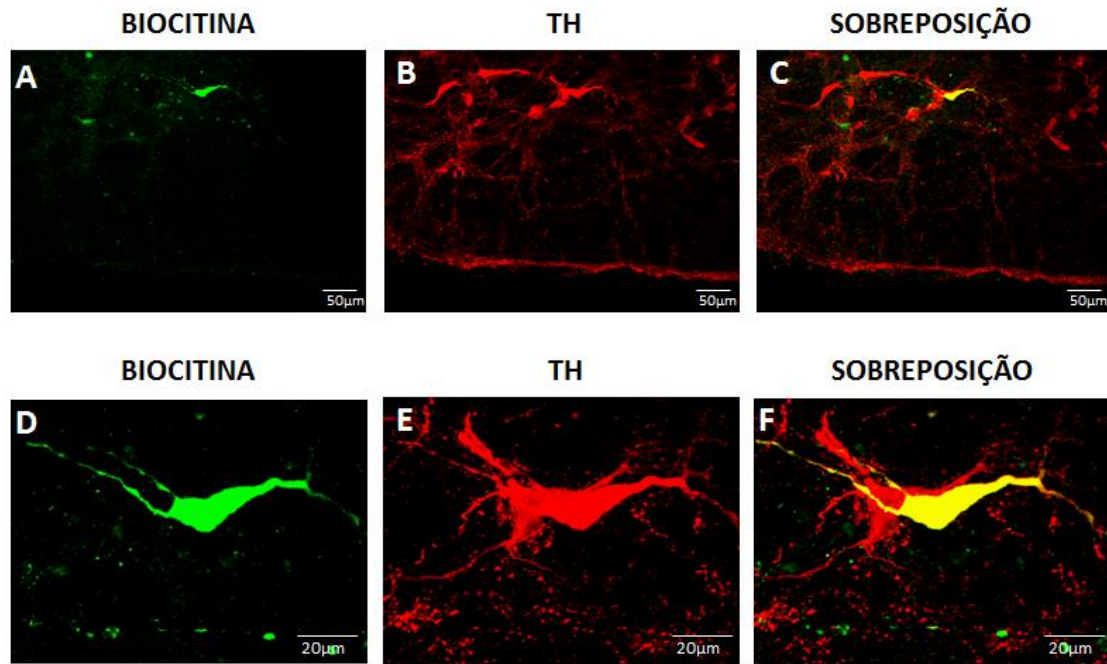
Com o intuito de identificar a possível correlação entre o aumento da frequência de disparos de PAs após a HA com o fenótipo dos 11 neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos do grupo controle, conseguimos as fotomicrografias de 4 desses neurônios. Podemos observar após as análises das fotomicrografias que esta subpopulação revelada pela HA apresentou tanto neurônios não adrenérgicos (não-C1; n=1) quanto adrenérgicos (C1; n=3). Na fotomicrografia obtida com aumento de 20x, podemos observar no painel A da figura 37 o neurônio registrado revelado com a biocitina (em verde) enquanto que no painel B, os neurônios TH (em rosa) apresentam-se distribuídos na superfície ventral. No painel C, a sobreposição das imagens mostra que não há co-localização do neurônio registrado com os neurônios TH, ou seja, este neurônio registrado que apresentou aumento na frequência intrínseca de disparo após a HA era não-catecolaminérgico. Os painéis D, E e F da figura 37 representam a fotomicrografia correspondente aos painéis A, B e C obtidas com objetiva de imersão em óleo de 63x.



**Figura 37** – Fotomicrografia de varredura confocal representativa de um corte coronal do tronco cerebral contendo um neurônio pré-simpático não-adrenérgico da RVLN que aumentou a frequência de disparos em resposta à HA. Com objetiva de 20 x: **Painel A** - neurônio registrado marcado pela biocitina (verde); **Painel B** - neurônios tirosina hidroxilase (rosa) e **Painel C** - a sobreposição das imagens mostrando a localização do neurônio registrado e os neurônios C1 adrenérgicos. Com objetiva de 63 x: **Painel D** - neurônio registrado e seus prolongamentos preenchidos pela biocitina (verde); **Painel E** – neurônio tirosina hidroxilase (rosa) e **Painel F** – a sobreposição das imagens nos mostra a localização do neurônio revelado pela biocitina (em verde) e o neurônio C1 adrenérgico (em rosa).

A figura 38 mostra a fotomicrografia de um neurônio pré-simpático representativo do grupo que aumentou a frequência de disparos de PAs após a exposição a 2 min à HA e que após o registro eletrofisiológico a fatia foi processada para a marcação imunohistoquímica. Utilizando a microscopia confocal e objetiva 20x, observamos no painel A o neurônio registrado revelado pela biocitina (em verde). No painel B, os neurônios com marcação positiva para TH e no painel C a sobreposição das imagens mostrando que o neurônio registrado, que aumentou a frequência de disparo em resposta ao desafio hipóxico era C1 adrenérgico. Os painéis D, E e F da figura 38 representam a fotomicrografia correspondente aos painéis A, B e C obtidas com objetiva de imersão em óleo de 63x. A análise das imagens reveladas pela microscopia confocal de fluorescência indicam que a subpopulação de neurônios pré-simpáticos que aumentaram frequência de disparos de PAs em resposta a exposição durante 2 min à HA é composta tanto por neurônios adrenérgicos quanto por neurônios não-adrenérgicos.



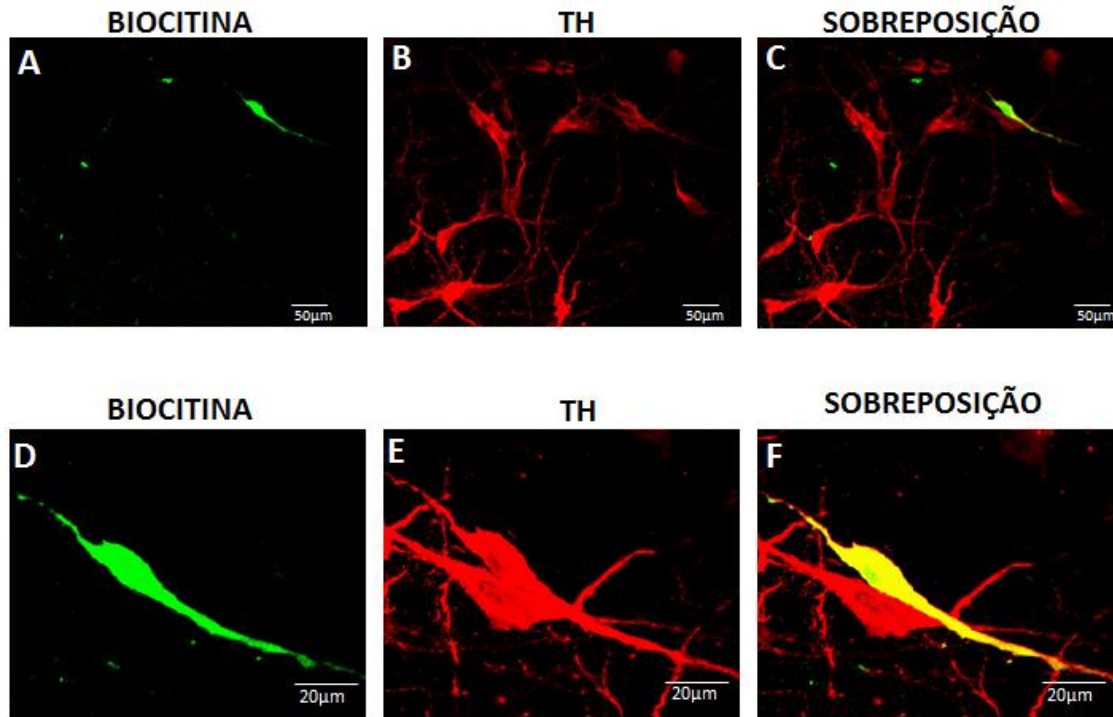


**Figura 38 – Fotomicrografia de varredura confocal representativa de um corte coronal do tronco cerebral contendo um neurônio pré-simpático C1 adrenérgico da RVLM que aumentou a frequência de disparos em resposta à HA. Com objetiva de 20x: Painel A - neurônio registrado marcado pela biocitina (verde); Painel B - neurônios com marcação positiva para TH (vermelho) e Painel C - a sobreposição das imagens mostrando a co-localização do neurônio registrado com o neurônio TH positivo (amarelo). Com objetiva de 63x: Painel D - neurônio registrado e seus prolongamentos preenchidos pela biocitina (verde); Painel E – neurônio TH positivo (vermelho) e Painel F – a sobreposição das imagens mostrando a co-localização da marcação com a biocitina e a TH (em amarelo).**

#### *4.5.2 Caracterização imunohistoquímica dos neurônios pré- simpáticos da RVLM que não alteraram a frequência de disparos de PAs após a HA – Grupo II*

Avaliamos também as imagens obtidas pela imunofluorescência de 4 neurônios pré-simpáticos da RVLM que não alteraram a frequência de disparo após a exposição à 2 min de HA de um total de 21 neurônios classificados neste grupo. Observamos que esses 4 neurônios apresentaram marcação positiva para a TH, ou seja, são neurônios C1 adrenérgicos.

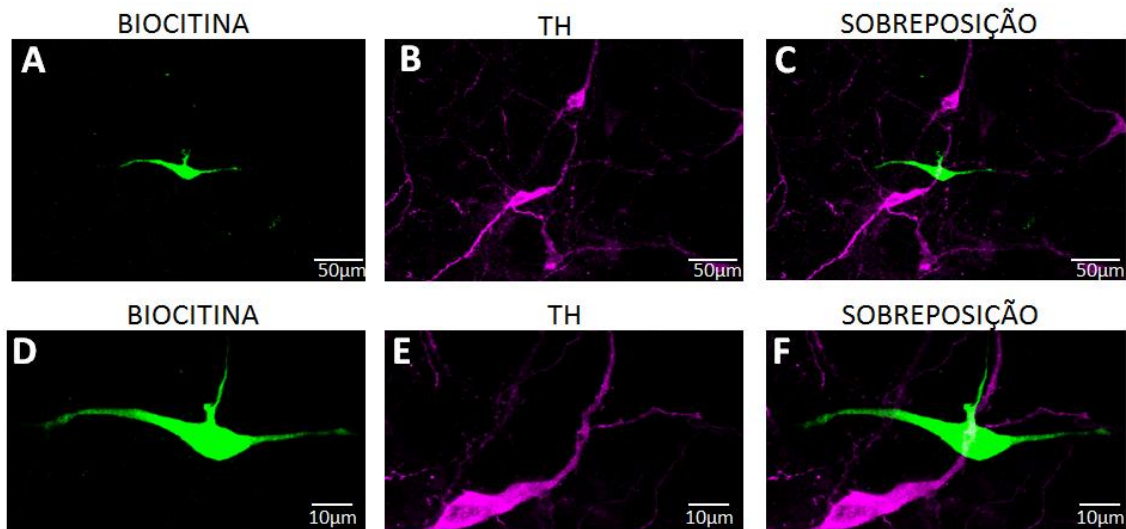
Utilizando objetiva de menor aumento (20x), os painéis A, B e C da Figura 39 apresentam fotomicrografias representativas de um neurônio pré-simpático registrado que não alterou a frequência de disparo após o desafio HA. O painel A, mostra o neurônio registrado revelado pela biocitina (em verde); no Painel B os neurônios com marcação positiva para TH; e a sobreposição das imagens capturadas e mostrada no painel C. A confirmação da co-localização do neurônio registrado com a marcação positiva da TH é visualizada pela coloração amarela no corpo celular do neurônio registrado indicando que este neurônio é C1 adrenérgico. Com a objetiva de 63x, de imersão em óleo, para a captura das imagens mostradas nos painéis D, E e F (figura 39) do mesmo neurônio, podemos observar com maior detalhamento os prolongamentos do neurônio registrado e revelado pela biocitina (em verde no painel D), os neurônios com marcação positiva para TH (em vermelho no painel E) e a co-localização do neurônio registrado com a marcação da TH mostrada pela coloração amarela no corpo celular do neurônio registrado (painel F).



**Figura 39** – Fotomicrografia de varredura confocal representativa de um corte coronal do tronco cerebral contendo um neurônio pré-simpático C1 adrenérgico da RVLN que não alterou a frequência de disparos em resposta à HA. Com objetiva de 20x: **Painel A** - neurônio registrado marcado pela biocitina (verde); **Painel B** - neurônio tirosina hidroxilase (vermelho) e **Painel C** - a sobreposição das imagens mostrando a co-localização do neurônio registrado (em verde) com a marcação da TH positiva (em vermelho). Com a objetiva de 63x de imersão em óleo: **Painel D** - neurônio registrado e seus prolongamentos preenchidos pela biocitina (verde); **Painel E** – neurônios com marcação positiva para TH (vermelho) e **Painel F** – a sobreposição as imagens nos mostra a co-localização do neurônio registrado com a marcação positiva da TH, o que nos permite concluir que este neurônio registrado é C1 adrenérgico (amarelo).

#### 4.5.3 Caracterização imunohistoquímica dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que diminuíram a frequência de disparos de PAs após a HA – Grupo III

Dos 7 neurônios registrados que reduziram a frequência intrínseca de disparos de PAs após o desafio hipóxico, obtivemos a fotomicrografia da imunofluorescência de 3 deles. Todos os neurônios revelados pela imunohistoquímica não apresentaram imunorreatividade para a TH, ou seja, os neurônios deste grupo são não-C1 adrenérgicos. Os painéis A, B e C da figura 40 são fotomicrografias obtidas com a objetiva do microscópio confocal com aumento de 20x. No painel A, podemos observar que o neurônio registrado marcado com a biocitina e revelado pela imunohistoquímica (em verde); o painel B mostra os neurônios com marcação positiva para TH (em rosa) enquanto que o painel C mostra a sobreposição das imagens e a confirmação da localização do neurônio registrado (em verde) e dos neurônios com marcação positiva para TH (em rosa) não havendo sobreposição das imagens. Para a visualização das imagens com melhor detalhamento, as fotomicrografias mostradas nos painéis D, E e F foram também capturadas utilizando objetiva de imersão em óleo de 63x. No painel D é apresentado o neurônio registrado (em verde), no painel E os neurônios com marcação positiva para TH (em rosa) e a sobreposição das imagens mostradas no painel F nos permite confirmar que o neurônio registrado é não-adrenérgico (não-C1).



**Figura 40 – Fotomicrografia de varredura confocal representativa de um corte coronal do tronco cerebral contendo um neurônio pré-simpático não-adrenérgico da RVLN que diminuiu a frequência de disparos em resposta à HA. Com objetiva de 20x: Painel A - neurônio registrado marcado pela biocitina (verde); Painel B - neurônios com marcação positiva para TH (rosa) e Painel C - a sobreposição das imagens mostrando a localização do neurônio registrado e os neurônios com marcação positiva para a TH. Com objetiva de 63 x: Painel D - neurônio registrado e seus prolongamentos preenchidos pela biocitina (verde); Painel E – neurônio com marcação positiva para TH (rosa) e Painel F – a sobreposição das imagens nos mostra a localização do neurônio revelado pela biocitina e o neurônio com marcação positiva para a TH, não havendo co-localização.**

Esse conjunto de resultados da imunohistoquímica está apresentado na tabela 2, a qual mostra a distribuição do número de neurônios pré-simpáticos que foram registrados e classificados de acordo com a resposta à HA e a marcação fenotípica para a TH. Podemos observar que o grupo I, composto por 4 neurônios que aumentaram a frequência

de disparos em resposta à HA, apresentaram tanto neurônios C1 adrenérgicos (n=3) quanto neurônios não-adrenérgicos (n=1). Os 4 neurônios que não alteraram a frequência de disparo em resposta ao desafio hipóxico, denominado grupo II, se apresentam como neurônios C1 adrenérgicos. E os 3 neurônios que diminuíram a frequência de disparos em resposta à HA, grupo III, se apresentam como neurônios não-adrenérgicos.

**Tabela 2** – Neurônios pré-simpáticos com registros eletrofisiológicos e a marcação fenotípica com a biocitina e imunohistoquímica para a TH.

<b>Resposta à HA</b>	<b>Grupo I – aumento da frequência de disparos</b>	<b>Grupo II – sem alteração da frequência de disparos</b>	<b>Grupo III – diminuição da frequência de disparos</b>
<b>Número de neurônio registrados</b>	11	21	7
<b>C1</b>	3	4	0
<b>Não-C1</b>	1	0	3

Devido ao pequeno número de células registradas e avaliadas por meio da imunohistoquímica, os resultados obtidos não nos permitem afirmar se existe ou não correlação entre as características eletrofisiológicas observadas em resposta à HA e as características neuroquímicas desses neurônios, i.e., C1 ou não-C1. Os resultados da imunohistoquímica nos permitem sugerir que os neurônios que tiveram redução na frequência são não-adrenérgicos enquanto que aqueles que aumentaram ou não alteraram a frequência intrínseca de disparos são na grande maioria adrenérgicos.

## ***5. DISCUSSÃO***

Os efeitos da exposição à HA sobre as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que enviam projeções para a CIL de ratos jovens adultos (P35) foram estudadas por meio da técnica de *whole-cell patch-clamp*. Realizamos também a caracterização imunohistoquímica dos neurônios pré-simpáticos com o objetivo de se estabelecer uma possível correlação entre as propriedades eletrofisiológicas e o perfil neuroquímico dessas células.

Evidências têm mostrado que a região RVLM é a principal área envolvida na geração da atividade simpática e que o bloqueio ou a lesão bilateral desta área promove acentuadas quedas na PA e da atividade simpática (Feldberg & Guertzenstein, 1972; Guertzenstein & Silver, 1974; Sakima *et al.*, 2000; Guyenet, 2006). Os neurônios pré-simpáticos localizados na RVLM enviam projeções excitatórias diretas para os neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na CIL da medula espinhal (Morrison *et al.*, 1988; Sun *et al.*, 1988; Dampney *et al.*, 2002). No presente estudo identificamos os neurônios pré-simpáticos bulboespinhais da RVLM por meio da microinjeção de um traçador fluorescente retrógrado na CIL de ratos jovens, utilizando a abordagem metodológica descrita anteriormente na literatura (Sun *et al.*, 1988; Lipski *et al.*, 1998; Dergacheva *et al.*, 2012; Almado *et al.*, 2014).

Em relação ao perfil eletrofisiológico dos neurônios pré-simpáticos, existem controvérsias na literatura no que diz respeito ao fato desses neurônios apresentarem ou não característica de auto-despolarização. Inicialmente, estudos de Sun *et al.* (1988) registraram neurônios pré-simpáticos de ratos com 3-4 semanas de vida e mostraram que todos os neurônios registrados eram auto-despolarizantes, isto é, esses neurônios apresentaram características eletrofisiológicas de marcapasso segundo as características definidas por Guyenet (1990). Registros extracelulares de neurônios pré-simpáticos



realizados por Sun *et al.* (1988) sustentaram a hipótese de que era a atividade intrínseca de auto-despolarização dos neurônios da RVLM é a responsável pela manutenção do tônus da atividade simpática. Por outro lado, estudos empregando registros intracelulares in vivo feitos por impalamento de eletrodos de alta impedância (Lipski *et al.*, 1996) e estudos de *whole-cell patch-clamp* em neurônios do RVLM agudamente isolados (Lipski *et al.*, 1998) sugeriram que a atividade dos neurônios bulbo-espinhais do RVLM é resultante da ação de uma rede neuronal, ou seja, é dependente do balanço das influências inibitórias e excitatórias tônicas sobre esses neurônios, oriundas de outras regiões encefálicas.

Estudos de Kangrga & Loewy (1995) mostraram uma população heterogênea de neurônios pré-simpáticos na região RVLM em fatias do tronco cerebral de ratos jovens (P7-P12). Experimentos realizados por Oshima *et al.* (2000) na preparação medula espinhal-tronco cerebral encontraram 3 tipos de padrões de disparo de PAs dos neurônios da RVLM: a) neurônios de disparo regular – neurônios com alta frequência de disparo espontâneo de PAs e cujas características não eram afetadas pelo bloqueio da transmissão sináptica (marca-passo); b) neurônios de disparo irregular – esses neurônios disparavam PAs espontâneos com frequência menor e que o bloqueio da neurotransmissão afetava o potencial de repouso e a frequência de disparo de PAs; c) neurônios silenciosos – esses neurônios não disparavam PAs espontaneamente e se encontravam num potencial de repouso hiperpolarizado. Esses autores não descartaram a possível existência de neurônios com características de marca-passo, mas deram suporte a teoria da rede neuronal. É importante ressaltar que os diferentes resultados obtidos por estes estudos provêm de abordagens experimentais distintas, bem como as diferentes idade dos animais utilizados por cada um desses laboratórios.

Os resultados dos estudos eletrofisiológicos mostraram primeiramente que todos os neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos jovens adultos (P35) apresentam característica de neurônios auto-despolarizantes, ou seja, padrão intrínseco de marca-passo, conforme os critérios de classificação descritas por Guyenet (1990). Dessa forma, os nossos achados estão de acordo com aqueles obtidos por Sun *et al.* (1988) e Almado *et al.* (2014), os quais utilizando a mesma metodologia, mostraram que os neurônios pré-simpáticos de ratos jovens adultos (P35) apresentam a propriedade intrínseca de auto-despolarização. Além disso, a faixa de variação da frequência média de disparos (de 2 a 18 Hz) observadas tanto por Almado *et al.* (2014) quanto por Sun *et al.* (1988) são similares àquelas observadas no presente estudo.

Em relação à teoria de Lipski *et al.* (1996) que sugeriu que a característica de auto-despolarização dependeria da ação de projeções excitatórias de uma rede neuronal, estudos anteriores realizado em nosso laboratório por Almado *et al.* (2014) mostraram uma modulação sináptica sobre a atividade dos neurônios pré-simpáticos bulboespinhais, uma vez que o bloqueio da neurotransmissão inibitória e excitatória promoveu a redução significativa da frequência de disparos de PAs dos neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos jovens adultos. Neste mesmo sentido, estudo de Moraes *et al.* (2013), utilizando a preparação coração-tronco cerebral isolados, caracterizou 4 subpopulações de neurônios pre-simpáticos de ratos jovens, sendo que 3 dessas subpopulações recebem modulação sináptica da rede respiratória, uma vez que o tronco cerebral permanece intacto nesta abordagem experimental.

Nossos resultados mostram que na presença dos bloqueadores sinápticos ionotrópicos (excitatórios e inibitórios), a frequência de disparo de PAs dos neurônios pré-simpáticos foi reduzida. Estes achados estão de acordo com resultados anteriores do

nosso laboratório (Moraes *et al.*, 2013; Almado *et al.*, 2014) que mostraram uma modulação sináptica sobre a atividade dos neurônios pré-simpáticos bulboespinais, os quais efetivamente apresentaram a propriedade intrínseca de autodespolarização. No presente estudo não foi possível mostrar a modulação da rede respiratória devido ao fato de utilizarmos fatias do tronco cerebral com espessura de 200  $\mu\text{m}$ . Ainda que vários segmentos das redes neurais bulbares tenham sido seccionados para a obtenção das fatias, os neurônios pré-simpáticos continuaram recebendo algum tipo de modulação das redes neurais remanescentes na fatia, uma vez que após o bloqueio sináptico verificamos uma redução na frequência de despolarização dessas células.

Estudos de Moraes *et al.*, (2013) documentaram que os neurônios pré-simpáticos da RVLM são efetivamente auto-despolarizante e mostraram que a característica de auto-despolarização observada tanto nos neurônios pré-simpáticos modulados pela rede respiratória quanto nos neurônios que não sofrem influência da rede respiratória é gerada por uma corrente persistente de sódio ( $I_{\text{NaP}}$ ).

### ***Os neurônios pré-simpáticos e a HA***

A atividade dos neurônios pré-simpáticos é fortemente modulada por desafios como a hipóxia e hipercapnia (Sun & Reis, 1994; Derghacheva *et al.*, 2009; Kamendi *et al.*, 2009). Estudos realizados *in vivo* mostraram que a hipóxia citotóxica aguda promove aumento da PA e da atividade simpática (Sun & Reis, 1994). No presente estudo, avaliamos os efeitos da hipóxia tecidual aguda em fatias do tronco cerebral contendo os neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos do grupo controle, sobre as propriedades

eletrofisiológicas intrínsecas desses neurônios. Os resultados revelaram que a exposição a HA, revelou 3 subpopulações de neurônios pré-simpáticos nesta região, devido ao fato desses neurônios apresentarem frequências de disparo distintas frente ao desafio hipóxico: a) neurônios que aumentaram a frequência de disparos; b) neurônios sem alteração na frequência de disparos e c) neurônios com diminuição na frequência de disparos.

Estudos de Mazza *et al.* (2000) mostraram em cultura de neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos neonatos que a hipóxia citotóxica aguda, induzida pelo NaCN, promoveu aumento ou diminuição na frequência de disparo desses neurônios, as quais foram reversíveis após o término da exposição. Os autores relataram que por utilizarem cultura de neurônios da RVLM, não foi possível identificar diferenças morfológicas entre os neurônios estudados.

Estudos existentes na literatura utilizando diferentes abordagens metodológicas, como cultura de neurônios de ratos neonatos (D'Agostino *et al.*, 2009), fatias do tronco cerebral de ratos jovens (Sun & Reis, 1994b) ou ratos adultos anestesiados (Sun & Reis, 1994a) têm sugerido que os neurônios pré-simpáticos da RVLM são sensíveis à hipóxia. No entanto, os estudos de Sun & Reis (1992, 1994) não relataram a existência de diferentes subpopulações em resposta à HA, como mostrado no presente estudo. Estudos de Koganezawa & Paton (2014) mostraram que os neurônios pré-simpáticos da RVLM são sensíveis ao estímulo hipóxico, sugerindo que em situações de hipoperfusão tecidual esses neurônios teriam uma quimiossensibilidade intrínseca ou que poderiam ser sinalizados por alterações na microcirculação local ou astrócitos em função da hipóxia.

### ***Neurônios que aumentaram a frequência de disparo em resposta à HA***

Analizamos as características eletrofisiológicas passivas e ativas das 3 subpopulações de neurônios pré-simpáticos para avaliar se os efeitos da HA observados nos neurônios pré-simpáticos seriam apenas na frequência de disparo ou se a HA teria afetado também o perfil do PA, o RMP e a Rinput dos neurônios registrados. Os resultados mostram que os neurônios pré-simpáticos que aumentam a frequência intrínseca de disparos de PAs em resposta à HA, apresentaram diminuição na amplitude do PA e aumento na constante de tempo entre a *AHP* e o limiar de disparo do novo PA (*Tau*). Os resultados corroboram achados da literatura, como os estudos de D`Agostino *et al.* (2009) utilizando cultura de neurônios dissociados da RVLM de ratos neonatos, os quais mostraram que a exposição à hipóxia hipóxica (0% O<sub>2</sub>, 95% N<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) durante 2 minutos despolarizou o RMP levando ao aumento da frequência de disparo de PAs dos neurônios pré-simpáticos.

Estudos de Sun & Reis (1994a) mostraram que em ratos anestesiados, uma breve exposição (20 – 40 s) à hipóxia foi suficiente para aumentar a frequência de disparo de PAs dos neurônios pré-simpáticos da RVLM e conseqüentemente aumentar a PA e a atividade simpática. Esses autores sugeriram que esta sensibilidade à hipóxia seria devido à corrente de entrada dependente de Ca<sup>2+</sup>, a qual despolariza a membrana celular e aumenta a frequência dos disparos dos PAs.

A vulnerabilidade induzida pela anóxia parece estar relacionada com o aumento da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular, associado com a despolarização causada pelo aumento dos níveis de glutamato intersticiais (Ballanyi, 2004). A elevação de Ca<sup>2+</sup> neuronal resulta primariamente do influxo via receptores de glutamato permeáveis a Ca<sup>2+</sup>

e canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem durante a despolarização anóxica (Haddad & Jiang, 1993). Esta hipótese tem sido suportada por estudos realizados *in vitro* em neurônios pré-simpáticos, indicando que um estímulo hipóxico/hipercápnico aumenta o disparo de PAs dos neurônios pré-simpáticos, e que esta resposta é dependente da diminuição da neurotransmissão GABAérgica e glicinérgica (Boychuk *et al.*, 2012). Estes mesmos autores sugerem que a inibição da neurotransmissão GABAérgica aumenta as respostas simpato-excitatórias cardiovasculares frente ao desafio hipóxico/hipercápnico em ratos com 30 dias de vida. Em ratos neonatos, estudos de Wang *et al.*, (2001) mostraram que a hipóxia citotóxica promoveu a despolarização com consequente aumento da frequência de disparos dos PAs dos neurônios pré-simpáticos bulboespinais, sugerindo que esses neurônios expressam mecanismos iônicos de sensibilidade ao  $\text{O}_2$ .

Apesar das diferenças metodológicas em relação aos estudos existentes na literatura, os nossos resultados relativos ao grupamento de neurônios que apresentaram elevação na frequência de despolarização em resposta à HA estão de acordo com aqueles que mostram que os neurônios pré-simpáticos da RVLM são sensíveis à HA e que este estímulo pode aumentar a frequência de disparos desses neurônios por mecanismos ainda desconhecidos.

### ***Neurônios que não alteraram a frequência de disparo em resposta à HA***

Mesmo que os estudos anteriores relativos aos efeitos do desafio hipóxico agudo (citotóxica ou a hipóxia hipóxica com 0% de  $\text{O}_2$ ) sobre os neurônios pré-simpáticos da RVLM tenham documentado que os neurônios pré-simpáticos são sensíveis à hipóxia, os

ossos resultados revelaram 3 subpopulações frente ao desafio HA em função do perfil de disparo dos PAs. Na maioria dos neurônios pré-simpáticos bulboespinais registrados, a exposição à HA por 2 min não alterou a frequência intrínseca de disparos de PAs, bem como as propriedades passivas. Na avaliação das propriedades ativas, constatamos o aumento na *half-width*, sugerindo que apesar da HA não ter afetado a frequência intrínseca dos disparos, ela alterou a cinética do PA aumentando sua largura. Em função desse achado nos perguntamos se este teria sido um mecanismo protetor ativado por estas células frente ao desafio hipóxico.

Estudos de Patel & Honoré (2001) mostraram que a hipóxia despolariza as células do corpúsculo carotídeo, aumenta a excitabilidade e promove a abertura dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem, aumentando assim o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Estes mesmos autores relatam a existência de canais para  $\text{K}^+$  que apresentam em sua estrutura conformacional subunidades sensíveis ao  $\text{O}_2$ , como a família dos canais para  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem ( $\text{Kv}$ ) e os TASK, que são sensíveis a mudanças de pH. Estudos de Ballanyi *et al.*, (1996) mostraram que os neurônios do núcleo dorsal do vago de ratos jovens são particularmente resistentes a redução de  $\text{O}_2$  e em situações de anóxia esses neurônios apresentam uma hiperpolarização mediada por canais de  $\text{K}^+$ , o qual se caracterizaria como um mecanismo protetor frente ao desafio hipóxico. Segundo esses autores, essa hiperpolarização anóxica é devido a abertura dos canais para  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP ( $I_{\text{K(atp)}}$ ) os quais estão envolvidos em mecanismos celulares que integram a excitabilidade neuronal e o metabolismo energético. Fundamentados nesses estudos, sugerimos um possível envolvimento dos canais  $\text{K}_{\text{atp}}$  como um mediador na proteção frente ao desafio HA, contribuindo para proteger a célula em situações de estresse metabólico (Ballanyi *et al.*, 1996; Zhuo *et al.*, 2005; Peña & Ramirez, 2005).

Estudos de Moraes *et al.*, (2013) mostraram a existência da corrente catiônica ativada pela hiperpolarização ( $I_h$ ) em neurônios pré-simpáticos da RVLM que não recebiam modulação rede respiratória. Esses autores avaliaram a participação desta corrente na atividade de auto-despolarização e verificaram que o bloqueio seletivo desta corrente não alterou a frequência de disparos de PAs nos neurônios pré-simpáticos sem modulação da rede respiratória. Nos nossos estudos verificamos que durante o protocolo de hiperpolarização, algumas células apresentaram a corrente  $I_h$ , porém esta corrente não foi exclusiva de uma subpopulação específica.

#### ***Neurônios que diminuíram a frequência de disparo em resposta à HA***

A terceira subpopulação de neurônios pré-simpáticos da RVLM reveladas após a exposição de 2 min à HA nos chamou a atenção não apenas pelo fato de diminuir a frequência de disparos de PA em resposta à hipóxia, mas também pelo fato de 2 células silenciarem os seus disparos, retornando aos disparos regulares de PAs após a reoxigenação por 5 min ou pela injeção de corrente despolarizante. Não observamos diferenças significativas nas propriedades passivas destas células, mas observamos que as células que silenciaram após o desafio hipóxico apresentaram o potencial de membrana em repouso hiperpolarizado em relação ao basal. Apesar do número de neurônios registrados com este perfil de resposta ser pequeno, acreditamos que a resposta dessas células frente ao desafio hipóxico seria um mecanismo de autoproteção, a fim de diminuir a atividade metabólica dessas células.



Os nossos achados corroboram com estudos de D'Agostino *et al.*, (2009), mostrando que a exposição à hipóxia hipóxica pode diminuir de forma reversível a frequência de disparos de neurônios pré-simpáticos de animais neonatos, devido a hiperpolarização do potencial de membrana em repouso para valores entre -60 e -67 mV. A ativação de receptores GABAérgicos do neurônios pré-simpáticos na RVLM promove aumento da corrente retificadora de entrada de  $K^+$ , hiperpolarizando o neurônio, reduzindo assim a frequência de disparos (Li & Guyenet, 1996; Li et al., 1998). Apesar dos receptores GABAérgico terem sido bloqueados em nossos experimentos, podemos sugerir a participação dos canais iônicos como um mecanismo compensatório protetor para minimizar o gasto energético para os neurônios frente ao desafio HA.

Como não sabemos quais territórios vasculares recebem as projeções das diferentes sub-populações dos neurônios pré-simpáticos caracterizados, não podemos sugerir uma correlação entre as diferentes respostas dos neurônios pré-simpáticos frente o desafio HA e as inervações simpáticas dos diferentes órgãos alvo, como os vasos e o coração. Neste mesmo sentido, estudos de Koganezawa & Paton (2014) mostraram que neurônios da RVLM também podem ser deprimidos pelo estímulo hipóxico-hipercápnico, porém estes autores também não identificaram se esses neurônios pré-motores simpáticos teriam projeções ou exerceriam funções fisiológicas distintas.

Em relação à diminuição da frequência de disparos de PAs em resposta ao desafio hipóxico, estudos em *whole-cell patch clamp* realizados em neurônios no núcleo dorsal motor do vago mostraram que a anóxia tecidual resulta na hiperpolarização e consequente silenciamento do disparo de PAs desses neurônios, o qual é revertido pelo bloqueio dos canais  $K_{ATP}$  (Ballanyi, 2004). Em relação à participação desses canais como um mecanismo protetor, estudos existentes na literatura sugerem que células cardíacas em

condições de isquemia ou hipóxia, os níveis de ATP estão diminuídos e portanto, os canais  $K_{ATP}$  exercem um mecanismo protetor nestas células, diminuindo a sua contração (Sperelakis, 1994). Portanto, em função dos resultados obtidos estudos adicionais serão necessários para avaliar a participação dos canais  $K_{ATP}$  em neurônios pré-simpáticos da RVLM que diminuíram ou silenciaram os PAs frente ao desafio hipóxico.

### ***Imunohistoquímica dos neurônios pré-simpáticos de ratos controle registrados durante a situação de HA***

A região denominada RVLM é formada por populações neuronais fenotipicamente distintas: os neurônios C1 adrenérgicos e os neurônios não-adrenérgicos, os quais enviam projeções para a coluna intermédio-lateral (CIL) da medula espinhal e são considerados como geradores da atividade simpática (Sun et al., 1988; Stornetta et al., 2002; Guyenet, 2006).

Os resultados para a marcação imunohistoquímica dos neurônios pré-simpáticos da RVLM que enviam projeções para a CIL, os quais foram registrados no presente estudo, mostraram tanto neurônios C1 adrenérgicos quanto não-C1 adrenérgicos. Em relação à distribuição desses neurônios registrados em resposta à HA, observamos que: a) todos os neurônios que não alteram a frequência de disparos são C1 adrenérgicos; b) todos os neurônios que diminuíram a frequência de disparos são não-adrenérgicos e c) a maioria dos neurônios que aumentaram a frequência de disparos são C1 adrenérgicos. Mesmo com um número pequeno de células que foram registradas e que tiveram a

imunohistoquímica bem sucedida, podemos sugerir que há uma correlação entre o fenótipo e o padrão de disparos de PAs.

Estudos de Guyenet *et al.*, (2013) mostram que o aumento da atividade simpática promovida pela ativação dos quimiorreceptores periféricos é mediada principalmente pela ativação dos neurônios pré-simpáticos C1 da RVLM. Para testar esta hipótese, lesões seletivas dos neurônios C1 com a toxina saporina aboliu a resposta à ativação dos quimiorreceptores periféricos (Schreihof & Guyenet, 2000). Em situações de diminuição da PaO<sub>2</sub>, os quimiorreceptores periféricos são ativados e as aferências chegam até o tronco cerebral via NTS. Os neurônios deste núcleo enviam projeções excitatórias glutamatérgicas para os neurônios pré-simpáticos C1 da RVLM, os quais promovem ajustes vasculares com a finalidade de restabelecerem os níveis adequados de O<sub>2</sub>. Estudos de Marina *et al.*, (2013) por meio da técnica de optogenética mostraram que os astrócitos da superfície ventral do bulbo, promovem a excitação dos neurônios C1 via mecanismo dependente de ATP. Portanto, levando em consideração que os neurônios pré-simpáticos classificados no grupo I e II são C1 adrenérgicos, sugerimos que a resposta à HA possa ser mediada pelo ATP. No entanto, estudos adicionais serão necessários para explorar essa possibilidade.

### ***Pré-condicionamento pela exposição à HCI frente a um segundo desafio hipóxico (HA)***

Na literatura encontramos estudos importantes sobre os efeitos do pré-condicionamento em diversas áreas cerebrais envolvidas com o controle cardiorrespiratório, memória e comportamento. Estímulos de pré-condicionamento

incluem eventos isquêmicos de curta duração, hipóxia, hipercapnia e envolvem entre outros fatores, a ativação de receptores glutamatérgicos (Perez-Pinzon *et al.*, 1997) e de receptores de adenosina A1 e A2 (Boeck *et al.*, 2004, 2005; Hiraide *et al.*, 2001) e a liberação de óxido nítrico e citocinas inflamatórias (Huang, 2004).

Estudos anteriores do nosso laboratório utilizando o mesmo modelo experimental de HCI (Zoccal *et al.*, 2007; Zoccal & Machado, 2010), mostraram que a hiperatividade simpática observada nos animais expostos à HCI seria decorrente de alterações no acoplamento entre a atividade simpática e respiratória, mais especificamente na fase final da expiração. Estudos de Braga *et al.* (2006) evidenciaram que ratos submetidos à HCI, quando expostos a um novo episódio de hipóxia aguda, apresentaram uma resposta ventilatória mais prolongada do que aquela observada em ratos controle.

Estudos de Almado *et al.* (2014), envolvendo a caracterização eletrofisiológica dos neurônios pré-simpáticos na RVLM de animais submetidos à HCI, mostrou que o aumento da atividade simpática nos animais previamente submetidos à HCI independe de alterações nas propriedades eletrofisiológicas intrínsecas desses neurônios. Resultados semelhantes foram descritos por Moraes *et al.* (2013) que mostrou que a atividade intrínseca de marca-passo dos neurônios pré-simpáticos na RVLM não foi afetada pela prévia exposição à HCI. Esse conjunto de resultados corrobora a hipótese de que o aumento da atividade simpática observada nos animais expostos à HCI seria decorrente de alterações nos *inputs* excitatórios provenientes da rede neural respiratória (Zoccal *et al.*, 2007; Zoccal & Machado, 2010; Moraes *et al.*, 2013), e não decorrente de alterações intrínsecas do perfil eletrofisiológico dos neurônios pré-simpáticos da RVLM (Moraes *et al.*, 2013; Almado *et al.*, 2014).

Um dos principais objetivos do presente estudo foi avaliar os efeitos que o pré-condicionamento promovido pela exposição dos ratos à HCI, durante 10 dias, teria sobre as alterações eletrofisiológicas de neurônios pré-simpáticos expostos a uma nova situação de hipóxia tecidual aguda. Os resultados mostraram que a HA promoveu um aumento na excitabilidade dos neurônios pré-simpáticos de ratos previamente submetidos à HCI e esse aumento na excitabilidade foi significativamente maior quando comparada com os resultados observados em neurônios de animais do grupo controle. Além disso, 2 subpopulações foram reveladas pela HA em fatias do tronco cerebral de animais previamente submetidos a HCI: a) neurônios que aumentaram a frequência de disparos (n=9) e b) neurônios sem alteração da frequência de disparos (n=22). Observamos que os neurônios pré-simpáticos classificados no grupo I após a HA, apresentaram aumento na frequência média de disparos normalizada superior a 100%, sugerindo que estes neurônios quando submetidos à um novo desafio hipóxico teriam sua excitabilidade aumentada. Em contrapartida, a maioria dos neurônios pré-simpáticos registrados classificados no grupo II por não alterarem a frequência média de disparos de PAs. Podemos sugerir que a exposição prévia à HCI promove um efeito protetor, pois evitou alterações na frequência de disparos após a HA. Além disso, dos 31 neurônios pré-simpáticos da RVLm de ratos previamente submetidos a HCI não registramos nenhum deles que diminuísse a frequência de disparos ou que estivessem silentes após a HA, como observados nos animais do grupo controle. Acreditamos que esse foi um dos fatores pelos quais a frequência média de disparos do conjunto de neurônios registrados após a HA foi aumentada, como mostrado na figura 35.

Evidências experimentais indicam a possibilidade de que as adaptações à hipóxia reflitam, pelo menos em parte, em mudanças celulares e moleculares em neurônios de áreas centrais que apresentam quimiossensibilidade intrínseca (Molkov *et al.*, 2011;

Dempsey *et al.*, 1985). Uma importante molécula sensora de O<sub>2</sub> e potencial marcador molecular da adaptação à hipóxia é a heme-oxigenase (HO) (Yet *et al.*, 1999; Willians *et al.*, 2004). A HO possui 3 isoformas, sendo que a HO-2 é expressa constitutivamente nas células, enquanto que a isoforma induzível HO-1 se expressa em resposta à hipóxia e estresse oxidativo, entre outros estímulos (Sunderram *et al.*, 2009; McCoubrey *et al.*, 1997). Estudos eletrofisiológicos realizados em cultura primária de neurônios da RVLM de ratos neonatos demonstraram uma relação entre a resposta excitatória dos neurônios à hipóxia local e a expressão da HO-2 (Mazza *et al.*, 2001), uma vez que a HO-2 é expressa nas regiões quimiossensíveis do SNC como a RVLM e pré-BötC (Mazza *et al.*, 2001; D'Agostino *et al.*, 2009). As respostas excitatórias promovidas pela HO-2 em condições de hipóxia parecem depender de um aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, e envolve a modulação da condutância de canais iônicos, e, conseqüentemente, da excitabilidade neuronal pelos produtos da reação da HO-2 (Willians *et al.*, 2004).

Entre os possíveis alvos celulares recrutados na resposta excitatória decorrente da ativação da HO-2 em situações de hipóxia, há evidências sobre o envolvimento dos canais para potássio ativados por Ca<sup>2+</sup> (BK<sub>Ca</sub>), os quais tem a habilidade de detectar diminuições agudas nos níveis de O<sub>2</sub> devido à sua afinidade com a HO-2, bem como os canais para K<sup>+</sup> voltagem dependente sensíveis ao oxigênio (Kv), identificados em neurônios do NTS (Kemp *et al.*, 2009). Em relação ao aumento da expressão da HO-1 na hipóxia crônica, estudos de Sunderram *et al.*, (2009) sugerem que apesar da HO ser um importante sensor de O<sub>2</sub>, a expressão da HO-1 em neurônios C1 e do complexo pre-BötC na RVLM ocorre a partir do 4<sup>o</sup> dia após a exposição à hipóxia crônica. Esses autores afirmam que esta indução da expressão da HO-1 tempo-dependente é importante para a quimiossensibilidade dos neurônios respiratórios do complexo pre-BötC e para a simpato-excitação dos neurônios C1 da RVLM.

Com relação aos neurônios pré-simpáticos de animais que foram previamente expostos à HCI e que não alteraram a frequência de disparos em resposta à HA, sugerimos que o pré-condicionamento tenha um efeito protetor sobre esses neurônios. Estudos relacionados ao pré-condicionamento em outras áreas do SNC, como no hipocampo, realizado por Nuritova & Frenguelli (2012), mostraram que uma segunda exposição à HA (<10% de O<sub>2</sub>) tem seus efeitos atenuados devido ao pré-condicionamento promovido pela primeira exposição à HA, e esta atenuação é decorrente de uma menor liberação de adenosina no segundo episódio. Estudos de Pearson *et al.* (2003) documentaram que episódios sucessivos de HA no hipocampo, induziram uma liberação progressivamente menor de adenosina. Entre os efeitos da HA, pode-se sugerir que a mesma atue como um modulador da função celular e que muitos dos efeitos da privação de O<sub>2</sub> poderiam ser atribuídos às mudanças nas atividades e/ou expressões dos diferentes canais iônicos.

Há evidências de que o ATP é um dos principais neuromoduladores liberados na superfície ventral do bulbo em condições de hipóxia (Gourine *et al.*, 2005). Estudos realizados por Zoccal *et al.*, (2011) mostraram em experimentos de *immunoblotting*, que a expressão de alguns subtipos de receptores purinérgicos estão aumentados nos animais HCI, sugerindo que esse modelo experimental de hipóxia promoveria um aumento na liberação de ATP e na expressão de receptores purinérgicos na RVLM e complexo pre-BötC na tentativa de reverter as alterações simpático-respiratório produzidas pela HCI. Como no presente estudo, avaliamos as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios pré-simpáticos da RVLM de ratos jovens adultos, sugerimos que sejam realizados estudos adicionais sobre os possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas respostas à HA, tanto em animais controle quanto nos previamente expostos à HCI.

## ***6. SUMÁRIO***



Os resultados desse trabalho indicam que: a) os neurônios pré-simpáticos bulboespinais da RVLN apresentam atividade intrínseca de auto-despolarização; b) existem 3 subpopulações de neurônios pré-simpáticos que apresentaram diferentes padrões de disparo em resposta ao desafio hipóxico tecidual em ratos controle; c) apenas 2 subpopulações de neurônios pré-simpáticos em ratos submetidos à HCI foram identificadas; d) há um efeito pré-condicionante pela prévia exposição à HCI frente a um desafio hipóxico agudo; e) a maioria dos neurônios pré-simpáticos registrados tanto do grupo controle quanto HCI não alteraram a frequência de PAs após o desafio HA.

## ***7. CONCLUSÕES***

O conjunto de resultados apresentados neste trabalho mostra que a HA revelou diferentes padrões de respostas eletrofisiológicas em neurônios pré-simpáticos nas 3 subpopulações identificadas no grupo controle e 2 subpopulações no grupo HCI. Além disso, a HCI promoveu um efeito protetor na excitabilidade intrínseca dos neurônios pré-simpáticos em resposta à HA.

## ***8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- Aicher SA, Saravay RH, Cravo S, Jeske I, Morrison SF, Reis DJ & Milner TA (1996). Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. *J Comp Neurol* 373:62-75.
- Almado CEL, Leão RM & Machado BH (2014). Intrinsic properties of rostral ventrolateral medulla pre-sympathetic and bulbospinal respiratory neurons of young adult rats are not affected by chronic intermittent hypoxia. *Exp. Physiol.* 99.7: 937-950.
- Almado CEL. Caracterização eletrofisiológica dos neurônios do bulbo ventrolateral de ratos jovens submetidos à hipóxia. Ribeirão Preto: USP, 2012. Projeto de Tese – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- Ballanyi K (2004). Protective role of neuronal Katp channels in brain hypoxia. *J Exp Biol* 207:3201-12. Review
- Barros RC, Bonagamba LG, Okamoto-Canesin R, de Oliveira M, Branco LG, Machado BH (2002) Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton Neurosci* 97:110-115.
- Beckh S, Noda M, Lubbert H & 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.
- Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J (1995) Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* 75:1-45.
- Bickler PE, Donohoe PH, Buck LT (2002). Molecular adaptations for survival during anoxia: lessons from lower vertebrates. *Neuroscientist* 8(3):234-242. Review.
- Biscoe TJ & Duchon MR (1990) Cellular basis of transduction in carotid chemoreceptors. *Am J Physiol* 258:L271-278.
- Boeck CR, Ganzella M, Lottermann A, Vendite D (2004). NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia*, 45(7):745-750.
- Boeck CR, Kroth EH, Bronzatto MJ, Vendite D (2005). Adenosine receptors co-operate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. *Neuropharmacology*, 49(1):17-24.
- Boychuk CR, Woerman AL & Mendelowitz D (2012). Modulation of bulbospinal rostral ventral lateral medulla neurons by hypoxia/hypercapnia but not medullary respiratory activity. *Hypertension*. 60(6):1491-7.
- Braga VA, Soriano RN, Machado BH (2006) Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol* 91:1025-1031.
- Brown DL & Guyenet PG (1985). Electrophysiological study of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla in rats. *Circ Res* 56(3):359-69.

- Burke PGR, Neale J, KORIM WS, McMullan S & Goodchild AK (2011). Patterning of somatosympathetic reflexes reveals nonuniform organization of presympathetic drive from C1 and non-C1 RVLM neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 301: R1112-22.
- Caples SM, Gami AS, Somers VK (2005) Obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med* 142:187-197.
- Chitravanshi VC, Sapru HN (1995) Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. *Am J Physiol* 268:R851-858.
- Chitravanshi VC, Kachroo A, Sapru HN (1994) A midline area in the nucleus commissuralis of NTS mediates the phrenic nerve responses to carotid chemoreceptor stimulation. *Brain Res* 662:127-133.
- D'Agostino D, Mazza E Jr & Neubauer JA (2009). Heme oxygenase is necessary for the excitatory response of cultured neonatal rat rostral ventrolateral medulla neurons to hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(1):R102-18.
- da Silva MP, Ventura RR & Varanda WA (2013). Hypertonicity increases NO production to modulate the firing rate of magnocellular neurons of the supraoptic nucleus of rats. *Neuroscience* 250:70-9.
- Dale N, Pearson T & Frenguelli BG (2000). Direct measurement of adenosine release during hypoxia in the CA1 region of the rat hippocampal slice. *J Physiol*. 1;526 (1) :143-55.
- Dampney RA (1994). Functional Organization of Central Pathway Regulating the Cardiovascular System. *Physiological Reviews* 74 (2).
- Dampney RA, Coleman MJ, Fontes MA, Hirooka Y, Horiuchi J, Li YW, Polson JW, Potts PD, Tagawa T (2002). Central mechanisms underlying short-and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29(4):261-268.
- Dampney RA, Horiuchi J, Tagawa T, Fontes MA, Potts PD & Polson JW. (2003). Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. *Acta Physiol Scand* 177, 209-218.
- Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ & O'Donnell (2010). Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev* 90:47-112.
- Dergacheva O, Boychuk CR & Mendelowitz D (2012). Developmental changes in GABAergic neurotransmission to presympathetic and cardiac parasympathetic neurons in the brainstem. *J Neurophysiol* 110:672-9.
- Dobbins EG & Feldman JL (1994). Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J Comp Neurol* 347(1):64-86.
- Fedorko L, Duffin J, England S (1989) Inhibition of inspiratory neurons of the nucleus retroambiguus by expiratory neurons of the Botzinger complex in the cat. *Exp Neurol* 106:74-77.
- Fedorko L, Merrill EG (1984) Axonal projections from the rostral expiratory neurons of the Botzinger complex to medulla and spinal cord in the cat. *J Physiol* 350:487-496.

- Feldberg W, Guertzenstein PG (1972) A vasodepressor effect of pentobarbitone sodium. *J Physiol* 224:83-103.
- Feldman JL, Del Negro CA (2006) Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci* 7:232-242.
- Fletcher EC (2001) Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 90:1600-1605.
- Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC, 3rd, Unger T (1992) Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension* 19:555-561.
- Franchini KG & Krieger EM. (1993) Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv Syst* 42: 63-69.
- Gao H & Derbenev AV(2013). Synaptic and extrasynaptic transmission of kidney-related neurons in the rostral ventrolateral medulla. *J Neurophysiol.* 110: 2637-2647.
- Gidday JM (2006) Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* 7(6):437-448.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N & Spyer KM (2005). Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. *J Neurosci* 25(5):1211-18.
- Granata AR (1994) Rostral ventrolateral medulla descending neurons excited by nucleus tractus solitarii inputs. *Brain Res* 648:299-305.
- Guertzenstein PG & 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(2): 489-503.
- Guyenet PG (1990). Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation: in Loewy AD, Spyer MK: *Control Regulatory of Autonomic Functions*. London, Oxford University Press, 145-167.
- Guyenet PG (2000) Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. *Respir Physiol*, 121(2-3):147-162. Review.
- Guyenet PG (2006) The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7:335-346.
- Guyenet PG, Koshiya N (1995) Working model of the sympathetic chemoreflex in rats. *Clin Exp Hypertens* 17:167-179.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Bochorishvili G, Depuy SD, Burke PG & Abbott SB (2013). C1 neurons: the body's EMTs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1;305(3):R187-204.
- Haddad GG & Jiang C (1993). Echanisms of anoxia-induced depolarization in brainstem neurons: in vitro current and voltage clamp studies in the adult rat. *Brain res* 625:261-8.
- Hershkowitz N, Katchman AN, Veregge S (1993). Site of synaptic depression during hypoxia: a patch-clamp analysis. *J Neurophysiol* 69(2): 432-441.
- Hiraide T, Katsura K, Maramatsu H, Asano G & Katayama Y (2001). Adenosine receptor antagonists cancelled the ischemic tolerance phenomenon in gerbil. *Brain Res* 910: 94-8.

- Huang L, Wang Y, Liu J & Wang J (2004). Evaluations of ischemic states using bispectrum parameters of EEG and neural networks. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 1:582-5.
- Hwang LL, Dun NJ (1999) 5-HT modulates multiple conductances in immature rat rostral ventrolateral medulla neurones in vitro. *J Physiol* 517 ( Pt 1):217-228.
- Johnson SM, Smith JC, Funk GD, Feldman JL (1994) Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J Neurophysiol* 72:2598-2608.
- Jones NM & Bergeron M (2001). Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1105-1114.
- Kamendi HW, Cheng Q, Dergacheva O, Gorini C, Jameson HS, Wang X, McIntosh JM, Mendelowitz D (2009). Abolishment of serotonergic neurotransmission to cardiac vagal neurons during and after hypoxia and hypercapnia with prenatal nicotine exposure. *J Neurophysiol*, 101(3):1141-1150.
- Kangrga IM & Loewy AD (1995). Whole-cell recordings from visualized C1 adrenergic bulbospinal neurons: ionic mechanisms underlying vasomotor tone. *Brain Res.* 670(2):215-32.
- Kawai Y, Qi J, Comer AM, Gibbons H, Win J & Lipski J (1999) Effects of cyanide and hypoxia on membrane currents in neurons acutely dissociated from the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Brain Res.* 5; 830 (2): 246-57.
- Kemp PJ, Telezhkin V, Wilkinson WJ, Mears R, Hanmer SB, Gadeberg HC, Müller CT, Riccardi D & Brazier SP (2009). Hypoxia and Consequences. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1177:112-118.
- Koganezawa T & Paton JF (2014). Intrinsic chemosensitivity of rostral ventrolateral medullary sympathetic premotor neurons in the in situ arterially perfused preparations of rats. *Exp Physiol* 99:1453-56.
- Koshiya N, Guyenet PG (1996) NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *Am J Physiol* 270:R1273-1278.
- Koshiya N, Smith JC (1999) Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature* 400:360-363.
- Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL, Prabhakar NR (2006) Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biol* 91:249-286.
- Li YW & Guyenet PG (1995). Neuronal excitation by angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla of the rat in vitro. *Am J Physiol* 268:272-7.
- Li YW & Guyenet PG. (1996) Activation of GABAB receptors increases a potassium conductance in rat bulbospinal neurons of the C1 area. *Am J Physiol.* 271(5):R1304-10.
- Lipski J, Kanjhan R, Kruszewska B & Rong W (1996). Properties of presympathetic neurones in the rostral ventrolateral medulla in the rat: an intracellular study "in vivo". *J Physiol.* 1;490 ( Pt 3):729-44.
- Lipski J, Kanjhan R, Kruszewska B & Smith M (1995). Barosensitive neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat in vivo: morphological properties and relationship to C1 adrenergic neurons. *Neuroscience* 69(2):601-618.



- Lipski J, Kawai Y, Qi J, Comer A & 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):R1099-110.
- Machado BH (2001) Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarius of awake rats. *Ann N Y Acad Sci* 940:179-196.
- Marina N, Tang F, Figueiredo M, Mastitskaya S, Kasimov V, Mohamed-Ali V, Roloff E, Teschemacher AG, Gourine AV & Kasparov S (2013). Purinergic signaling 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* 108:317-27.
- Martin ED, Fernández M, Perea G, Pascual O, Haydon PG, Araque A, Ceña V (2007). Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia* 55(1):36-45.
- Mazza EJ, Edelman NH & Neubauer JA (2000). Hypoxia excitation in neurons cultured from the rostral ventrolateral medulla of the neonatal rat. *J Appl Physiol.* 88(6):2319-2329.
- McCoubrey WK Jr, Huang TJ & Maines MD (1997). Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem* 272: 12568–74.
- McGuire M, Bradford A (2001) Chronic intermittent hypercapnic hypoxia increases pulmonary arterial pressure and haematocrit in rats. *Eur Respir J* 18:279-285.
- McGuire M, Zhang Y, White DP & Ling L. (2003) Chronic intermittent hypoxia enhances ventilatory long-term facilitation in awake rats. *J Appl Physiol* 95, 1499-1508.
- Mellen NM, Roham M, Feldman JL (2004) Afferent modulation of neonatal rat respiratory rhythm in vitro: cellular and synaptic mechanisms. *J Physiol* 556:859-874.
- Merrill EG, Fedorko L (1984) Monosynaptic inhibition of phrenic motoneurons: a long descending projection from Botzinger neurons. *J Neurosci* 4:2350-2353.
- Mifflin SW (1992) Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol* 263:R368-375.
- Miller AD & Nonaka S (1990) Botzinger expiratory neurons may inhibit phrenic motoneurons and medullary inspiratory neurons during vomiting. *Brain Res* 521:352-354.
- Molkov YI, Zoccal DB, Moraes DJ, Paton JF, Machado BH & Rybak IA (2011). Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *J Neurophysiol.*105:3080-3091.
- Monnier A, Alheid GF & McCrimmon DR (2003). Defining ventral medullary respiratory compartments with a glutamate receptor agonist in the rat. *J Physiol* 548: 859-874.
- Moraes DJ, Bonagamba LG, Zoccal DB & Machado BH (2011). Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 300(6):R1476-86.
- Moraes DJA, da Silva MP, Bonagamba LG, Mecawi AS, Zoccal DB, Antunes-Rodrigues J, Varanda WA & Machado BH (2013). Electrophysiological properties of rostral

- ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by respiratory network in rats. *J Neurosci.* 33(49):19233-37.
- Morrison SF, Milner TA, Reis DJ. 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.
- Narkiewicz K, van de Borne PJH, Montano N, Dyken ME, Phillips BG, Somers VK (1998). Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 97:943-945.
- Neubauer JA (2001) Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 90(4):1593-1599.
- Neubauer JA, Melton JE & Edelman NH (1990). Modulation of respiration during brain hypoxia. *J Appl Physiol* 68(2):441-51.
- Neubauer JA, Sunderram J. (2004). Oxygen-sensing neurons in the central nervous system. *J Appl Physiol* 96: 367-74. Review
- Nuritova F & Frenguelli BG (2012). Putative depolarisation-induced retrograde signalling accelerates the repeated hypoxic depression of excitatory synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampus via group I metabotropic glutamate receptors. *Neuroscience*, 222:159-72.
- Oshima N, Kumagai H, Kawai A, Sakata K, Matsuura T, Saruta T (2000) Three types of putative presympathetic neurons in the rostral ventrolateral medulla studied with rat brainstem-spinal cord preparation. *Auton Neurosci* 84:40-49.
- Patel AJ, Honore E (2001) Molecular physiology of oxygen-sensitive potassium channels. *Eur Respir J* 18:221-227.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. London: Academic Press; 1998.
- Pearson T, Currie AJ, Etherington LA, Gadalla AE, Damian K, Llaudet E, Dale N, Frenguelli BG (2003). Plasticity of purine release during cerebral ischemia: clinical implications? *J Cell Mol Med.* 7 (4): 362-75.
- Pena F, Ramirez JM (2005) Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. *Mol Neurobiol* 32:251-283.
- Perez-Pinzon MA, Rosenthal M, Sick TJ, Lutz PL, Pablo J, Mash D (1992) Downregulation of sodium channels during anoxia: a putative survival strategy of turtle brain. *Am J Physiol* 262:R712-715.
- Phillips JK, Goodchild AK, Dubey R, Sesiashvili E, Takeda M, Chalmers J, Pilowsky PM, & Lipski J (2001). Differential expression of catecholamine biosynthetic enzymes in the rat ventrolateral medulla. *J Comp Neurol* 432:20–34.
- Powel FL, Milsom WK, Mitchell GS (1998) Time domains of the hypoxic ventilator response. *Respir Physiol* 112 : 123-34. Review

- Prabhakar NP, Kumar GK & Peng YJ (2012). Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 113:1304-10.
- Prabhakar NR, Peng YJ, Jacono FJ, Kumar GK, Dick TE (2005) Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32:447-449.
- Ruggiero DA, Cravo SL, Golanov E, Gomez R, Anwar M & Reis DJ (1994). Adrenergic and non-adrenergic spinal projections of a cardiovascular-active pressor área of medula oblongata: quantitative topographic analysis. *Brain Res* 7;663(1):107-20.
- Sakima A, Yamazato M, Sesoko S, Muratani H, Fukiyama K (2000) Cardiovascular and sympathetic effects of L-glutamate and glycine injected into the rostral ventrolateral medulla of conscious rats. *Hypertens Res* 23(6):633-641.
- Saywell SA & Feldman JL (2004). Dynamic interactions of excitatory and inhibitory inputs in hypoglossal motoneurons: respiratory phasing and modulation by PKA. *J Physiol* 1;554(Pt 3): 879-889.
- Schreihof AM & Guyenet PG (2000). Sympathetic reflexes after depletion of bulbospinal catecholaminergic neurons with anti-DbetaH-saporin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279(2):R729-42.
- Schreihof AM, Guyenet PG (1997) Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. *J Comp Neurol* 387:524-536.
- Semenza GL (2000). Oxygen-regulates transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res* 1(3):159-162.
- Schreihof AM & Guyenet PG (2002).The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29(5-6):514-521.
- Sica AL, Greenberg HE, Ruggiero DA, Scharf SM (2000) Chronic-intermittent hypoxia: a model of sympathetic activation in the rat. *Respir Physiol* 121:173-184.
- Smith JC, Abdala AP, Koizumi H, Rybak IA & Paton JF. (2007) Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. *J Neurophysiol* 587, 597-610.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW & Feldman JL (1991). Pre-Boetzing complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254, 726-729.
- Somers VK (1995). Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *The Journal of Clinical Investigation* 96, 1897-1904.
- Sperelakis N. Electrogenesis of Membrane Excitability. In: *Cell Physiology*. Academic Press. 1994; 255-292.
- Spyer KM (1994) Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *J Physiol* 474:1-19.

- Stornetta RL, Sevigny CP, Schreihof AM, Rosin DL & Guyenet PG (2002). Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 is expressed by both C1 adrenergic and nonaminergic presympathetic vasomotor neurons of the rat medulla. *J Comp Neurol*. 444:207–220.
- Stornetta RL, Akey PJ, Guyenet PG (1999) Location and electrophysiological characterization of rostral medullary adrenergic neurons that contain neuropeptide Y mRNA in rat medulla. *J Comp Neurol*. 415:482-500.
- Stornetta RL, Sevigny CP, Guyenet PG (2003) Inspiratory augmenting bulbospinal neurons express both glutamatergic and enkephalinergic phenotypes. *J Comp Neurol*. 455(1): 113-124.
- Sun MK (1995). Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. *Prog. Neurobiol*. 47, 157–233.
- Sun MK, Jeske IT & Reis DJ (1992). Cyanide excites medullary sympathoexcitatory neurons in rats. *Am J Physiol*. 262(2 Pt 2):R182-9.
- Sun MK & Reis DJ (1994a). Hypoxia selectively excites vasomotor neurons of rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol*. 266: 245-256.
- Sun MK & Reis DJ (1994b). Hypoxia-activated  $Ca^{2+}$  currents in pacemaker neurons of rat rostral ventrolateral medulla in vitro. *J of Physiol*. 476: 101-116.
- Sun MK, Young BS, Hackett JT & Guyenet PG (1988). Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostral ventrolateral medulla with putative sympathoexcitatory function: an intracellular study in vitro. *Brain Res* 442, 229–239.
- Sunderram J, Semmlow J, Thakker-Varia J, Bhaumik M, Hoang-Le O & Neubauer JA (2009). Heme oxygenase-1-dependent central cardiorespiratory adaptations to chronic hypoxia in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 297: 300–312, 2009.
- Urbanski RW, Sapru HN (1988) Evidence for a sympathoexcitatory pathway from the nucleus tractus solitarii to the ventrolateral medullary pressor area. *J Auton Nerv Syst* 23:161-174.
- Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K, Kobzik L, Wiesel P, Christou H, Kourembanas S & Lee ME (1999). Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest* 103: R23–R29.
- Wang G, Zhou P, Repucci MA, Golanov EV & Reis DJ (2001). Specific actions of cyanide on membrane potential and voltage-gated ion current in rostral ventrolateral medulla neurons in rat brainstem slices. *Neurosci Lett* 309:125-9.
- Wasicko MJ, Melton JE, Neubauer JA, Krawciw N & Edelman NH (1990). Cervical sympathetic and phrenic nerve responses to progressive brain hypoxia. *J Appl Physiol* 68(1):53-8.
- Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C & Kemp PJ (2004). Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* 306: 2093–2097.
- Zhang L, Wang H, Li Q, Zhan R, Yu SY (2012) Purinergic modulation of hypoxic regulation via the rostral ventral lateral medulla in rats. *Resp Physiol Neurobiol* 184: 48-54.

- Zhang W, Carreno FR, Cunningham JT, Mifflin SW (2008) Chronic sustained and intermittent hypoxia reduce function of ATP-sensitive potassium channels in nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R1555-1562.
- Zhuo ML, Huang Y, Liu DP, Liang CC (2005). KATP channel: relation with cell metabolism and role in the cardiovascular system. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(4):751-764.
- Zoccal DB, Machado BH (2010) Sympathetic overactivity coupled with active expiration in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*.
- Zoccal DB, Bonagamba LG, Paton JF, Machado BH (2009) Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Exp Physiol* 94:972-983.
- Zoccal DB, Bonagamba LG, Oliveira FR, Antunes-Rodrigues J, Machado BH (2007) Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol* 92:79-85.
- Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF, Machado BH (2008) Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol* 586:3253-3265.
- Zoccal DB & Machado BH (2011) Coupling between respiratory and sympathetic activities as a novel mechanism underpinning neurogenic hypertension. *Curr Hypertens Rep* 13:229-36.

## ***9. ANEXOS***

**Electrophysiological profile of RVLM presympathetic neurons in response to acute hypoxia in brainstem slices from control and CIH rats**

Marlusa Karlen Amarante, Carlos Eduardo L. Almado, Davi J. A. Moraes,  
Daniela Accorsi-Mendonça and Benedito H. Machado

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

**Running title:** Acute hypoxia and presympathetic neurons

**Key words:** RVLM presympathetic neurons, chronic intermittent hypoxia, acute hypoxia, intrinsic electrophysiological properties.

**\*Corresponding author:**

Benedito H. Machado, Ph.D.

Department of Physiology

School of Medicine of Ribeirão Preto,

University of São Paulo

14049-900

Ribeirão Preto, SP, Brazil

e-mail: [bhmachad@fmrp.usp.br](mailto:bhmachad@fmrp.usp.br)

## ABSTRACT

RVLM presympathetic neurons located in the ventral medulla of brainstem are in charge of generation of sympathetic activity and there is evidence that the activity of these presympathetic neurons are affected by acute hypoxia (AH) or by chronic intermittent hypoxia (CIH) protocol. In this study we evaluated the effects of AH on the intrinsic electrophysiological properties of RVLM presympathetic neurons of young adult rats previously exposed to CIH or normoxic condition (control group) for 10 days. The data show that all recorded RVLM presympathetic neurons presented intrinsic auto-depolarization activity and the baseline firing frequency of these neurons from control and CIH group were similar. In the control group, AH do not change the firing rate, but revealed different subpopulations after 2 min of AH: *i*) neurons increasing the firing frequency; *ii*) neurons do not changing the firing frequency and *iii*) neurons decreasing the firing frequency. While in the CIH group, the AH increased the firing rate of recorded neurons comparing with basal condition and revealed 2 subpopulations in this group: *i*) neurons increasing the firing frequency and *ii*) neurons do not changing the firing frequency. The data shows that AH revealed different subpopulations of RVLM presympathetic neurons and also that the overall response to AH of presympathetic neurons of rats previously submitted do CIH is different in relation to the neurons from control rats, suggesting that previous exposition to CIH contribute for a protective role for RVLM presympathetic neurons when exposed to a new and acute episode of hypoxia.



## INTRODUCTION

Studies demonstrated that animals exposed to chronic intermittent hypoxia (CIH) protocol presented sympathetic overactivity and develop hypertension (Fletcher, 2001; Prabhakar et al., 2005; Zoccal et al, 2007;. Zoccal et al., 2008). The presympathetic neurons located in the rostral ventrolateral medulla (RVLM), in the ventral aspect of brainstem, are responsible for the generation of the sympathetic outflow (Feldberg & Guertzenstein, 1972; Malpas, 1998; Dampney *et al.* 2003; Guyenet, 2006; Boychuck *et al.* 2012). Studies from our laboratory using *whole-cell patch-clamp* approach in brainstem slices or working heart-brain stem preparation in young rats showed that the sympathetic overactivity observed in response to CIH is not due to changes on the intrinsic electrophysiological properties of RVLM presympathetic neurons. (Moraes *et al.*, 2013; Almado *et al.*, 2014).

In relation to the intrinsic electrophysiological properties and spontaneous firing pattern of RVLM presympathetic neurons, previous studies showed that these neurons present auto-depolarization, i.e., are pacemakers (Guyenet, 1990). This characteristic was showed in studies performed in different experimental conditions such as brainstem slices from juvenile rats (Sun *et al.* 1988), in slices from neonate rats (Kangrga & Loewy, 1995; Li *et al.* 1995; Li & Guyenet, 1996), brainstem slices from young adult rats (P 35) using *whole-cell patch-clamp* (Almado *et al.*, 2014) and working heart-brain stem preparation from young rats (Moraes et al., 2013) This property is dependent, at least in part, on the existence of a persistent inward sodium current ( $I_{NaP}$ ) in these neurons (Sun, 1995; Kawai *et al.* 1999; Moraes *et al.* 2013). Furthermore, the RVLM presympathetic neurons can serve as an O<sub>2</sub>-sensor in central nervous system (Sun *et al.*, 1992; Guyenet, 2000), in situations of acute hypoxia, contributing to hypoxia responses resulting in changes of pattern of firing frequency of these neurons (Neubauer *et al.*,

1990; Sun & Reis, 1994, Kawai *et al.*, 1999; Mazza *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; D`Agostino *et al.* 2008; Koganezawa & Paton, 2014).

Considering that the RVLM presympathetic neurons are sensitive to hypoxia, the aim of the present study was evaluate in what extension a previous exposition to CIH play a protective role on RVLM presympathetic neurons when exposed to a new and acute episodes of hypoxia.

## **METHODS**

Male Wistar rats (P 23) were provided by the Animal Care Facility of the Campus of Ribeirão Preto at the University of São Paulo (USP). All experimental protocols were approved by Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CEUA) of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (protocol # 134/2011).

### ***Microinjection of retrograde fluorescent tracer into the intermediate lateral column of spinal cord***

Male *Wistars* rats (P23) under ketamine (75 mg.kg<sup>-1</sup>, I.P., Agener União, Pouso Alegre, MG, Brazil) and xylazine (5 mg.kg<sup>-1</sup>, I.P., Hertape Calier, Jatuaba, MG, Brazil) anesthesia were fixed in a stereotaxic apparatus (David Kopf, Tujunga, CA, USA) for bilateral microinjection of the retrograde fluorescent tracer Red Retrobeads (100 nL; LumaFluor Inc., Naples, FL, EUA) into the intermediolateral column of the spinal cord at T3-T5 level (Sun *et al.*, 1988; Almado *et al.*, 2013). After surgery,

animals received 0,1 mL of pentabiotic (1.200.000 UI/3 mL, I.M. - Fontoura-Wyeth, Brasil) and 0,1 mL of analgesic (flunixin meglumine, 50 mg/mL, I.M. - Schering-Plough, Cotia, SP, Brasil) and were maintained in standard environmental conditions (23°C; 12/12 dark/light cycle) with water and food *ad libitum*.

### ***Chronic intermittent hypoxia protocol***

After two days for post-surgical recovery, animals were randomly assigned to CIH or normoxic protocol. The CIH protocol used in the present work was described in previous studies from our laboratory (Zoccal *et al.* 2008, 2009; Almado *et al.*, 2012; Perin *et al.*, 2015). The animals were kept in collective cages inside Plexiglass chambers (volume ~ 210 L) with food and water *ad libitum*. One chamber for the control group and another for the CIH group, both equipped with gas injectors and sensors for O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, temperature and humidity. The CIH group was exposed to intermittent episodes of hypoxia, which consisted of a period of 4 min injection of nitrogen (N<sub>2</sub>) in order to reduce the fraction of inspired O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub>) inside the chamber from 20.8% to 6%, and remained at this level for 30-40 seconds. Then, O<sub>2</sub> was injected into the chamber to return to FiO<sub>2</sub> 20.8% level at which remained for 5 minutes before start a new cycle of hypoxia. Thus, rats from the CIH group were submitted to a FiO<sub>2</sub> 6% for 30-40 seconds every 9 minutes, as described by Zoccal *et al.* (2008, 2009). The CIH protocol was repeated 8 hours a day (08:30 to 16:30) for 10 days. In the remaining 16 hours (from 16:30 to 08:30), the animals were kept under normoxic conditions (FiO<sub>2</sub> 20.8%). The injection of N<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> (White Martins, Sertãozinho / SP, Brazil) into the chambers was regulated by a solenoid valve system (Oxycycler, A84XOV Model;

Biospherix, Redfield, NY, USA), which were automatically operated by an appropriate software (Anawin 2, version 2.4.17). In the same room, control rats were kept in a similar chamber, but in normoxic conditions ( $\text{FiO}_2$  20.8%), 24 hours a day during 10 days. In both CIH and control chambers, the gases injection occurred at the top of the chamber to avoid air jets directly on the animal, which might cause discomfort to them.

### ***Whole-cell patch-clamp of labeled RVLM presympathetic neurons***

At the end of 10 days of CIH or normoxic protocol, rats (P 35) were deeply anesthetized with halothane (Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil) and transcardially perfused with speed constant flux, with 50-60 ml of a ice-cold modified artificial cerebrospinal fluid (gaCSF; Ye et al., 2006; Almado et al, 2014), which contains (in mM): 250 glycerol, 2.5 KCl, 1.2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.2  $\text{MgCl}_2$ , 2.4  $\text{CaCl}_2$ , 26  $\text{NaHCO}_3$  and 25 glucose, at 4°C (330-350 mOsm/kg, pH 7.4; bubbled with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ ). Then the rats were decapitated with guillotine, the brainstem was carefully removed and immersed in gaCSF solution continuously bubbled with carbogenic mixture (95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ ). Coronal section of brainstem containing the ventral medulla (RVLM) and the presympathetic neurons were obtained using a vibratome (VT1200S - Leica Nusslock, Germany), which the blade for cutting was previously calibrated. Slices of 200  $\mu\text{m}$  thick were incubated in 100 mL of a solution containing 50 mL aCSF (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25  $\text{NaHCO}_3$ , 25 glucose and 0,4 ascorbic acid (310-330 mOsm/kg, pH 7.4; bubbled with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ ) and 50 mL gCSF, kept at 31° C for 30 minutes. Before starting the electrophysiological recordings, slices were kept at room temperature (23–25° C).

### ***Identification of labeled RVLM presympathetic neurons***

Each slice was carefully submerged into the recording chamber, held in place with nylon grids to a platinum frame and continuously perfused with oxygenated aCSF solution at a rate of 2-3 ml/min (Accorsi-Mendonça, 2015) at 31°C maintained by a temperature controller device (TC-344B, Warner Instruments, Hamden, Connecticut, USA). Using a microscope equipped with epifluorescence set (Olympus BX51WI - Olympus, Tokyo, Japan), we identified the ventral medulla (RVLM) in the brainstem slices taken a compact formation of the nucleus ambiguus and the inferior olivary complex (Saywell & Feldman, 2004) as landmarks. According to studies by Hwang & Dun (1998) the RVLM region can be recognized in the coronal slice of the brain stem as a slightly dark area ventral to the nucleus ambiguus and lateral to paragigantocellular nucleus at the level of the rostral aspect of the area postrema (Figure 1A). RVLM presympathetic neurons were visualized by oblique illumination using an 40x water immersion objective coupled to a CCD camera (C7500-50, Hamamatsu, Iwata-City, Japan). By turning on the fluorescence we were able to identify RVLM presympathetic neurons retrogradely labeled (Figure 1B).

### ***Whole-cell patch-clamp electrophysiological recording***

Patch pipettes were manufactured from borosilicate glass capillaries with thick walls (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) using a horizontal stretcher (P-97 puller, Sutter Instruments, Novato, CA, USA) and filled with internal solution containing (mM): 130 K-gluconate, 10 KCl, 3 Mg-ATP, 0,2 Na-GTP, 5 EGTA e 10 HEPES (310-

320 mOsm /kgH<sub>2</sub>O) and pH 7.4, adjusted with KOH. The final resistance of microelectrodes when filled with this solution was 3-6 MΩ. The signals were obtained using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Sunnyvalley, CA, USA) connected to a computer via a Digidata 1440A board (Axon Instruments). Data were low-pass filtered at 2 kHz and acquired at 10 kHz. All experiments were carried out at 31° C. Spontaneous baseline firing frequency of RVLM presympathetic neurons were recorded for 5 minutes in ACSF equilibrated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. To analyze the intrinsic electrophysiological properties, slices were then perfused with ACSF containing a cocktail of antagonists of receptors of excitatory and inhibitory neurotransmitters in order to produce a complete synaptic blockade [picrotoxin (100 μM), AP-5 (40 μM), DNQX (10 μM) and strychnine (1 μM)] and the control of temperature at 31° C. All drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

### *Acute hypoxia*

In order to evaluate the effects of acute hypoxia on intrinsic electrophysiological properties of RVLM presympathetic neurons, aCSF containing synaptic blockers bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> used for perfusion of the slices was replaced by aCSF bubbled with a gas mixture [95% N<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, (hypoxia solution)] and containing synaptic blockers. Slices were perfused for 2 min with hypoxic solution and then the slices were perfused with oxygenated aCSF (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) for 5 min in order to evaluate if the cells remain viable after the hypoxia challenge.

### ***Data analysis***

In order to evaluate the membrane potential values, in all recorded cells we took into account a calculated liquid junction potential of -14 mV. Considering that RVLN presympathetic neurons present a pacemaker activity, the resting membrane potential (RMP) and input resistance ( $R_{input}$ ) was analyzed using the same methods previously described by da Silva *et al.*, (2013) and Almado *et al.*, (2014).

### ***Statistical analysis***

Data were measured and analysed using Clampfit (pClamp 10, Axon Instruments, Sunnyvalley, CA, USA). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Students paired *t* test and One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey`s pot hoc test were performed using GraphPad Prism 5 software (Graphpad Prism, San Diego, CA, USA). The level of statistical significance was considered as  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Effects of AH on the intrinsic electrophysiological properties of RVLM presympathetic neurons in brainstem slices from young adult rats of control group

These experiments were performed in the brainstem slices from young adult rats to analyze the electrophysiological profile of RVLM presympathetic neurons sending projections to IML, and also to evaluate how these cells respond to an acute hypoxia challenge. As show in figure 2A, we performed *whole-cell patch-clamp* recordings of labeled RVLM presympathetic neurons, which presented a typical auto-depolarization activity, similar to described in previous studies by Sun *et al.* (1988), Moraes *et al.* (2013) and Almado *et al.* (2014). To analyze the possible effects of acute hypoxia on the intrinsic electrophysiological properties of these neurons, the slices were perfused with aCSF containing a cocktail of antagonists of receptors of excitatory and inhibitory neurotransmitters for a complete synaptic blockade (SB).

We observed that acute hypoxia produced no changes the intrinsic firing frequency rate (SB =  $5.03 \pm 0.4$  Hz vs AH =  $5.24 \pm 0.3$  Hz; n=39; p>0.05) (Figure 2A), resting membrane potential (RMP) (SB =  $-64.5 \pm 0.5$  mV vs AH =  $-64.3 \pm 0.5$  mV; n=39; p>0.05) (Figure 2C) and in the Rinput (SB =  $367 \pm 20$  M $\Omega$  vs AH =  $348 \pm 22$  M $\Omega$ ; n=19; p > 0.05) (Figure 2D). In order to make a fine analysis of the effect of AH on the intrinsic firing frequency, we normalized the data in relation to pre-hypoxia period (SB (Figure 2B). The results demonstrated that AH reveals three distinct subpopulations of RVLM presympathetic neurons in relation to their changes in the intrinsic firing frequency. In order to classify these three subpopulations, identified by normalizing data, we used the value of firing frequency at the end of 2 min to AH and



compared with the frequency obtained in the pre-hypoxia period (SB). The neurons classified as *group I* presented absolute value of frequency after AH higher than SB frequency more twice the SEM ( $AH \geq SB + 2 \text{ SEM}$ ). The neurons classified as *group II* were those showing no change in firing frequency when compared to the respective baseline (SB). The neurons classified as *group III* were those that presented after AH absolute value of frequency lower than SB frequency least twice SEM ( $AH \leq SB - 2 \text{ SEM}$ ).

The *Group I* presented a significant increase in normalized firing frequency after AH [(SB:  $101.2 \pm 3.4 \%$  vs AH:  $154.5 \pm 17.7\%$ ;  $n = 11$ ;  $**p < 0.01$ ) (Figure 3B)] and the absolute firing rate [(SB:  $4.90 \pm 0.9 \text{ Hz}$  vs AH:  $6.9 \pm 1 \text{ Hz}$ ;  $n = 11$ ;  $**p < 0.01$ ) (Figure 3C)]. In relation to intrinsic passive properties, the AH significantly increased the RMP [(SB:  $-64.09 \pm 0.76 \text{ mV}$  vs AH:  $-62.36 \pm 0.14 \text{ mV}$ ;  $n = 40$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 4B)] but no change was observed in the Rinput [(SB =  $401.2 \pm 47 \text{ M}\Omega$  vs AH =  $390 \pm 70 \text{ M}\Omega$ ;  $n=7$ ;  $p > 0.05$ ) (Figure 4C)].

In the *Group II*, the normalized firing frequency was not affected by AH [(SB:  $100.5 \pm 3 \%$ ; vs AH =  $107.8 \pm 3.9 \%$ ;  $n=21$ ;  $p > 0.05$ ) (Figure 5B)] neither the absolute firing rate [(SB:  $4.80 \pm 0.5 \text{ Hz}$  vs AH:  $5.36 \pm 0.6 \text{ Hz}$ ;  $n = 21$ ;  $p > 0.05$ ) (Figure 5C)]. Besides the lack of changes in the firing frequency of the recorded RVLM presympathetic neurons from *group II*, the intrinsic passive properties were also not affected by AH: RMP [(SB:  $-61.50 \pm 0.6 \text{ mV}$  vs AH:  $-61.43 \pm 0.7 \text{ mV}$ ;  $n = 21$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 6B)] and the Rinput [(SB =  $387 \pm 27 \text{ M}\Omega$  vs AH =  $369 \pm 24 \text{ M}\Omega$ ;  $n=17$ ;  $p > 0.05$ ) (Figure 6C)].

The *group III* presented a significant decrease in the normalized firing frequency by AH [(SB =  $95 \pm 5.53\%$  vs AH =  $48.01 \pm 13.16 \%$ ;  $n=8$ ;  $p < 0.01$ ) (Figure 7B)] but

not significant difference in absolute values of firing rate [(SB:  $7,3 \pm 1,1$  Hz vs AH:  $3,6 \pm 0,7$  Hz;  $p < 0,05$ ) (Figure 7C)], RMP [(SB:  $-62,6 \pm 1,3$  mV vs AH:  $-66,1 \pm 2,4$  mV;  $p > 0,05$ ) (Figure 8B)] and the Rinput [(SB:  $365 \pm 39$  M $\Omega$  vs AH:  $297 \pm 53$  M $\Omega$  ; n=6;  $p > 0,05$ ) (Figure 8C)]. The results of control group showed that AH revealed 3 subpopulations of RVLM presympathetic neurons with distinctin pattern of firing in response to AH.

### **Effects of AH on the intrinsic properties of RVLM presympathetic neurons from CIH rats**

Previous studies from our laboratory (Almado *et al.*, 2014) showed that the intrinsic firing rate of RVLM presympathetic neurons from young adult rats previously submitted for 10 days to CIH protocol was not altered. To assess the responsiveness of RVLM presympathetic neurons from CIH and control rats to a new episode of acute hypoxia, we evaluate the effects of AH protocol on the intrinsic passive electrophysiological properties of these neurons including the intrinsic firing rate. We obtained electrophysiological recordings of 31 RVLM presympathetic neurons from CIH rats and all recorded neurons showed intrinsic pacemaker activity. These results are in agreement with previous studies from our laboratory performed in CIH rats using the technique of whole-cell patch-clamp in the brain stem slices of rat young adults (Almado *et al.*, 2014) as well in the working heart-brain stem preparation (Moraes *et al.*, 2013), which clearly documented that RVLM presympathetic neurons are pacemakers.

We analyzed the effects of AH protocol on the intrinsic firing rate of RVLM presympathetic neurons of brainstem slices from CIH rats recorded in the presence of synaptic blockade and observed that after exposure to AH, the intrinsic firing rate of RVLM

presympathetic neurons was significantly increased [(SB:  $6.31 \pm 0.75$  Hz vs AH:  $7.25 \pm 0.81$  Hz; \*  $p < 0.05$ ,  $n = 31$ ; (Figure 9)].

After normalization of the firing frequency, we classified the recorded neurons using the same criteria used for the control group. After analyzing the intrinsic firing frequency before and after the AH two subpopulations of RVLM presympathetic neurons from CIH rats were revealed: *i*) 9 neurons increased firing frequency and *ii*) 22 presented no changes in firing frequency after AH protocol.

The *Group I* are the neurons in which the AH protocol significantly increased the firing rate [(SB:  $4.66 \pm 0.85$  Hz vs AH:  $8.20 \pm 1.36$  Hz, \*  $p < 0.05$ ,  $n = 9$ ; (Figure 10B)], but produced no changes in the RMP [(SB:  $-62.98 \pm 0.81$  mV vs. AH:  $-62.50 \pm 0.47$  mV,  $p > 0.05$ ; (Figure 11B)] and  $R_{input}$  [(SB:  $396.4 \pm 37.1$  M $\Omega$  vs. AH:  $356.8 \pm 36.07$  M $\Omega$ ,  $p > 0.04$ ,  $n = 8$ ; (Figure 11C)].

The *Group II* are the neurons in which the AH protocol produced no changes in the intrinsic firing frequency after AH [(SB:  $6.99 \pm 0.97$  Hz vs AH:  $6.83 \pm 1.00$  Hz,  $p > 0.05$ ,  $n = 22$ ) (Figure 12B)], no changes in the RMP (SB:  $-64.50 \pm 0.74$  mV vs. AH:  $-65.02 \pm 0.71$  mV,  $p > 0.05$ ,  $n = 22$ ; (Figure 13B)] and  $R_{input}$  (SB:  $435.9$  M $\Omega \pm 37.52$  vs. AH:  $469 \pm 34.65$  M $\Omega$ ,  $p > 0.05$ ,  $n = 8$ ; (Figure 13C)].

### ***Comparison of the effects of AH on neurons from CIH and control groups***

We also compared the intrinsic firing rate of all recorded RVLM presympathetic neurons from control ( $n = 39$ ) and CIH rats ( $n = 31$ ) independently of their classification into Group I, II and III, in order to compare the excitability of RVLM presympathetic neurons from CIH and control rats.

The data shows no significant difference in the frequency of basal firing of the control group compared to the CIH group [control=  $5.03 \pm 0.4$  Hz, (n=39) vs. CIH:  $6.30 \pm 0.7$  Hz, (n=31); Mann Whitney test,  $p > 0,05$ ; (Figure 14)], as showed by Almado *et al* (2014). Since CIH produced no change in the intrinsic baseline firing rate between groups, we also evaluated the effects of AH on the firing frequency of CIH and control group and we verified that RVLM presympathetic neurons of rats previously exposed to CIH presented a significant increase in the firing rate after AH [Control:  $5.24 \pm 0.3$  Hz, (n=39) vs. CIH:  $7.25 \pm 0.8$  Hz, (n=31);  $*p < 0,05$ ; (Figure 14)], suggesting that AH increase the excitability of RVLM presympathetic neurons from CIH. However, in regard of the effects of CIH, we observed that the percentual distribution of recorded cells in the control and CIH group in relation to each subpopulation revealed by AH was different between the groups (Figure 15). The data showed that the firing rate of 54 % of all recorded neurons from control rats were not affected by AH while in the CIH group 71% were not affected by AH (Figure 15). The percentages of RVLM presympathetic neurons that increased firing frequency after AH was similar between groups (Control= 28%, n = 11 vs. CIH = 29%, n = 9) while none of the RVLM presympathetic neurons decreased the firing rate after HA in CIH group (Control = 20 %, n = 7 vs CIH = 0 %, n = 0).

Although the of RVLM presympathetic neurons of CIH group presented firing rate higher than neurons from control group in response to AH, in the CIH group only two subpopulations were revealed by AH. Furthermore, in the CIH group of neurons submitted to AH, the number of cells presenting no changes in the frequency discharge was higher than in control group, suggesting a protective effect by CIH in response to AH.

## DISCUSSION

The RVLM presympathetic neurons located in the rostroventrolateral medulla (RVLM) are involved in the generation of the sympathetic activity and control of arterial blood pressure (Feldberg & Guertzenstein, 1972; Guertzenstein & Silver, 1974; Stein *et al.*, 1989; Sakima *et al.*, 2000; Guyenet, 2006) and they send projections to pre-ganglionic sympathetic neurons in the intermediolateral column (IML) in the spinal cord (Morrison *et al.*, 1988; Sun *et al.*, 1988; Dampney *et al.*, 2002). In this study performed in young adult rats (P-35), we are showing that all recorded RVLM presympathetic neurons sending projections to thoracic IML presented persistent intrinsic auto-depolarization activity after synaptic blockade. Besides, the range of variation of the firing frequency observed in the present study are similar to those observed by Almado *et al.* (2014) and Sun *et al.* (1988). These findings are in accordance with previous electrophysiological studies of these neurons in brainstem slices from juvenile (Sun *et al.* 1988; Kangrga & Loewy, 1995), in slices from young adult rats (Almado *et al.* 2014) and in the working-heart brainstem-preparation from juvenile rats (Moraes *et al.* 2013).

The modulation of RVLM presympathetic neurons is dependent of excitatory and inhibitory neural inputs from different areas in the brain, which may affect the activity of these neurons through the release of different excitatory / inhibitory neurotransmitters and neuromodulators on synaptic contacts in these neurons (Guertzenstein & Silver, 1974; Brown and Guyenet, 1985; Dampney, 1994; Patel *et al.* 2001; Scheihofer *et al.* 2000; Schreihofer and Guyenet 2002; Guyenet, 2006). Although several segments of the neural networks were removed to obtain brainstem slices in this study, the RVLM

presympathetic neurons continued to receive synaptic modulation of the remaining neural networks in the slice and this evidence was observed by the decrease of the firing rate of the RVLM presympathetic neurons after the blockade of synaptic inputs. Recent studies from our laboratory (Moraes *et al.* 2013) using an *in situ* working heart-brainstem preparation from juvenile rats, demonstrated three types of respiratory-modulated RVLM presympathetic neurons as well a fourth type showing no respiratory-related modulation.

Besides the key role played by RVLM presympathetic neurons in cardiovascular autonomic control, the activity of these neurons is strongly modulated by challenges such as hypoxia and hypercapnia (Sun & Reis, 1994; Derghacheva et al, 2009; Kamendi et al., 2009, Koganezawa & Paton, 2014). In this study, we evaluated the effects of AH on the intrinsic electrophysiological properties of RVLM presympathetic neurons from CIH and control rats. The results are showing that, in relation to intrinsic firing rate of control group, AH exposure revealed three subpopulations of RVLM presympathetic neurons: a) neurons increasing firing rate; b) neurons presenting no change in the firing rate, and c) neurons decreasing the firing rate, while in the neurons from the CIH group only two subpopulations were revealed: a) neurons increasing firing rate, and b) neurons presenting no changes in the firing rate. To knowledge this study is the first to show the existence of subpopulations of RVLM presympathetic neurons in response to AH performed in young adult rats in CIH and control group.

Regarding the excitability of RVLM presympathetic neurons, previous studies performed in neonate rats demonstrated that these neurons are reversible excited or inhibited by cytotoxic hypoxia induced by sodium cyanide (NaCN) (Mazza *et al.*, 2000). Studies by D`Agostino *et al.* (2008), documented that hypoxic hypoxia produced

changes in the resting membrane potential and that the majority of recorded RVLM presympathetic neurons depolarized and increased the firing frequency while some neurons were hyperpolarized. In addition, there is evidence that in these neurons when submitted to brief periods of cytotoxic or hypoxic hypoxia the voltage-dependent currents are activated, including a  $I_{NaP}$  and calcium currents (Kawai *et al.*, 1999).

Studies by Koganezawa & Paton (2014) showed that RVLM presympathetic neurons are sensitive to hypoxia/hypercapnia, suggesting that in situations of brainstem hypoperfusion, these neurons would have an intrinsic chemosensitivity that could be signaled by changes in local microcirculation or by astrocytes. Previous studies by Sun & Reis (1994a) documented an increased firing rate of RVLM presympathetic neurons in response to a brief hypoxia challenge, suggesting that the sensitivity to hypoxia is due to the  $Ca^{2+}$  inward current. This inward current depolarizes the membrane of the cell and increases the firing frequency of neurons. Excitatory responses produced by hemoxygenase-2 (HO-2) in hypoxic conditions depend on an intracellular  $Ca^{2+}$  increase and involve the modulation of the conductivity of ion channels (Mazza *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2004; D'Agostino *et al.*, 2009). Although different methodological approaches were used in studies from the literature about this issue, our results showing that RVLM presympathetic neurons increased the frequency of depolarization in response to AH, are in agreement with those showing that RVLM presympathetic neurons are sensitive to AH and that this challenge can increase the firing rate of these neurons by mechanisms not yet identified.

The subpopulation of RVLM presympathetic neurons showing a decrease in the firing rate in response to AH was observed only in the control group. Studies showed that the activation of GABA receptors on these neurons produces an increase in the inward

rectifier potassium current, resulting in a reduction of the frequency of firings (Li & Guyenet, 1996; Lin et al., 1998). Considering that in the present study GABAergic receptors were blocked, we suggest that other potassium currents can be involved in the response to AH of this subpopulation. With respect to the possible cellular mechanisms activated in response to hypoxia situations, studies suggest the involvement of Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel (BK<sub>Ca</sub>), which are responsible for hyperpolarization after potential phase that follows each action potential (Brown *et al.*, 1979) and may sense acute decreases in O<sub>2</sub> levels due to affinity for HO-2, as well as the voltage-gate K<sup>+</sup> channels (Kv) sensitive to oxygen, identified in NTS neurons (Kemp *et al.*, 2009).

Our data are showing that AH increased in the excitability of RVLM presympathetic neurons from CIH rats. We hypothesized that CIH induced a protective role on RVLM presympathetic neurons when exposed to a new episodes of hypoxia. Experimental evidence indicates that the adaptation to hypoxia reflect, at least, in cellular and molecular changes in important areas which have an intrinsic chemosensitivity (Molkov *et al.*, 2011; Dempsey *et al.*, 1985). Preconditioning include ischemic events of short duration, hypoxia, hypercapnia and other factors such as: the activation of glutamate receptors (Perez-Pinzon, et al., 1997), adenosine receptors A1 and A2 (Boeck et al. , 2004, 2005, Hiraide, et al, 2001) the release of nitric oxide and cytokines (Huang, 2004). There is evidence that the ATP is a major modulator released into the ventral surface of the brainstem under hypoxic conditions (Gourine et al., 2005). Studies by Zoccal et al., (2011) showed by immunoblotting experiments, that the expression of P2X3 and P2X4 subtypes of purinergic receptors are increased in VLM of CIH rats, suggesting that these receptors are important mediators of ATP-dependent responses evoked by hypoxia as well as this stimulus may modulate their expression.



Zhang et al., (2012) demonstrated that the expression of P2X2 purinergic receptors is increased in RVLM neurons after hypoxia and the blockade of these receptor by microinjection with PPADS (P2 receptor antagonist) attenuated the respiratory responses evoked by hypoxia.

With respect to the increased of HO-1 expression in chronic hypoxia situations, studies by Sunderram *et al.*, (2009) suggest that the expression HO-1 in C1 neurons and in pre-BötC complex is from fourth day after the chronic hypoxia exposure. In accordance with these authors, this induction of HO-1 expression is a time dependent expression important for the chemosensitivity of the respiratory neurons from pre-BötC complex and the simpatoexcitation in C1 neurons.

Previous studies from our laboratory (Braga et al., 2006; Zoccal et al, 2007; Zoccal et al, 2008; Moraes et al., 2013), showed that the sympathetic overactivity observed in rats exposed to CIH is due to changes in the coupling between sympathetic and respiratory activity. These changes occur more specifically at the end of expiration and it is independent of any change in intrinsic electrophysiological properties of RVLM presympathetic neurons produced by CIH (Moraes et al., 2013; Almado et al., 2014).

In the present study we observed that AH revealed two subpopulations of RVLM presympathetic neurons from CIH group and that the percentual of these recorded neurons presenting no changes in the firing rate in response to AH was higher than in the neurons of the control group, suggesting a protective mechanism produced by CIH. Our data are also showing that the AH revealed different subpopulations of RVLM presympathetic neurons in control and CIH rats. Furthermore, CIH produced a

protective effect on the intrinsic excitability of presympathetic neurons in response to AH, but the mechanism that underlying these response requires further investigation.

## REFERENCES

- Accorsi-Mendonça D, Almado CE, Bonagamba LG, Castania JA, Moraes DJ, Machado BH (2015). Enhanced firing in NTS induced by short-term sustained hypoxia is modulated by glia-neuron interaction. *J Neurosci*, 35(17):6903-6917.
- Almado CEL, Leão RM & Machado BH (2014). Intrinsic properties of rostral ventrolateral medulla pre-sympathetic and bulbospinal respiratory neurons of young adult rats are not affected by chronic intermittent hypoxia. *Exp. Physiol.* 99.7: 937-950.
- Barros RC, Bonagamba LG, Okamoto-Canesin R, de Oliveira M, Branco LG, Machado BH (2002) Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton Neurosci* 97:110-115.
- Boychuk CR, Woerman AL & Mendelowitz D (2012). Modulation of bulbospinal rostral ventral lateral medulla neurons by hypoxia/hypercapnia but not medullary respiratory activity. *Hypertension*. 60(6):1491-7.
- Braga VA, Soriano RN, Machado BH (2006) Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol* 91:1025-1031.
- Brown DL & Guyenet PG (1985). Electrophysiological study of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla in rats. *Circ Res* 56(3):359-69.
- Burke PGR, Neale J, KORIM WS, McMullan S & Goodchild AK (2011). Patterning of somatosympathetic reflexes reveals nonuniform organization of presympathetic drive from C1 and non-C1 RVLM neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 301: R1112-22.
- D'Agostino D, Mazza E Jr & Neubauer JA (2009). Heme oxygenase is necessary for the excitatory response of cultured neonatal rat rostral ventrolateral medulla neurons to hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(1):R102-18.
- da Silva MP, Ventura RR & Varanda WA (2013). Hypertonicity increases NO production to modulate the firing rate of magnocellular neurons of the supraoptic nucleus of rats.
- Dampney RA (1994). Functional Organization of Central Pathway Regulating the Cardiovascular System. *Physiological Reviews* 74 (2).
- Dampney RA, Coleman MJ, Fontes MA, Hirooka Y, Horiuchi J, Li YW, Polson JW, Potts PD, Tagawa T (2002). Central mechanisms underlying short-and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29(4):261-268.
- Dampney RA, Horiuchi J, Tagawa T, Fontes MA, Potts PD & Polson JW. (2003). Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. *Acta Physiol Scand* 177, 209-218.

- Dergacheva O, Boychuk CR & Mendelowitz D (2012). Developmental changes in GABAergic neurotransmission to presympathetic and cardiac parasympathetic neurons in the brainstem. *J Neurophysiol* 110:672-9.
- Feldberg W, Guertzenstein PG (1972) A vasodepressor effect of pentobarbitone sodium. *J Physiol* 224:83-103.
- Fletcher EC (2001) Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 90:1600-1605.
- Gidday JM (2006) Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* 7(6):437-448.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N & Spyer KM (2005). Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. *J Neurosci* 25(5):1211-18.
- Guertzenstein PG & 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(2): 489-503.
- Guyenet PG (1990). Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation: in Loewy AD, Spyer MK: *Control Regulatory of Autonomic Functions*. London, Oxford University Press, 145-167.
- Guyenet PG (2000) Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. *Respir Physiol*, 121(2-3):147-162. Review.
- Guyenet PG (2006) The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7:335-346.
- Kamendi HW, Cheng Q, Dergacheva O, Gorini C, Jameson HS, Wang X, McIntosh JM, Mendelowitz D (2009). Abolishment of serotonergic neurotransmission to cardiac vagal neurons during and after hypoxia and hypercapnia with prenatal nicotine exposure. *J Neurophysiol*, 101(3):1141-1150.
- Kangrga IM & Loewy AD (1995). Whole-cell recordings from visualized C1 adrenergic bulbospinal neurons: ionic mechanisms underlying vasomotor tone. *Brain Res.* 670(2):215-32.
- Kawai Y, Qi J, Comer AM, Gibbons H, Win J & Lipski J (1999) Effects of cyanide and hypoxia on membrane currents in neurons acutely dissociated from the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Brain Res.* 5; 830 (2): 246-57.
- Kemp PJ, Telezhkin V, Wilkinson WJ, Mears R, Hanmer SB, Gadeberg HC, Müller CT, Riccardi D & Brazier SP (2009). Hypoxia and Consequences. *Ann N.Y. Acad. Sci.*1177:112-118.
- Koganezawa T & Paton JF (2014). Intrinsic chemosensitivity of rostral ventrolateral medullary sympathetic premotor neurons in the in situ arterially perfused preparations of rats. *Exp Physiol* 99:1453-56.
- Li YW & Guyenet PG (1995). Neuronal excitation by angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla of the rat in vitro. *Am J Physiol* 268:272-7.
- Li YW & Guyenet PG. (1996) Activation of GABAB receptors increases a potassium conductance in rat bulbospinal neurons of the C1 area. *Am J Physiol.* 271(5):R1304-10.

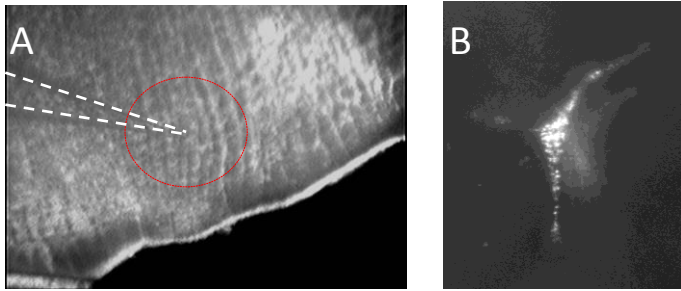
- Lipski J, Kanjhan R, Kruszewska B & Rong W (1996). Properties of presympathetic neurones in the rostral ventrolateral medulla in the rat: an intracellular study "in vivo". *J Physiol.* 1;490 ( Pt 3):729-44.
- Lipski J, Kawai Y, Qi J, Comer A & Win J (1998). Whole cell patch-clamp study of putative vasomotor neurons isolated from the rostral ventrolateral medulla. *Am J Physiol.* 274(4 Pt 2):R1099-110.
- Machado BH (2001) Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Ann N Y Acad Sci* 940:179-196.
- Mazza EJ, Edelman NH & Neubauer JA (2000). Hypoxia excitation in neurons cultured from the rostral ventrolateral medulla of the neonatal rat. *J Appl Physiol.* 88(6):2319-2329.
- Molkov YI, Zoccal DB, Moraes DJ, Paton JF, Machado BH & Rybak IA (2011). Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *J Neurophysiol.* 105:3080-3091.
- Moraes DJA, da Silva MP, Bonagamba LG, Mecawi AS, Zoccal DB, Antunes-Rodrigues J, Varanda WA & Machado BH (2013). Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by respiratory network in rats. *J Neurosci.* 33(49):19233-37.
- Morrison SF, Milner TA, Reis DJ. 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.
- Neubauer JA, Melton JE & Edelman NH (1990). Modulation of respiration during brain hypoxia. *J Appl Physiol* 68(2):441-51.
- Patel AJ, Honore E (2001) Molecular physiology of oxygen-sensitive potassium channels. *Eur Respir J* 18:221-227.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* London: Academic Press; 1998.
- Perez-Pinzon MA, Rosenthal M, Sick TJ, Lutz PL, Pablo J, Mash D (1992) Downregulation of sodium channels during anoxia: a putative survival strategy of turtle brain. *Am J Physiol* 262:R712-715.
- Perin RR, Bonagamba LG, Machado BH (2015). Cardiovascular and respiratory outcome of preconditioned rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol*, 100(9):1008-1017.
- Prabhakar NR, Peng YJ, Jacono FJ, Kumar GK, Dick TE (2005) Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32:447-449.
- Sakima A, Yamazato M, Sesoko S, Muratani H, Fukiyama K (2000) Cardiovascular and sympathetic effects of L-glutamate and glycine injected into the rostral ventrolateral medulla of conscious rats. *Hypertens Res* 23(6):633-641.

- Saywell SA & Feldman JL (2004). Dynamic interactions of excitatory and inhibitory inputs in hypoglossal motoneurons: respiratory phasing and modulation by PKA. *J Physiol* 1;554(Pt 3): 879-889.
- Schreihofner AM & Guyenet PG (2000). Sympathetic reflexes after depletion of bulbospinal catecholaminergic neurons with anti-DbetaH-saporin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279(2):R729-42.
- Schreihofner AM & Guyenet PG (2002). The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29(5-6):514-521.
- Sun MK (1995). Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. *Prog. Neurobiol.* 47, 157–233.
- Sun MK, Jeske IT & Reis DJ (1992). Cyanide excites medullary sympathoexcitatory neurons in rats. *Am J Physiol*. 262(2 Pt 2):R182-9.
- Sun MK & Reis DJ (1994a). Hypoxia selectively excites vasomotor neurons of rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol*. 266: 245-256.
- Sun MK & Reis DJ (1994b). Hypoxia-activated  $Ca^{2+}$  currents in pacemaker neurons of rat rostral ventrolateral medulla in vitro. *J of Physiol*. 476: 101-116.
- Sun MK, Young BS, Hackett JT & Guyenet PG (1988). Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostral ventrolateral medulla with putative sympathoexcitatory function: an intracellular study in vitro. *Brain Res* 442, 229–239.
- Sunderram J, Semmlow J, Thakker-Varia J, Bhaumik M, Hoang-Le O & Neubauer JA (2009). Heme oxygenase-1-dependent central cardiorespiratory adaptations to chronic hypoxia in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 297: 300–312, 2009.
- Wang G, Zhou P, Repucci MA, Golanov EV & Reis DJ (2001). Specific actions of cyanide on membrane potential and voltage-gated ion current in rostral ventrolateral medulla neurons in rat brainstem slices. *Neurosci Lett* 309:125-9.
- Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C & Kemp PJ (2004). Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* 306: 2093–2097.
- Zhang L, Wang H, Li Q, Zhan R, Yu SY (2012) Purinergic modulation of hypoxic regulation via the rostral ventral lateral medulla in rats. *Resp Physiol Neurobiol* 184: 48-54.
- Zoccal DB, Bonagamba LG, Paton JF, Machado BH (2009) Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Exp Physiol* 94:972-983.
- Zoccal DB, Bonagamba LG, Oliveira FR, Antunes-Rodrigues J, Machado BH (2007) Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol* 92:79-85.

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

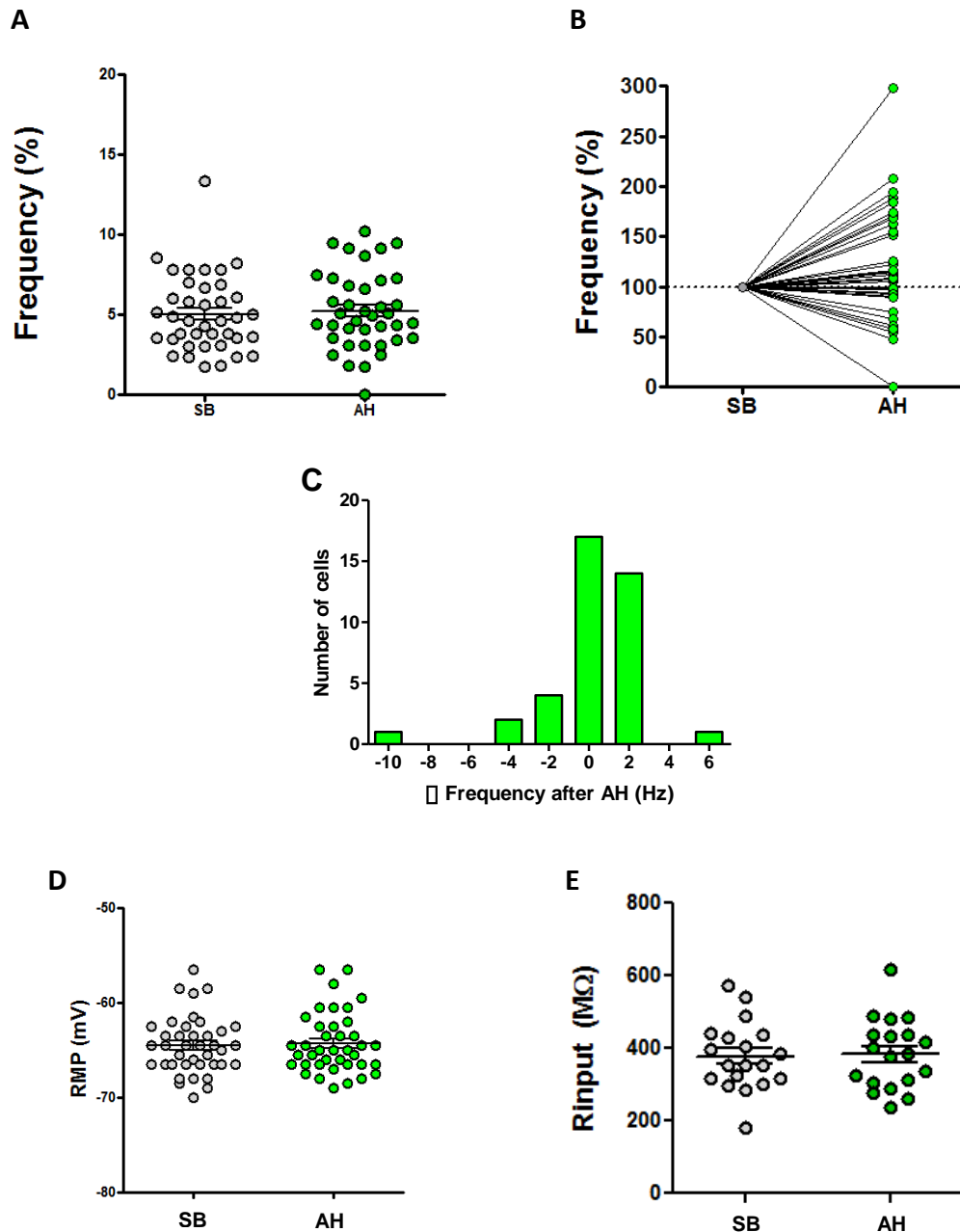
Zoccal DB & Machado BH (2011) Coupling between respiratory and sympathetic activities as a novel mechanism underpinning neurogenic hypertension. *Curr Hypertens Rep* 13:229-36.

## FIGURES

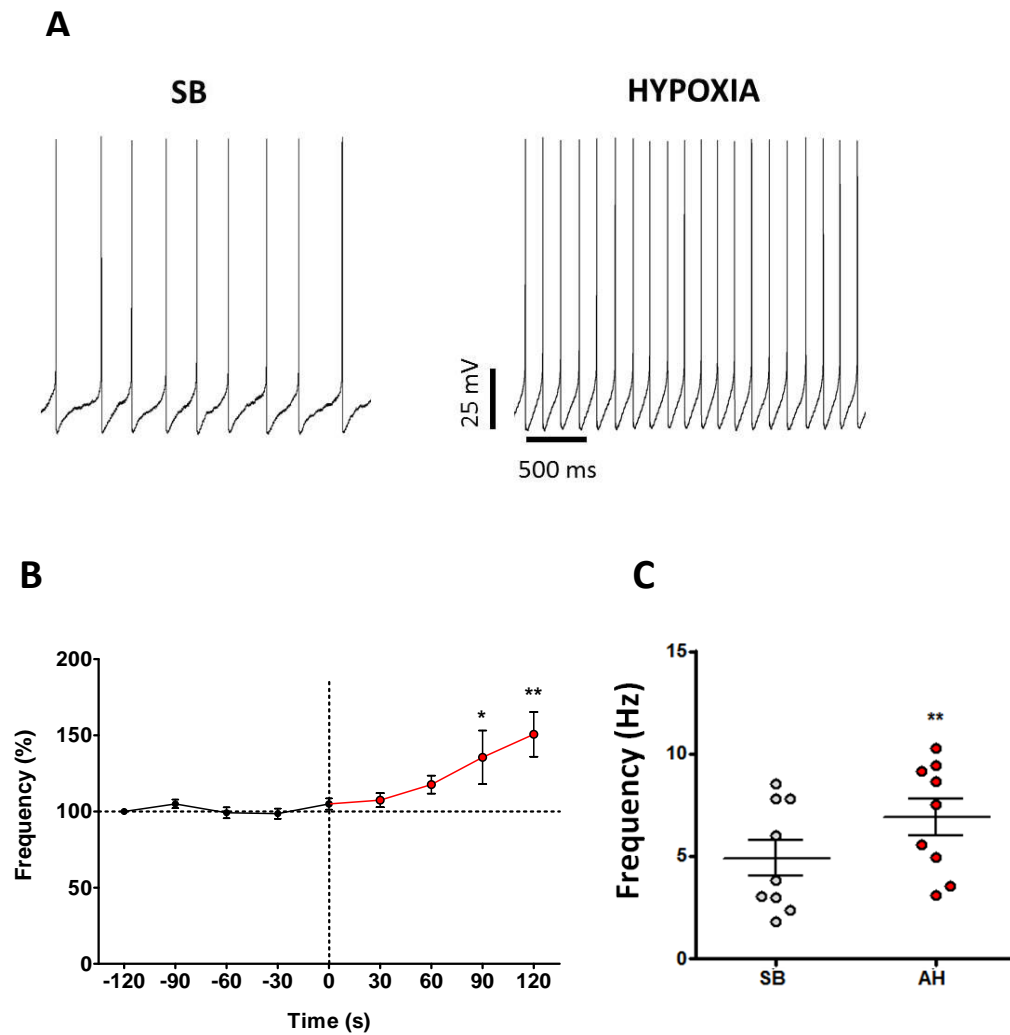


**Figure 1:** *Identification of RVLM presympathetic neurons.* **Panel A** – Photomicrograph of a representative brainstem slice containing RVLM area viewed through a microscope with 5x magnification and recording pipette (dashed white lines). **Panel B** – RVLM presympathetic neuron recorded in brainstem slice viewed under fluorescence microscopy showing rhodamine labelling and indicating that the recorded neuron send projections to the IML column of the spinal cord.

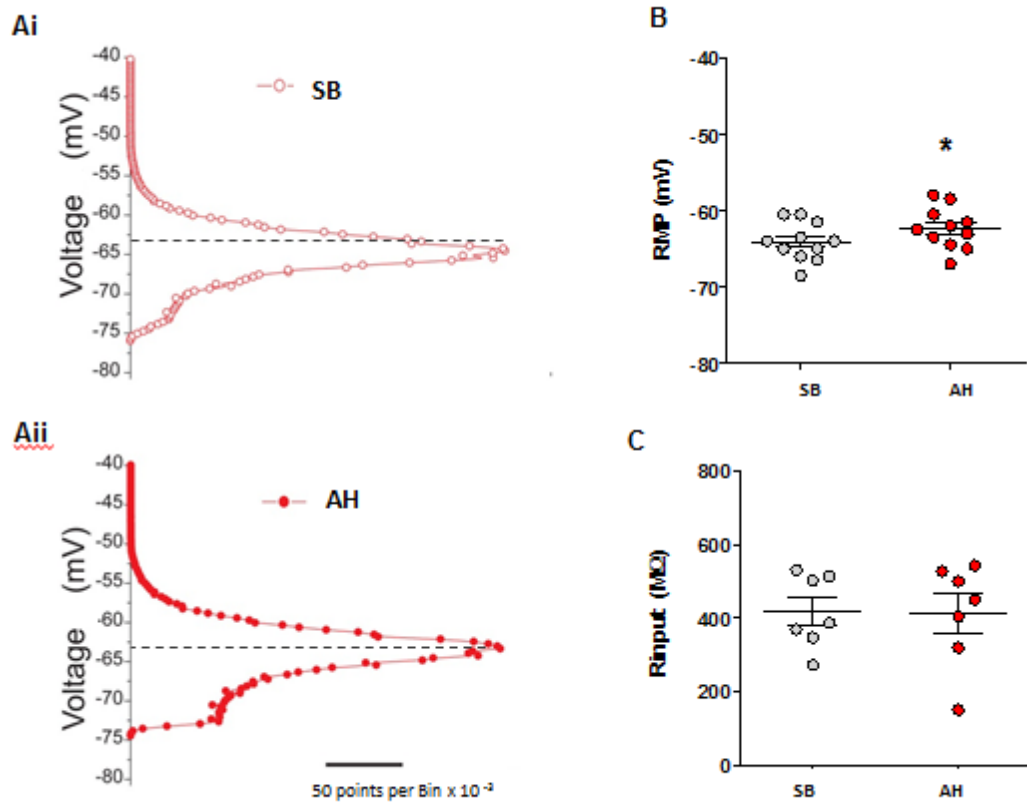




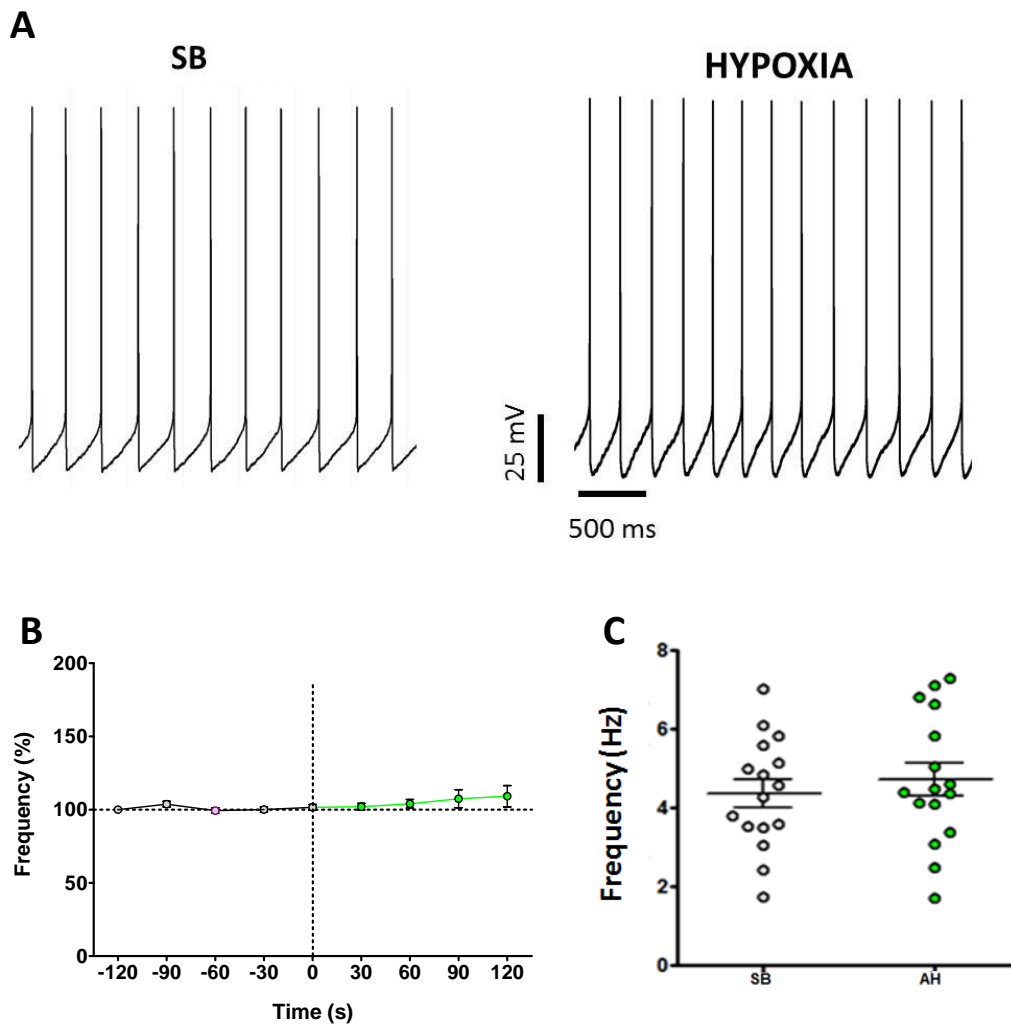
**Figure 2. Effects of acute hypoxia on the electrophysiological properties of recorded RVLM presympathetic neurons from control group.** **Panel A** - Distribution of values of firing frequency of RVLM presympathetic neurons obtained before (SB) and after acute hypoxia (AH) (n=39), **Panel B** – Distribution of normalized data of firing frequency of RVLM presympathetic neurons obtained before (SB) and after AH. **Panel C** – Histogram of variation of the firing rate ( $\Delta$ ) in each neuron after HA compared with SB. **Panel D** – Distribution of values of resting membrane potential (RMP) of RVLM presympathetic neurons obtained before (SB) and after acute hypoxia (AH) (n=39). **Panel E** – Distribution of values of input resistance (Rinput) of RVLM presympathetic neurons obtained before (SB) and after acute hypoxia (AH) (n=19)  $p > 0,05$ .



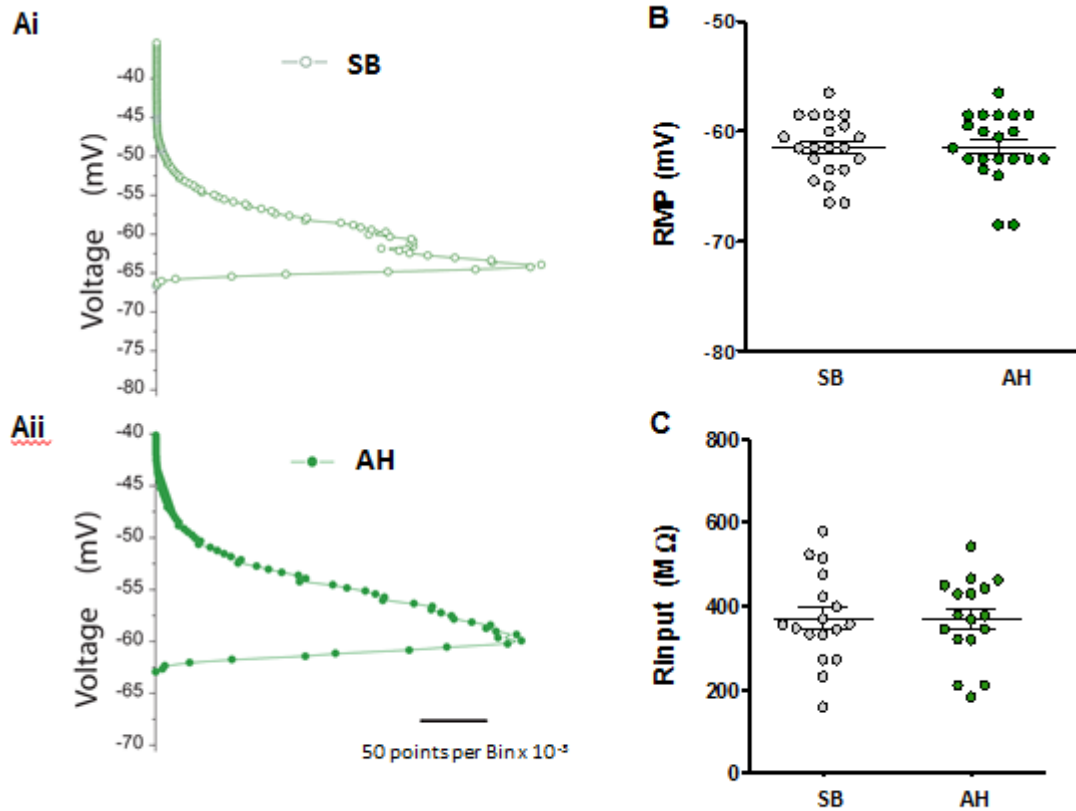
**Figure 3. Effects of acute hypoxia on the electrophysiological properties of RVLM presympathetic neurons with increased firing frequency after AH (of group I).** **Panel A** – Representative tracer of the increase in the intrinsic firing rate of RVLM presympathetic neurons from *group I* after to AH (Hypoxia) compared to synaptic blocked condition (SB). **Panel B** – Temporal decourse of normalized values of firing rate from recorded neurons obtained in synaptic blockade conditions (the black line of the graph and AH (the red line) (n = 11). ANOVA followed by Tukey post-test. \* P <0.05 compared to time 0 s of SB with 90 s of AH; \*\* P <0.01 compared to time 0 s to 120 s of AH. **Panel C** - Distribution of firing frequency of RVLM presympathetic neurons obtained before (SB) and after AH (n=11) showing the increase of firing frequency by AH (\* P <0.01 - difference in relation to SB condition).



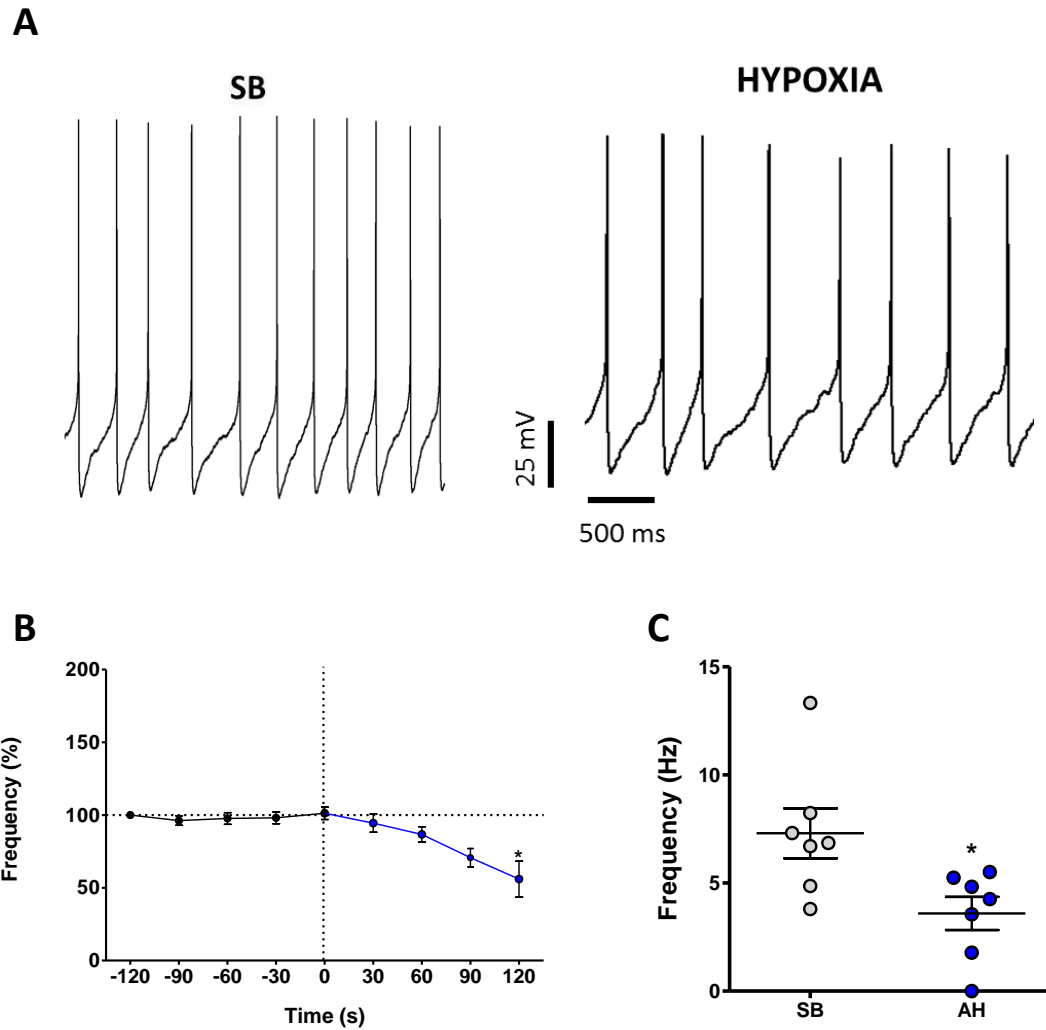
**Figure 4: Effects of acute hypoxia on the passive properties of RVLM presympathetic neurons with increased firing frequency after AH (group I).** **Panel A** – All points amplitude histogram of a 30 s data segment from a representative neuron in **Ai**) SB condition and **Aii**) after 2 min of AH. **Panel B** – Distribution of values of resting membrane potential (RMP) in synaptic blockade (SB) and AH (n = 11; \*  $p < 0,05$ ); **Panel C** – Distribution of values of input resistance (Rinput) in synaptic blockade (SB) and AH condition (n=7).



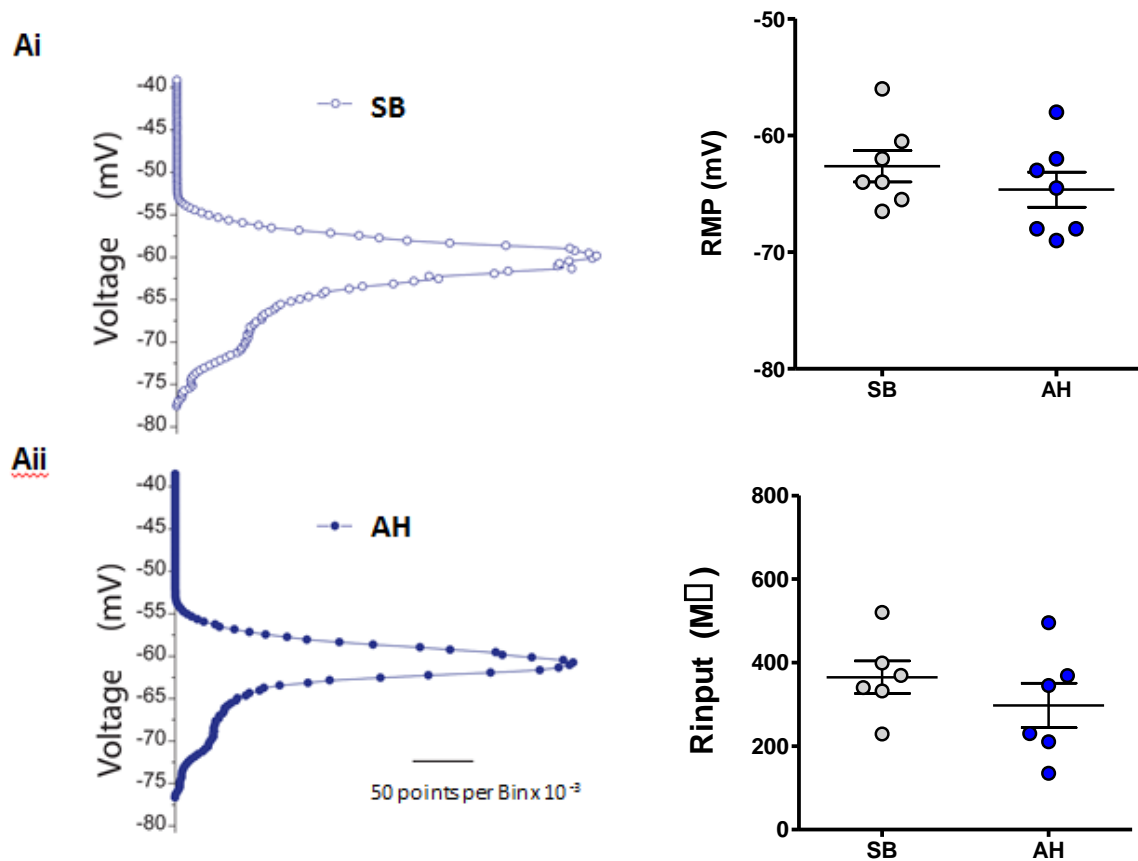
**Figure 5.** *Effects of acute hypoxia in the electrophysiological properties of RVLm presympathetic neurons presenting no changes in the firing frequency after AH (group II).* **Panel A** – Representative tracer of the increase in the intrinsic firing rate of RVLm presympathetic neurons from *group II* after to AH (Hypoxia) compared to synaptic blocked condition (SB). **Panel B** – Temporal decourse of normalized values of firing rate from recorded neurons obtained in synaptic blockade conditions (the black line of the graph) and AH (the green line) (n = 21). **Panel C** - Distribution of firing frequency of RVLm presympathetic neurons obtained before (SB) and after AH (n=21).



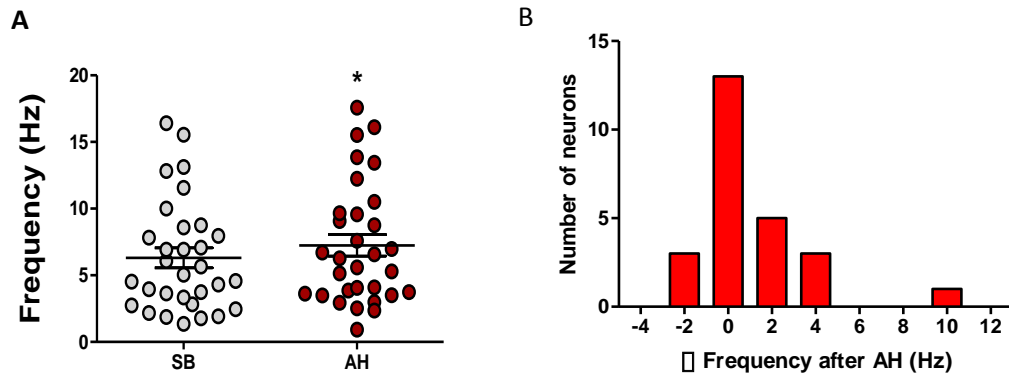
**Figure 6:** *Effects of acute hypoxia on the passive properties of RVLM presympathetic neurons that presenting no changes in the firing frequency after AH (group II).* **Panel A** – All points amplitude histogram of a 30 s data segment from a representative neuron in **Ai**) SB condition and **Aii**) after 2 min of AH. **Panel B** – Distribution of values of resting membrane potential (RMP) of RVLM presympathetic neurons obtained before (SB) and after AH (n=21) and **Panel C** – Distribution of values of Rinput recorded neurons obtained before (SB) and after AH (n=18).



**Figure 7.** *Effects of acute hypoxia in the electrophysiological properties of RVLm presympathetic neurons with decreased firing frequency after AH (group III).* **Panel A** – Representative tracer of the increase in the intrinsic firing frequency of RVLm presympathetic neurons from *group III* after AH (Hypoxia) compared to synaptic blocked condition (SB). **Panel B** – Temporal decourse of normalized values of firing rate from recorded neurons obtained in synaptic blockade conditions (the black line of the graph) and AH (the blue line) (n = 7); ANOVA followed by Tukey post-test. \*  $p < 0.05$  compared to time 0 s of SB with 120 s of AH. **Panel C** - Distribution of firing frequency of RVLm presympathetic neurons obtained before (SB) and after AH (n=7), \*  $p < 0.05$  – compared to SB.

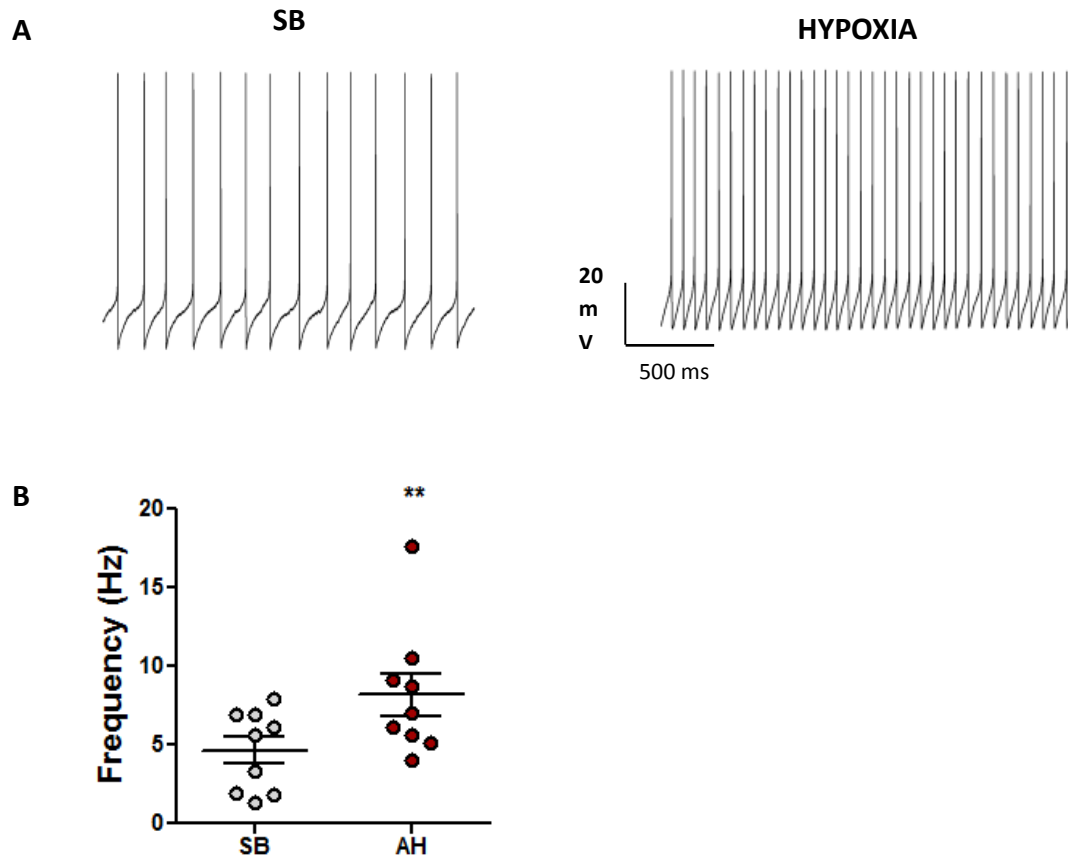


**Figure 8:** Effects of acute hypoxia on the passive properties of RVLM presympathetic neurons with decreased firing frequency after AH (group III). **Panel A** – All points amplitude histogram of a 30 s data segment from a representative neuron in **Ai**) SB condition and **Aii**) after 2 min of AH. **Panel B** – Distribution of values of resting membrane potential (RMP) of RVLM presympathetic neurons obtained before (SB) and after AH (n=7) and **Panel C** – Distribution of values of Rin recorded neurons obtained before (SB) and after AH (n=6).

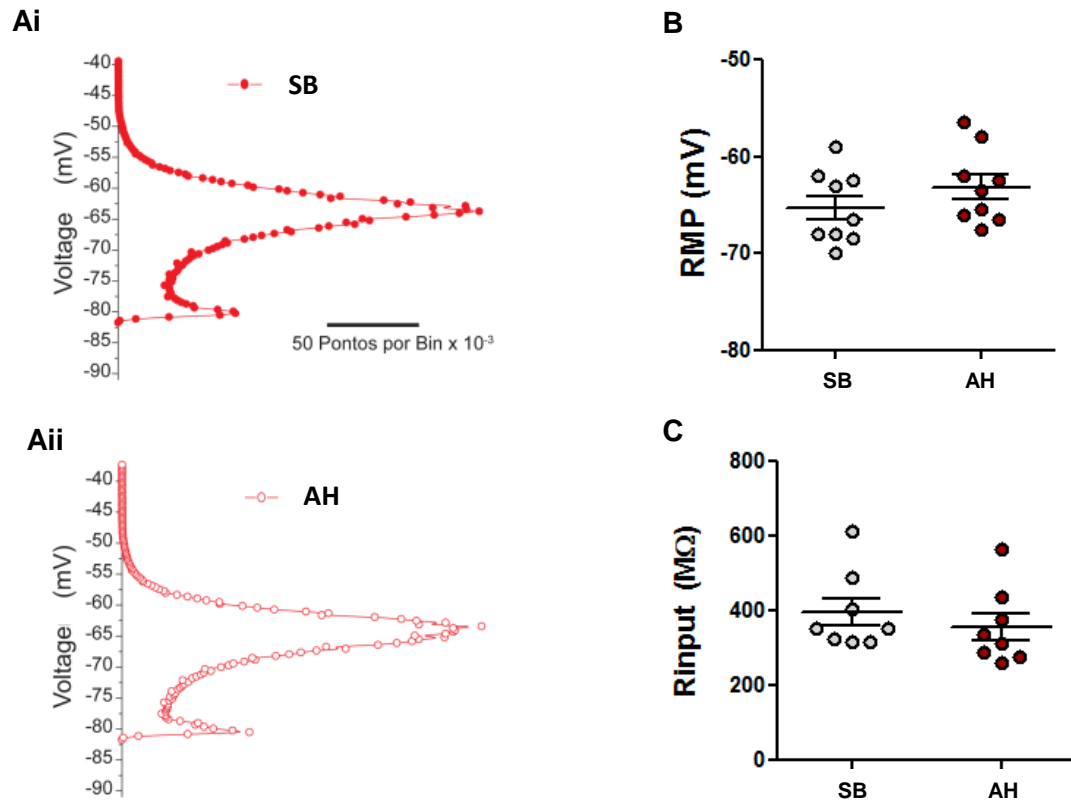


**Figure 9.** *Effects of AH in the electrophysiological properties of recorded RVLM presympathetic neurons from CIH group* – **Panel A** - Distribution of values of firing frequency of RVLM presympathetic neurons obtained before (SB) and after acute hypoxia (AH) (n=30), \*  $p < 0.05$  – compared to SB. **Panel B** - Histogram of variation of the firing rate ( $\Delta$ ) after HA compared with SB.

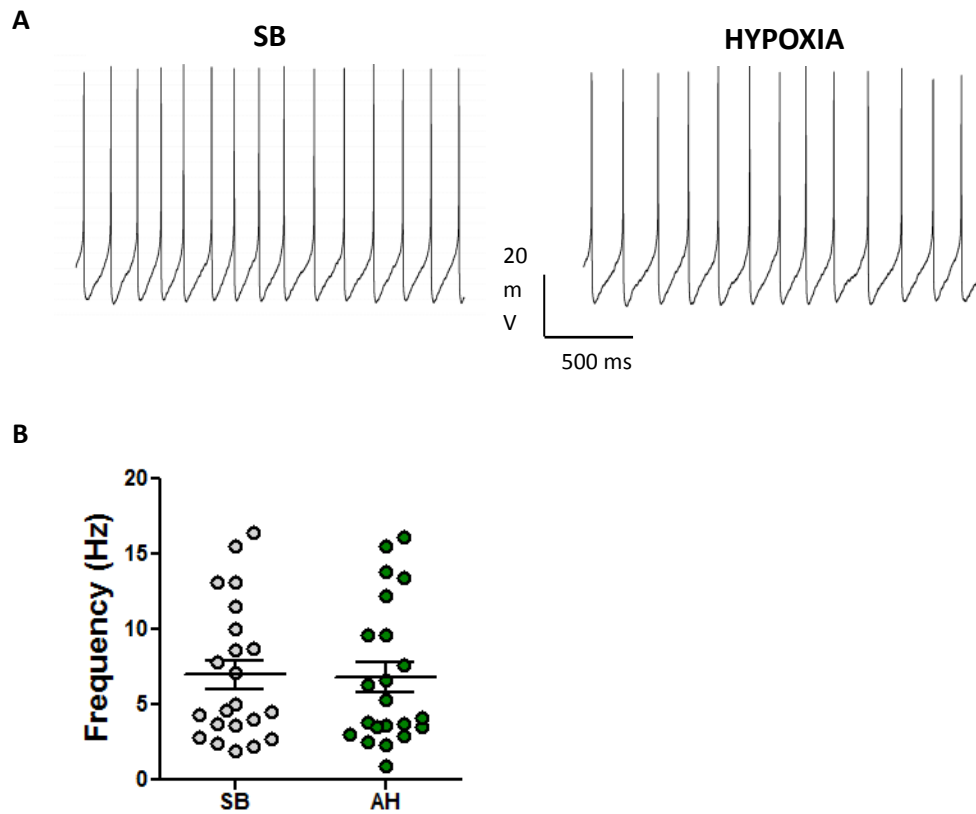




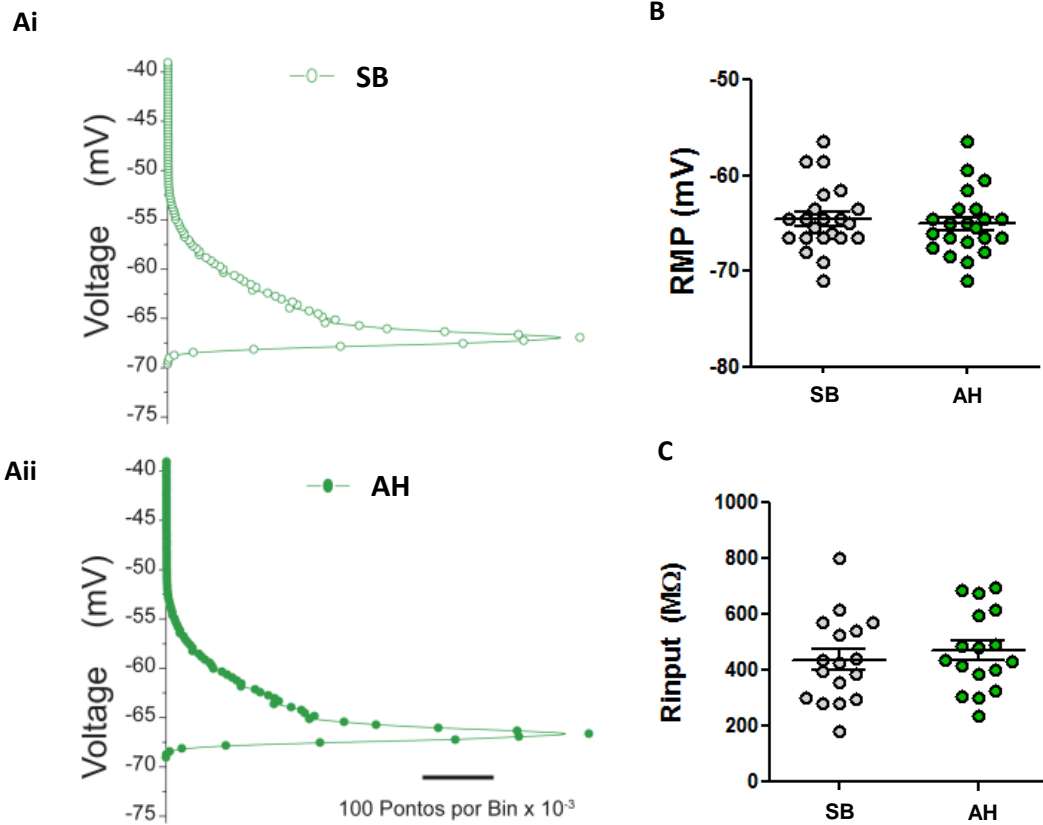
**Figure 10.** *Effects of acute hypoxia on the electrophysiological properties of RVLm presympathetic neurons from CIH rats with increased firing frequency after AH (group I).* **Panel A** – Representative tracer of the increase in the intrinsic firing frequency of RVLm presympathetic neurons after to AH (Hypoxia) compared to synaptic blocked condition (SB). **Panel B** –Distribution of firing frequency of RVLm presympathetic neurons obtained before (SB) and after AH (n=11) showing the increase of firing frequency by AH (\*\* P <0.01 - difference in relation to SB condition).



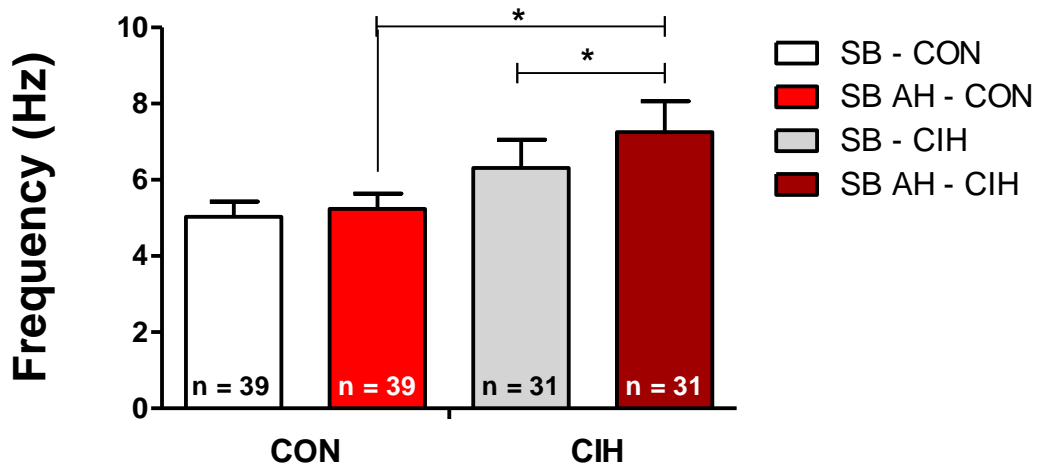
**Figure 11: Effects of acute hypoxia on the passive properties of RVLM presympathetic neurons from CIH rats with increased firing frequency after AH (group I).** **Panel A** – All points amplitude histogram of a 30 s data segment from a representative neuron in **Ai**) SB condition and **Aii**) after 2 min of AH. **Panel B** – Distribution of values of resting membrane potential (RMP) in synaptic blockad (SB) and AH (n = 9); **Panel C** – Distribution of values of input resistance (Rinput) in synaptic blocked (SB) and AH condition (n=8).



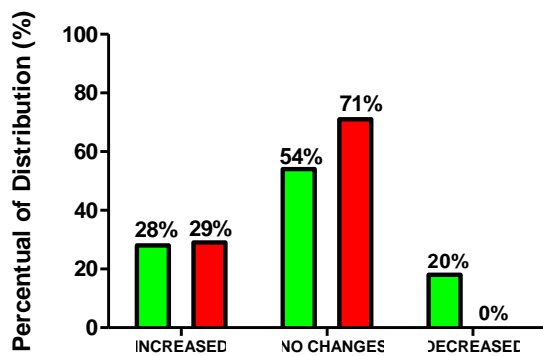
**Figure 12.** *Effects of acute hypoxia on the electrophysiological properties of RVLm presympathetic neurons from CIH rats that presenting no changes in the firing frequency after AH (group II).* **Panel A** – Representative tracer of the increase in the intrinsic firing frequency of RVLm presympathetic neurons after to AH (Hypoxia) compared to synaptic blocked condition (SB). **Panel B** –Distribution of firing frequency of RVLm presympathetic neurons obtained before (SB) and after AH (n=22).



**Figure 13: Effects of acute hypoxia on the passive properties of RVLM presympathetic neurons from CIH rats that presenting no changes in the firing frequency after AH (group II).** Panel A – All points amplitude histogram of a 30 s data segment from a representative neuron in **Ai**) SB condition and **Aii**) after 2 min of AH. Panel B – Distribution of values of resting membrane potential (RMP) of RVLM presympathetic neurons obtained before (SB) and after AH (n=22) and Panel C – Distribution of values of Rinput recorded neurons obtained before (SB) and after AH (n=17).



**Figure 14.** *Effects of AH on the intrinsic firing frequency of all recorded RVLM presympathetic neurons of CIH and control group.* Comparison in CIH group - AH with SB (t test); and comparison the effects of AH in CIH and control group (ANOVA test, \*  $p < 0.05$ ).



**Figure 15.** *Percentual of distribution of the subpopulations of RVLM presympathetic neurons of CIH and control group after AH.*