TALITA DE MELO E SILVA

Integração entre o bulbo ventrolateral rostral e o núcleo paraventricular do hipotálamo durante a ativação dos quimiorreceptores arteriais: possível envolvimento dos mecanismos catecolaminérgicos

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

São Paulo
2016

TALITA DE MELO E SILVA

Integração entre o bulbo ventrolateral rostral e o núcleo paraventricular do hipotálamo durante a ativação dos quimiorreceptores arteriais: possível envolvimento dos mecanismos catecolaminérgicos

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD);

São Paulo
2016

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

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Talita de Melo e.
Integração entre o bulbo ventrolateral rostral e o núcleo paraventricular do hipotálamo durante a ativação dos quimiorreceptores arteriais: possível envolvimento dos mecanismos catecolaminérgicos / Talita de Melo e Silva. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira.

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

Versão do título para o inglês: Integration between the rostral ventrolateral medulla and the paraventricular hypothalamic nucleus during activation of arterial chemoreceptors: possible involvement of catecholaminergic mechanisms.

1. Hipóxia 2. Vias autônomas centrais 3. Neurônios C1 4. Núcleo paraventricular do hipotálamo 5. Inflamação I. Moreira, Prof. Dr. Thiago dos Santos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB025/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Talita de Melo e Silva.

Título da Tese: Integração entre o bulbo ventrolateral rostral e o núcleo paraventricular do hipotálamo durante a ativação dos quimiorreceptores arteriais: possível envolvimento dos mecanismos catecolaminérgicos.

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

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **163** nas fls. **137** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Thiago dos Santos Moreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Integração entre o bulbo ventrolateral rostral e o núcleo paraventricular do hipotálamo durante a ativação dos quimiorreceptores arteriais: possível envolvimento dos mecanismos catecolaminérgicos"* do qual participam o(s) aluno(s),**Talita de Melo e Silva** e os pesquisadores **Ana Carolina Takakura, Vagner R. Antunes,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **30.10.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 31 de outubro de 2012.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

À minha mãe e meu pai, por sempre me ensinarem que a educação é o melhor caminho.

Ao Pedro Evaristo, o melhor companheiro em qualquer jornada.

AGRADECIMENTOS

Manifesto minha gratidão a todos que estiveram presentes e contribuíram para que esse trabalho se concretizasse.

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

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Thiago S. Moreira pela confiança, pelos ensinamentos, apoio, paciência e dedicação. Obrigada por valorizar cada etapa deste longo trabalho e por enriquecê-lo com toda sua experiência e sabedoria.

À Profa. Dra. Ana Carolina T. Takakura pelos ensinamentos e pela dedicação ao projeto.

À Ana Maria P. Campos pela gentileza de dividir comigo todo seu conhecimento, pelo afetuoso e constante apoio e amizade. Aos professores Dra. Sara Joyce Shammah-Lagnado e Dr. Martin Andreas Metzger por tantas dúvidas sanadas.

Ao Prof. Vagner Antunes por ter me direcionado ao final do mestrado e ter colaborado com esse projeto junto a sua aluna Laiali J. Chaar. Ao Prof. Niels Olsen Câmara e Reinaldo Correia Silva pela colaboração e apoio.

Aos meus pais Maria de Melo e Vilmar, que me despertaram o desejo pelo conhecimento e proporcionaram condições para meu desenvolvimento humano e intelectual. A meu irmão Danilo por compartilharmos nossas existências, e à minha avó Ondina, por ser meu grande exemplo de respeito e educação com o próximo.

A meu marido Pedro Evaristo por ser meu ponto de equilíbrio.

A todos os meus amigos, em especial Aline Yamamoto e Viviane Massumi Ano por tornarem São Paulo um ambiente mais familiar.

Aos meus grandes amigos do ICB Bárbara F. Barna, Luiz Marcelo Oliveira e Juliana C. Lima que dividiram comigo todos os momentos, dos mais difíceis aos mais divertidos.

Aos colegas de laboratório, pelas experiências divididas durante minha formação na pós-graduação.

Muito Obrigada.

"É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas. Mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros. Mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça".

Cora Coralina

RESUMO

SILVA, T. M. **Integração entre o bulbo ventrolateral rostral e o núcleo paraventricular do hipotálamo durante a ativação dos quimiorreceptores arteriais**: possível envolvimento dos mecanismos catecolaminérgicos. 2016. 122 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Em resposta a uma redução na pressão parcial de O_2 (PaO_2), os quimiorreceptores periféricos detectam essas alterações e enviam informações características para o sistema nervoso central (SNC) a fim de promover toda uma mobilização encefálica na tentativa de corrigir a alteração na homeostasia. Estudos neuroanatômicos mostram que os neurônios C1 enviam projeções para núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH), mas, pouco descrevem a participação desta via em uma situação de hipóxia. Ademais, o potencial envolvimento de mecanismos neuroimunes no controle neural cardiorrespiratório durante a hipóxia não está esclarecido. Neste estudo mostramos por meio de métodos de rastreamento neural que neurônios catecolaminérgicos do BVLr/C1 ativados por hipóxia se projetam para o PVH. Mostramos também que a integridade dos neurônios catecolaminérgicos do BVLr são essenciais para que neurônios do PVH sejam ativados por hipóxia. Além disso, o tratamento com minociclina alterou a expressão de mediadores inflamatórios no BVLr e PVH, a expressão de Fos e as repostas respiratória e autônoma desencadeadas pela hipóxia. Estes resultados conferem uma importante caracterização sobre a distribuição dos neurônios catecolaminérgicos do BVLr/C1 que são ativados por hipóxia e se projetam para o PVH. Além de mostrar que a hipóxia pode desencadear mecanismos neuroimunes que possivelmente envolvem a participação da microglia e também recrutam a via neural C1- PVH.

Palavras-chave: Hipóxia. Vias autônomas centrais. Inflamação. Neurônios C1. Núcleo paraventricular do hipotálamo.

ABSTRACT

SILVA, T.M. **Integration between the rostral ventrolateral medulla and the paraventricular hypothalamic nucleus during activation of arterial chemoreceptors: possible involvement of catecholaminergic mechanisms**. 2016. 122 p. Thesis (Ph.D. Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

In response to a reduction in the O_2 partial pressure (PaO_2), peripheral chemoreceptors detect these changes and send information to the central nervous system (CNS) to promote mobilization in whole brain to correct the change in the homeostasis. Neuroanatomical studies show that C1 neurons send projections to the paraventricular hypothalamic nucleus (PVH), but rather describe the involvement of this pathway in a hypoxic situation. Furthermore, the potential involvement of neuroimmune mechanisms in cardiorespiratory neural control during hypoxia is unclear. In this study we show through neural tracing methods that catecholaminergic neurons localized in rostral ventrolateral medulla (RVLM) / C1 cells activated by hypoxia send projections to the PVH. We also show that the integrity of the RVLM catecholaminergic neurons is essential for PVH neurons be activated by hypoxia. Moreover, treatment with minocycline changed the expression of inflammatory mediators in RVLM and PVH, the expression of Fos in these nucleus, and respiratory and autonomic responses elicited by hypoxia. These findings provide an important characterization of the distribution of catecholaminergic RVLM / C1 neurons that are activated by hypoxia and project to the PVH. In addition to showing that hypoxia can trigger neuroimmune mechanisms that possibly involve the microglia activity and also recruit the C1/PVH neural pathway.

Keywords: Hypoxia. Central autonomic pathways. Inflammation. C1 neurons. Paraventricular hypothalamic nucleus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Hipóxia aguda ativa neurônios do BVLr.....48

Figura 2 Hipóxia aguda ativa neurônios catecolaminérgicos do BVLr.....50

Figura 3 Localização das injeções de PHA-L no BVLr.....52

Figura 4 Projeções do BVLr para o PVH.....53

Figura 5 Localização das injeções de CTb no PVH.....55

Figura 6 Neurônios do BVLr responsivos à hipóxia são catecolaminérgicos e se projetam para o PVH.....56

Figura 7 Hipóxia aguda não ativa neurônios serotoninérgicos da RPa/ppy.....58

Figura 8 Localização das injeções unilaterais da toxina saporina conjugada com anti-DβH no PVH.....60

Figura 9 Injeção unilateral da toxina saporina conjugada com anti-DβH no PVH reduz seletivamente neurônios catecolaminérgicos do bulbo ventrolateral rostral (BVLr).....61

Figura 10 Injeção unilateral da toxina saporina anti-DβH no PVH alterou o número de neurônios catecolaminérgicos ativados por hipóxia do bulbo ventrolateral rostral (BVLr).....63

Figura 11 Neurônios catecolaminérgicos bilaterais do BVLr projetam-se para o PVH.....65

Figura 12 A destruição seletiva dos neurônios C1 altera a expressão de Fos em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo após hipóxia.....67

Figura 13 Hipóxia aguda não promove alterações significativas na PAM de ratos acordados.....69

Figura 14 Valores do qPCR de citocinas e fatores relacionados à inflamação no PVH e BVLr de ratos tratados com salina ou minociclina e submetidos a hipóxia por 3 horas.....72

Figura 15 Valores do qPCR para citocinas pró-inflamatórias em órgãos periféricos de ratos submetidos a hipóxia por 3 horas.....74

Figura 16 Minociclina reduz a expressão de Fos no BVLr e PVH após hipóxia.....76

Figura 17 Minociclina atenua o aumento respiratório promovido pela hipóxia.....78

Figura 18 Pressão arterial, frequência cardíaca e análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca.....81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ATP	Adenosina trifosfato
A1	Grupamento noradrenérgico A1
BHE	Barreira hematoencefálica
BVL	Bulbo ventrolateral
BVLr	Bulbo Ventrolateral rostral
Ca^{2+}	Cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
fx	fórnix
GABA	Ácido gama aminobutírico
GAD	Descarboxilase do ácido glutâmico
HA	Hipóxia aguda
HCI	Hipóxia crônica intermitente
HCO_{3-}	Bicarbonato
HF	Componente de alta frequência
HIF-1	Fator de transcrição da hipóxia induzida
HPA	Hipotálamo hipófise adrenal
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyl transferase-1
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IL	Interleucina
IO	Oliva inferior
K^{+}	Potássio
KF	Kölliker-Fuse

L/min	Litros por minuto
LF	Componente de baixa frequência
LV	Ventrículo lateral
MMP	Matriz metaloproteinase
NaCN	Cianeto de Sódio
NK	Natural Killer
NPy	Neuropeptídeo y
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NTS	Núcleo do trato solitário
N_2	Nitrogênio
O_2	Oxigênio
Pa_{CO2}	Pressão parcial de dióxido de carbono
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
Pa_{O2}	Pressão parcial de oxigênio
PAP	Pressão arterial pulsátil
PBS	Solução de tampão fosfato
PE-10	Polietileno n° 10
PE-50	Polietileno n° 50
PNMT	Phenylethanolamine N-methyl transferase
PVH	Núcleo paraventricular do hipotálamo
py	Trato piramidal
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
resp/min	Respiração por minuto
RNA	Ácido ribonucléico

RTN	Núcleo retrotrapezóide
RPa/ppy	Rafe pálido/região parapiramidal
SaO_2	Saturação de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
Sp5	Trato espinal do trigêmio
TH	Tirosina hidroxilase
TrpOH	Triptofano hidroxilase
USP	Universidade de São Paulo
V_E	Volume minuto
VGLUT	Transportador vesicular de glutamato
V_T	Volume corrente
3V	Terceiro ventrículo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **18**
1.1 Ativação dos quimiorreceptores periféricos frente a uma situação de hipóxia **18**
1.2 Mecanismos neurais de controle cardiorrespiratório **19**
1.3 Grupamento catecolaminérgico C1 ..... **20**
1.4 Grupamento C1 e o Núcleo Paraventricular do Hipotálamo **22**
1.5 Hipóxia e interações neuroimunes **24**
2 OBJETIVOS **29**
3 MATERIAIS E MÉTODOS **30**
3.1 Animais **30**
3.2 Procedimentos cirúrgicos **30**
3.2.1 Rastreamento neural 30
3.2.2 Lesões químicas da região catecolaminérgica C1 31
3.3 Protocolo de hipóxia **32**
3.4 Determinações gasométricas do sangue arterial **32**
3.5 Histologia encefálica **33**
3.6 Imunoistoquímica **34**
3.7 Imagens **35**
3.8 Registro de pressão arterial e frequência cardíaca **36**
3.9 Medida dos níveis de RNA mensageiro por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) **37**
3.10 Medida da ventilação pulmonar **38**
3.11 Monitoramento dos níveis e da variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca **39**
3.12 Droga utilizada **40**
3.13 Análise estatística **40**
4 DESCRIÇÃO DO PLANO REALIZADO **40**
4.1 Protocolos experimentais **40**
4.1.1 Evidências anatômicas de projeções do grupamento catecolaminérgico C1 para núcleo paraventricular do hipotálamo durante uma situação de hipóxia aguda 40

4.1.2 A integridade do grupamento C1 é necessária para que os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo sejam ativados pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos 42
4.1.3 Determinação dos níveis de RNA mensageiro para IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, CD86, matriz metaloproteinase 9 (MMP-9) e matriz metaloproteinase 2 (MMP2) após hipóxia em animais tratados com veículo ou minociclina 43
4.1.4 Minociclina pode influenciar a expressão de Fos em neurônios do BVLr e PVH e alterar as respostas respiratória e autônomas desencadeadas pela hipóxia 44
5 RESULTADOS 46
5.1 Efeitos da hipóxia na gasometria arterial 46
5.2 Hipóxia aguda ativa neurônios do BVLr 47
5.3 Neurônios catecolaminérgicos do BVLr são ativados por hipóxia 49
5.4 Caracterização neuroanatômica de projeções do grupamento C1 para o PVH. 51
5.4.1 Traçador anterógrado 51
5.5 Neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 ativados numa situação de hipóxia se projetam para o PVH 54
5.5.1 Traçador retrógrado 54
5.6 Hipóxia aguda não altera a expressão de Fos em neurônios do grupamento serotoninérgico na rafe pálido/região parapiramidal (RPa/ppy) 57
5.7 Saporina anti-DβH no PVH é efetiva na lesão dos neurônios catecolaminérgicos do bulbo ventrolateral rostral (BVLr) 59
5.8 Saporina anti-DβH no PVH reduz o número de neurônios catecolaminérgicos do BVLr ativados por hipóxia 62
5.9 Saporina anti-DβH no PVH reduz o número de neurônios catecolaminérgicos do BVLr contralateral 64
5.10 A destruição seletiva dos neurônios catecolaminérgicos do BVLr altera a expressão de Fos em neurônios do PVH após estimulação dos quimiorreceptores periféricos 66
5.11 Efeitos cardiovasculares da hipóxia 68

5.12 Minociclina altera a expressão de RNAm de mediadores do processo inflamatório no BVLr e PVH desencadeada pela hipóxia 70
5.13 Hipóxia aguda é capaz de modificar a expressão RNAm para citocinas pró-inflamatórias em órgãos periféricos 73
5.14 Minociclina reduz a expressão de Fos em neurônios do BVLr e PVH em resposta a uma situação de hipóxia 75
5.15 Minociclina atenua o aumento respiratório promovido pela hipóxia 77
5.16 Minociclina altera respostas autônomas cardiovasculares desencadeadas pela hipóxia 79
6 DISCUSSÃO 82
6.1 Caracterização neuroanatômica da via C1-PVH durante hipóxia aguda 82
6.2 Hipóxia aguda não promove alterações significativas na PAM de ratos acordados 88
6.3 Hipóxia aguda não altera a expressão de Fos em neurônios do grupamento serotoninérgico na rafe pálido/região parapiramidal 89
6.4 Hipóxia aguda aumenta a expressão RNAm de mediadores do processo inflamatório no BVLr e PVH 90
6.5 Hipóxia aguda é capaz de modificar a expressão RNAm para citocinas pró-inflamatórias em órgãos periféricos 95
6.6 Minociclina é capaz promover mudanças na atividade neuronal do BVLr e PVH e nas respostas autônomas e respiratórias promovidas pela hipóxia 98
7 CONCLUSÃO 102
REFERÊNCIAS 103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ativação dos quimiorreceptores periféricos frente a uma situação de hipóxia

O oxigênio (O_2) é uma molécula essencial para a manutenção do funcionamento celular e para isso exige um controle bastante refinado dos níveis de sua pressão parcial no sangue arterial (Pa_{O2}) (PEÑA; RAMIREZ, 2005).

Um conjunto de células neuroepiteliais derivadas da crista neural localizadas principalmente nos corpúsculos carotídeos (quimiorreceptores carotídeos) (BISCOE; DUCHEN, 1990a) apresentam a peculiaridade de despolarizar em condições de hipóxia (LAHIRI et al., 2006).

Os corpúsculos carotídeos estão localizados principalmente na bifurcação da artéria carótida comum. A artéria que se ramifica da bifurcação das carótidas comum, denominada artéria do corpúsculo carotídeo, irriga os quimiorreceptores e confere a essas células quimiossensíveis o maior fluxo de sangue por peso de tecido de todos os órgãos do corpo (BARNETT et al., 1988). Perante esta intensa perfusão sanguínea, os quimiorreceptores periféricos além de detectarem queda na Pa_{O2}, também são sensíveis a condições de alteração na pressão parcial de gás carbônico (Pa_{CO2}) e queda no pH sanguíneo (BISCOE; DUCHEN, 1990a).

Os corpúsculos carotídeos são compostos por dois tipos celulares: as células glomus do tipo I, que possuem fenótipo neuronal e as células glomus tipo II, que não respondem eletrofisiologicamente a hipóxia e tem sido caracterizada por desempenharem um papel modulatório na quimiotransdução (KUMAR; PRABHAKAR, 2012; XU et al., 2003). Evidências indicam que as células glomus tipo I são o os sensores de O_2 e que essas células atuam nas proximidades da terminação nervosa aferente como uma unidade sensorial (KUMAR; PRABHAKAR, 2012). Em condições em que há uma queda na Pa_{O2} em valores abaixo de 60 mmHg, canais de K^+ dependentes de O_2, localizados na membrana das células quimiossensíveis (glomus tipo I) se fecham. A diminuição do efluxo de K^+ durante a hipóxia altera o potencial de membrana da célula resultando na ativação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem o que promove influxo de Ca^{2+} e liberação de neurotransmissores como

dopamina, acetilcolina ou ATP na fenda sináptica, que por sua vez promove a ativação das terminações dos nervos aferentes (BAIRAM et al., 1998; BISCOE; DUCHEN, 1990b; JIANG; EYZAGUIRRE, 2004).

A ativação de receptores localizados nas terminações nervosas aferentes cujos corpos celulares estão localizados no gânglio petroso deflagram potenciais de ação em direção ao sistema nervoso central (SNC), em direção ao núcleo do trato solitário comissural (NTScom), promovendo a ativação de reflexos respiratórios e cardiovasculares com o objetivo de restaurar os níveis de O_2 em valores fisiológicos. O recrutamento de todo esse mecanismo é chamado de quimiorreflexo periférico, o qual consiste um dos principais elementos mantenedores da homeostase cardiorrespiratória (GUYENET, 2000; 2014; MACHADO, 2001).

Os ajustes promovidos pela ativação desse reflexo se caracterizam por aumento da atividade simpática, da pressão arterial e da atividade respiratória (BARROS et al., 2002; BRAGA et al., 2007; MOREIRA et al., 2006). Alterações cardiorrespiratórias são mobilizadas de forma sincronizada com o objetivo de melhorar os processos de troca gasosa pulmonar e do débito cardíaco, melhorando a eficiência da captação de O_2 e da perfusão tecidual (BARROS et al., 2002).

1.2 Mecanismos neurais de controle cardiorrespiratório

Como já descrito nos parágrafos acima, os quimiorreceptores periféricos estão envolvidos na manutenção da homeostasia em resposta a uma situação de hipóxia. Em uma situação de redução da Pa_{O2}, os quimiorreceptores periféricos detectam essas alterações e enviam informações características para o SNC com o objetivo de promover toda uma mobilização encefálica, recrutando vias autônomas e assim, desencadeando respostas cardiovasculares e respiratórias à ativação do quimiorreflexo.

As respostas de ativação dos quimiorreceptores periféricos são relativamente rápidas com uma latência de aproximadamente 0,2-0,3s (KUMAR; PRABHAKAR, 2012). A primeira sinapse ou o sítio de terminação das fibras aferentes viscerais no SNC ocorre na região do NTScom (PATON et al., 2001; VARDHAN et al., 1993). A partir do NTScom, as informações provenientes dos receptores periféricos podem ser

distribuídas para diversas áreas do SNC, dentre as quais se destacam as áreas bulbares responsáveis pelo controle respiratório, bem como as áreas localizadas na região ventrolateral do bulbo que controlam o tônus simpático para o sistema cardiovascular (ALHEID et al., 2011; KOSHIYA; GUYENET, 1996; KOSHIYA et al., 1993; MOREIRA et al., 2006).

A estimulação da respiração desencadeada pela ativação dos corpúsculos carotídeos é mediada pela comunicação entre neurônios do NTScom com segmentos do grupamento respiratório ventral, com núcleo retrotrapezóide (RTN) e estruturas pontinas como Kölliker-Fuse (KF) (ALHEID et al., 2011; DAMASCENO et al., 2014; SONG et al., 2011; TAKAKURA et al., 2006a). Por sua vez, o efeito da estimulação do corpúsculo carotídeo sob o tônus simpático é mediado principalmente por projeções excitatórias oriundas no NTScom para os neurônios pré-motores simpáticos da região rostroventrolateral do bulbo (BVLr), mais especificamente para os neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 (AICHER et al., 1996).

1.3 Grupamento catecolaminérgico C1

A região ventrolateral do bulbo (BVL) determina o quadrante ventrolateral da formação reticular. O grupamento catecolaminérgico C1 está localizado juntamente com outros grupamentos neuronais na porção mais rostral do BVL e constitui 72% dos neurônios bulbares que expressam a enzima que sintetiza adrenalina, denominada “phenylethanolamine N-methyl transferase” (PNMT). Os outros grupamentos adrenérgicos constituem as regiões C2 e C3, localizados na porção rostromedial do núcleo do trato solitário e fascículo longitudinal medial e núcleo do hipoglosso, constituindo 13% (C2) e 15% (C3) da população neuronal imunorreativa para PNMT em ratos (MINSON et al., 1990).

Sabe-se que aproximadamente 1/3 dos neurônios da região C1 são neurônios pré-motores simpáticos, ou seja, inervam os neurônios pré-ganglionares simpáticos. Classicamente, a região do BVL foi descrita como uma região pressora, na qual a injeção de aminoácidos excitatórios promove aumento na pressão arterial (PA) (SAPRU, 1996; SCHREIHOFER et al., 2000)), enquanto injeções de ácido gama

aminobutírico (GABA) promove queda da PA e frequência cardíaca (FC) (DAMPNEY; MOON, 1980; ROSS et al., 1984). Ademais, é importante acrescentar que os neurônios não-catecolaminérgicos do BVLr também contribuem com projeções bulbo espinhais. Esses neurônios ainda não possuem um marcador fenotípico específico, mas, são conhecidos pela característica de exercerem intensa atividade no controle da PA em situações de repouso (LIPSKI et al., 1996; MADDEN; SVED, 2003; SCHREIHOFER; GUYENET, 1997; SCHREIHOFER et al., 2000).

Os neurônios C1 estão envolvidos com respostas cardiorrespiratórias a hipóxia, assim como contribuem também com respostas neuroendócrinas e termorregulatórias a este estímulo (ABBOTT et al., 2013; GUYENET et al., 2013; MADDEN et al., 2013; ROSS et al., 1984; SMITH et al., 1995). Em conformidade com essas informações, diferentes estudos mostram que esses neurônios são vigorosamente ativados em uma situação de hipóxia (ERICKSON; MILLHORN, 1994; HIROOKA et al., 1997), sendo, a atividade simpática, induzida por estimulação do corpúsculo carotídeo, deprimida após lesão seletiva desses neurônios (SCHREIHOFER; GUYENET, 2000).

A ação sinérgica das atividades simpática e cardiovagal durante a hipóxia também constitui um mecanismo de associação de ações benéficas para a função cardíaca (KOIZUMI et al., 1982). A ativação cardiovagal pode melhorar a eficiência e reduzir o custo metabólico do bombeamento de sangue durante os períodos de aumento do tônus simpático para o coração (KOIZUMI et al., 1983; VIMERCATI et al., 2012) e os neurônios C1 podem estar envolvidos com essa resposta, via projeções monossinápticas glutamatérgicas para o núcleo motor dorsal do vago (DMV) (DEPUY et al., 2013).

A contribuição dos neurônios C1 para a ativação da respiração em condições de hipóxia ainda não está totalmente determinada. Alguns trabalhos sugerem que essa modulação ocorra por meio de uma conexão direta entre neurônios C1 e elementos do centro gerador do ritmo respiratório, embora conexões indiretas não sejam descartadas, como mediante a ativação dos neurônios quimiossenssíveis do RTN, dos neurônios do complexo parabraquial/Kölliker-Fuse ou ainda do NTS (AGASSANDIAN et al., 2012; CHAMBERLIN, 2004; CHAMBERLIN; SAPER, 1994; DAMASCENO et al., 2014; GUYENET et al., 2010; SAPRU, 1996; TAKAKURA et al., 2006a). Além do mais,

também há a possibilidade dos neurônios C1 participarem do controle respiratório via projeções para o locus coeruleus, hipotálamo dorsomedial, região perifornicial do hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (ASTON-JONES et al., 2001; BOCHORISHVILI et al., 2014; ELAM et al., 1981; HOLLOWAY et al., 2013).

1.4 Grupamento C1 e o Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

As primeiras descrições de projeções axonais dos neurônios C1 foram feitas por Hökfelt e colaboradores na década de 70 (HOKFELT et al., 1973). Até o presente momento, sabe-se que esses neurônios possuem uma intensa rede neural de comunicações com diversos grupamentos encefálicos, incluindo, como já descrito anteriormente, o núcleo motor dorsal do vago (DMV), a coluna intermediolateral, locus coeruleus, substância cinzenta periaquedutal, região perifornicial e também o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH) (GUYENET, 2006a; HOKFELT et al., 1973). Algumas dessas comunicações foram descritas como excitatórias, utilizando o neurotransmissor glutamato como molécula sinalizadora (BOCHORISHVILI et al., 2014; DEPUY et al., 2013; GUYENET, 2006b; HOLLOWAY et al., 2013; SVED et al., 2001). Os neurônios C1 também utilizam outros neuropeptídeos como moléculas sinalizadoras, dentre elas o neuropeptídeo Y (NPY), a substância P, hormônio liberador de tireotrofina, regulador transcricional da cocaína e anfetamina e o polipeptídeo ativador de adenilato ciclase pituitário (PILOWSKY, 2008).

Evidências neuroanatômicas também demonstram que a região bulbar, onde estão localizados os neurônios C1, é organizada topograficamente no que diz respeito a suas projeções axonais. Tucker e colaboradores, na década de 80, relataram que células C1 se projetam para medula espinhal e para o hipotálamo, mas raramente para ambos (TUCKER et al., 1987). Estudos mais recentes confirmam esta topografia e mostram que os neurônios C1 caudais compõem as projeções suprabulbares, enquanto que a região mais rostral é composta pelos neurônios pré-motores simpáticos (AGASSANDIAN et al., 2012; MINSON et al., 1994; STORNETTA et al., 1999; STORNETTA et al., 2015). Dentre as regiões suprabulbares que recebem aferências do grupamento C1 há o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH), sendo a análise da

integração entre essas duas importantes regiões encefálicas um dos objetivos do presente trabalho.

Projeções catecolaminérgicas do tronco encefálico para o PVH parecem proporcionar a retransmissão de informações sensoriais viscerais com o objetivo de promover a integração de mecanismos reguladores, auxiliados pelo sistema nervoso autônomo, bem como as respostas neuroendócrinas (SAWCHENKO; SWANSON, 1983a; SWANSON; SAWCHENKO, 1983).

A inervação catecolaminérgica na região do PVH origina-se de seis possíveis fontes neurais: grupamentos catecolaminérgicos C1, C2, C3, A1, A2 e A6. O grupamento A1 promove a inervação principalmente de células magnocelulares vasopressinérgicas, ao passo que os grupamentos A2, A6, C1, C2 e C3, promovem a inervação das células parvocelulares do PVH (CUNNINGHAM et al., 1990; FUZESI et al., 2007; SAWCHENKO; SWANSON, 1983b; SWANSON; KUYPERS, 1980; SWANSON; SAWCHENKO, 1980). Experimentos *in vitro* mostraram que as catecolaminas promovem a ativação dos neurônios pré-simpáticos na região do PVH e que esses efeitos seriam mediados por uma modulação pré-sináptica. No entanto, os mecanismos moleculares de como os grupamentos catecolaminérgicos promoveriam a ativação de neurônios hipotalâmicos ainda não são claros e necessitam de maiores estudos (CHEN et al., 2006).

A participação do PVH nas vias neurais do quimiorreflexo periférico tem sido foco de alguns estudos. Resultados mostram desde um aumento significativo na expressão da proteína Fos no PVH de ratos submetidos à hipóxia moderada (Pa_{O2} 11%), quanto a participação do PVH na via simpato-excitatória do quimiorreflexo (BERQUIN et al., 2000; CRUZ et al., 2008; OLIVAN et al., 2001; REDDY et al., 2005).

Avaliações neuroanatômicas indicam que a hipóxia é capaz de ativar células catecolaminérgicas do NTS e também do grupamento A1 que se projetam para o PVH, o que sugere que o componente simpato-excitatório e possivelmente respiratório do quimiorreflexo não parece se restringir a comunicações somente entre áreas bulbares, e que a modulação do PVH sob influencia de neurônios catecolaminérgicos pode estar envolvido com essas respostas (KING et al., 2012; KING et al., 2013; KING et al., 2015).

No presente trabalho, uma das nossas hipóteses é que a hipóxia aguda, promovendo a ativação dos quimiorreceptores arteriais é capaz de recrutar neurônios catecolaminérgicos, mais especificamente, neurônios adrenérgicos do grupamento C1 e influenciar a atividade de neurônios do PVH.

1.5 Hipóxia e interações neuroimunes

O envolvimento dos neurônios C1 em situações aversivas como hipóxia e inflamação, as quais seriam capazes de estimular a produção de vasopressina, ocitocina e o fator liberador de corticotrofina (CRF), tem sido demonstrado sistematicamente (BERQUIN et al., 2000; FORSLING; AZIZ, 1983; GUYENET et al., 2013; HIROOKA et al., 1997; IOVINO et al., 2013; RAFF; ROARTY, 1988; SCHILTZ; SAWCHENKO, 2007; SMITH et al., 1995).

Schiltz e Sawchenko (2007) mostraram que um desafio homeostático com uma injeção sistêmica de IL-1β pode recrutar neurônios catecolaminérgicos do BVLr que enviam projeções ascendentes para modular a atividade de neurônios do PVH, sendo a integridade dessa via determinante nas respostas de ativação hipotalâmica frente a este estímulo (SCHILTZ; SAWCHENKO, 2007).

O conhecimento que um estímulo inflamatório sistêmico pode recrutar uma projeção específica do SNC nos levou a relacionar essa informação a evidencias que mostram que uma situação de baixa perfusão de O_2 pode induzir a atividade de fatores de transcrição no SNC, capazes de promover aumento na expressão de RNA mensageiro de diferentes mediadores inflamatórios (MANALO et al., 2005; OLIVER et al., 2009; SEMENZA, 2014).

Diante destas e outras evidências, nossa segunda hipótese é que uma hipóxia aguda poderia promover um aumento na expressão de citocinas e fatores inflamatórios em núcleos específicos do SNC, como o BVLr e PVH, regiões já conhecidas por participarem de respostas a situações emergenciais (GUYENET et al., 2013). Acreditamos que neurônios C1 podem contribuir significativamente para a ativação dos neurônios do PVH frente uma situação desafiadora para o organismo e que

acreditamos, esteja gerando um processo inflamatório. Essa situação seria a redução dos níveis de O_2 (hipóxia).

Atualmente, estudos têm enfatizado a relação existente entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune (TRACEY, 2009). A inflamação consiste uma resposta do sistema imune envolvida no reparo tecidual e também proteção do organismo. Essa resposta é caracterizada pela interação e mobilização de diferentes tipos celulares e moléculas de sinalização, produzindo alterações locais e sistêmicas. Células efetoras da imunidade inata como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, possuem como característica promover a fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, ativação de proteínas do sistema complemento e também síntese de proteínas de fase aguda, sendo todos esses mecanismos ativados por estímulos específicos (LYMAN et al., 2014; WYNN et al., 2013).

Como citado anteriormente há evidências de que a resposta de ativação do eixo HPA após uma injeção sistêmica de IL-1β possa depender de aferências catecolaminérgicas para o hipotálamo (CHULUYAN et al., 1992; WEIDENFELD et al., 1989), mas, ainda não é claro, se uma situação de hipóxia pode desencadear um recrutamento específico dessas aferências e também estimular a expressão de mediadores do processo inflamatório.

De acordo com a literatura, tanto os neurônios catecolaminérgicos do NTS (A2), quanto do BVL (C1/A1) podem influenciar diretamente o eixo HPA, pois, a lesão dessas regiões foi capaz de reduzir o número de células positivas para fator liberador de corticotrofina (CRF) ativadas e, consequentemente reduzir os níveis plasmáticos de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) após um desafio imune (BULLER et al., 2001). Buller e colaboradores, neste mesmo trabalho, consideram que a lesão de neurônios C1 seja responsável pela menor atividade dos neurônios que expressam CRF sob esta condição, pois a lesão unilateral do BVL praticamente eliminou os terminais adrenérgicos do PVH (BULLER et al., 2001).

Assim como durante a ativação dos quimiorreceptores periféricos, sob influência de um desafio imune, os mecanismos catecolaminérgicos parecem ser essenciais na manutenção da homeostase, e mais que isso, ambas as situações desafiadoras (hipóxia e/ou inflamação), parecem compartilhar o recrutamento da via neural C1- PVH.

Diante de todas as evidências descritas acima, a nossa segunda hipótese está baseada no fato de que uma situação de hipóxia aguda (3 horas) seria capaz de promover a liberação de fatores pró-inflamatórios, que por sua vez podem promover a modulação da via encefálica C1-PVH.

A microglia consiste um dos principais subtipos de células imunológicas associadas com a resposta imune inata e produção de mediadores do processo inflamatório no SNC (ALOISI, 2001). Estas células monitoram ativamente o microambiente, contribuindo para a homeostase no encéfalo e, em casos de inflamação, podem alterar sua morfologia, expressar diferentes genes e adquirir a capacidade de secretar grandes quantidades de citocinas, quimiocinas e outras moléculas (GUNDERSEN et al., 2015). Além dessas funções, trabalhos recentes têm mostrado que a microglia pode estar envolvida em mecanismos de regulação de diferentes processos neurológicos, incluindo regulação de morte celular, eliminação de sinapses, vigilância neuronal e neurogênese, formando um complexo de ações que contribuem para a manutenção e plasticidade de circuitos neurais (MIYAMOTO et al., 2013; WAKE et al., 2009; WAKE et al., 2013).

A comunicação entre os neurônios e a microglia ainda não está claramente descrita. A microglia possui receptores para diferentes neurotransmissores como as purinas, serotonina, noradrenalina, GABA, glutamato e acetilcolina, o que provavelmente proporciona a comunicação entre os dois tipos celulares (GUNDERSEN et al., 2015; POCOCK; KETTENMANN, 2007). Um exemplo de possível comunicação pode ser observado em relação ao neurotransmissor glutamato que ao atuar sobre os receptores ionotrópicos do sub-tipo AMPA na microglia pode desencadear sua ativação e a liberação de TNF. Em presença de um estímulo pró-inflamatório como um aumento dos níveis de TNF, a microglia por sua vez pode também liberar glutamato (NODA et al., 2000; THOMAS et al., 2014).

Além de todas essas características, evidências sugerem que a microglia pode ser ativada pela hipóxia. Tadmouri e colaboradores mostraram em 2014 que camundongos submetidos a 10% de O_2 apresentam uma maior quantidade de microglias ativadas na região do NTS, quando comparado com o grupo de camundongos que permaneceram em normóxia (TADMOURI et al., 2014). Neste

mesmo trabalho, a fim de especificar o papel da microglia foi utilizado um inibidor de atividade microglial, denominado minociclina, que foi capaz de reverter às características inflamatórias apresentada pela microglia induzida pela hipóxia (TADMOURI et al., 2014).

A microglia também pode ser ativada após um estímulo de hipóxia crônica intermitente em ratos. Esse estímulo contribui para que a microglia expresse uma maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias, quando comparado com a expressão gênica dessas substâncias em homogenato composto por outros tipos celulares (SMITH et al., 2013).

Diante das evidências que mostram a importância da microglia com a manutenção de circuitos neurais, sua sensibilidade a hipóxia e capacidade de aumentar a expressão de RNAm para citocinas e fatores inflamatórios sob esta condição, tornou-se imprescindível avaliarmos se o tratamento com minociclina poderia alterar respostas inflamatórias e cardiorrespiratórias ocasionadas pela hipóxia neste trabalho.

A minociclina (7-dimethylamino-6-dimethyl-6-deoxytetracycline) é uma tetraciclina semi-sintética de segunda geração, eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Em relação ao perfil farmacocinético, pode ser rapidamente e completamente absorvida, tem meia-vida longa, apresenta uma excelente absorção tecidual com aproximadamente 100% de biodisponibilidade (BROGDEN et al., 1975; GARRIDO-MESA et al., 2013). Além disso, é altamente lipofílica e pode facilmente atravessar a barreira hematoencefálica (GARRIDO-MESA et al., 2013).

Atualmente, vários estudos têm enfatizado a utilização de propriedades não relacionadas a antibiótico da minociclina, como por exemplo, sua capacidade anti-inflamatória (LOREA-HERNANDEZ et al., 2015; SANTISTEBAN et al., 2015). Um dos primeiros relatos da capacidade da minociclina em exercer um papel anti-inflamatório inibindo a atividade da microglia foi descrita por Yrjänheikki e colaboradores em 1998 e desde então essa característica tem sido utilizada como ferramenta em inúmeros estudos com objetivo de avaliar repostas relacionadas à microglia (LOPEZ et al., 2015; LOREA-HERNANDEZ et al., 2015; SANTISTEBAN et al., 2015; YRJANHEIKKI et al., 1998).

Dentre outros mecanismos, a minociclina é capaz de realizar seu papel inibitório prevenindo a degradação da subunidade inibitória IkB, e assim, reduzir a translocação do fator nuclear kappa B (NF-kB) para o núcleo e sua consequente ativação, o que resulta em uma diminuição na transcrição de mediadores pró-inflamatórios como por exemplo citocinas (GARRIDO-MESA et al., 2013; YRJANHEIKKI et al., 1998) .

A partir de todas essas informações consideramos ser de grande importância a inclusão do tratamento com minociclina aos nossos protocolos experimentais. Essa ferramenta farmacológica nos permitiu caracterizar a importância da microglia sob diferentes respostas desencadeadas pela hipóxia aguda, como na expressão gênica de mediadores inflamatórios, indução da expressão de Fos no BVLr e PVH e em respostas autônomas cardiovasculares e respiratórias.

2 OBJETIVOS

Diante das informações que foram expostas acima, os objetivos específicos do presente estudo foram:

1ª Etapa:

- Avaliar, por meio de métodos de rastreamento neural, se os neurônios catecolaminérgicos localizados no BVLr (grupamento C1) se projetam para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH).
- Avaliar, por meio de métodos de rastreamento neural, se os neurônios catecolaminérgicos do BVLr (grupamento C1), que se projetam para o PVH, estão ativados durante a ativação do quimiorreflexo periférico (hipóxia).
- Investigar se a destruição seletiva dos neurônios catecolaminérgicos do BVLr, que se projetam para o PVH, é capaz de promover alteração na expressão da proteína Fos dos neurônios do PVH em resposta a hipóxia.

2ª Etapa:

- Averiguar se hipóxia aguda é capaz de promover alterações na expressão gênica de mediadores do processo inflamatório no BVLr e PVH e se o tratamento com minociclina é capaz de modificar essa resposta.
- Avaliar se hipóxia aguda também é capaz de alterar a expressão gênica de mediadores do processo inflamatório em órgãos periféricos como pulmão, coração, fígado e rim.
- Avaliar se o tratamento com minociclina é capaz de influenciar a expressão de Fos em neurônios do BVLr e PVH em resposta a uma situação de hipóxia.
- Avaliar se o tratamento com minociclina é capaz de alterar as respostas cardiorrespiratórias ocasionadas pela hipóxia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, adultos, com peso variando entre 250 e 330 gramas, procedentes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas individuais com água e ração (Nuvlab) *ad libitum*, sob condições adequadas de umidade e temperatura e com ciclo claro-escuro de 12 horas.

Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira em Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP em 30/10/2012, registrado sob número 163, na folha 137, do livro 2.

3.2 Procedimentos cirúrgicos

Em todos os procedimentos cirúrgicos foram utilizados métodos assépticos para evitar os riscos de infecções.

3.2.1 Rastreamento neural

As injeções de traçadores foram realizadas em animais anestesiados intraperitonealmente (i.p) com uma mistura anestésica de cetamina (80 mg/kg) e xilasina (7 mg/kg). Os animais foram adaptados a um aparelho estereotáxico Kopf (modelo Kopf 1760) e após uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo para a exposição da calota craniana, o lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos animais.

O primeiro grupo de animais recebeu injeções iontoforéticas (correntes positivas de 3 µA, 7 segundos de duração a cada 7 segundos durante 15 minutos) do traçador anterógrado *Phaseolus vulgaris*- leucoagglutinin - PHA-L (2,5% em tampão fosfato de sódio [PBS] 0.1 M; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na região do

grupamento catecolaminérgico C1 no BVLr utilizando pipetas de vidro com a ponta com diâmetro entre 10 a 15 µm. As coordenadas utilizadas foram: 8,3 µm abaixo da dura-máter, ± 1,8 mm lateral em relação à linha média e 2,7 µm caudal em relação ao lambda. Os animais que receberam as injeções de PHA-L sobreviveram por 15 dias e após esse período foram profundamente anestesiados com pentobarbital (60 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com salina 0,9% seguida de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M para posterior análise imunoistoquímica.

O segundo grupo de animais recebeu injeções iontoforéticas (correntes positivas de 5 µA, por 7 segundos de duração a cada 7 segundos durante 10 minutos) do traçador retrógrado cólera toxina b - CTb (1% em água destilada; List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) na região do PVH utilizando pipetas de vidro com a ponta com diâmetro de 20 µm, a fim de marcar retrogradamente os neurônios da região C1 que se projetam para o PVH. Essas injeções foram feitas utilizando as seguintes coordenadas: AP = -1,2 mm em relação ao bregma; ML = ± 0,4 mm em relação ao seio venoso e DV = -7,8 mm ventral à dura-máter.

Após ambas as cirurgias encefálicas, os ratos receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de pentabiótico veterinário - pequeno porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e do analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,03 ml/rato).

Os animais que receberam as injeções de CTb sobreviveram por 7-10 dias, sendo que após esse período foram submetidos à hipóxia ou normóxia e posteriormente foram profundamente anestesiados com pentobarbital (60 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com salina 0,9% seguida de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M.

3.2.2 Lesões químicas da região catecolaminérgica C1

Os animais foram inicialmente anestesiados intraperitonealmente (i.p) com cetamina (80 mg/kg) e xilasina (7 mg/kg) e adaptados ao aparelho estereotáxico. Injeções unilaterais (2,4 ng/100 nl) da toxina saporina conjugada anti-dopamina β-hidroxilase (anti-DβH-SAP) (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA) foram realizadas utilizando uma seringa Hamilton (5 µl), conectada com um tubo de polietileno

PE-10 a uma agulha injetora com diâmetro interno de 0,3 mm. As coordenadas para as injeções na região PVH seguiram os seguintes parâmetros: AP = -1,2 mm em relação ao bregma; ML= ± 0,4 mm em relação ao seio venoso e DV = -7,8 mm ventral à dura-máter.

Após a cirurgia encefálica, os ratos receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de pentabiótico veterinário - pequeno porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e do analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,03 ml/rato). Os animais que receberam as injeções de anti-DβH-SAP no PVH sobreviveram por 15 dias, sendo que após esse período foram submetidos à hipóxia e posteriormente foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com salina seguida de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M.

3.3 Protocolo de hipóxia

A expressão da proteina Fos promovida pela hipóxia pode ser avaliada após os tecidos serem submetidos à técnica de imunoistoquímica. Alguns dias antes da exposição à hipóxia, os animais foram colocados na câmara de pletismografia, que consiste em uma caixa de acrílico de 5 litros onde o animal pode mover-se livremente. O objetivo deste preparo que antecede o experimento foi permitir que o animal habituasse ao ambiente do estímulo e houvesse menor expressão inespecífica para a proteína Fos.

No dia do experimento, os animais que receberam injeções prévias de CTb ou anti-DβH-SAP no PVH foram aclimatizados por 30 minutos na câmara e depois foram submetidos á hipóxia aguda (HA) (8% O_2, balanceado com nitrogênio [N_2] ou normóxia [N]/controle [21% O_2]), em um fluxo de 1 L/min durante 3 horas, como demonstrado em estudos prévios (BERQUIN et al., 2000; KING et al., 2013). Ao final do estímulo, os ratos foram profundamente anestesiados e perfundidos. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (24-26°C).

3.4 Determinações gasométricas do sangue arterial

Para caracterização do protocolo de hipóxia foi realizado a gasometria arterial. Para isto, os animais foram divididos em dois grupos: normóxia e hipóxia, e foram submetidos à canulação da artéria femoral com um tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) no dia anterior a análise. Através da cânula foi realizada a coleta do sangue arterial (0.2 ml) imediatamente após os estímulos. As amostras de sangue foram transferidas para um cartucho (CG3+, I-Stat) que foi inserido em aparelho de gasometria (I-Sat, Abbot Laboratory, NJ, USA) para análise da pressão parcial de dióxido de carbono arterial ($PaCO_2$), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2), saturação de O_2 do sangue arterial (SaO_2), pH, bicarbonato ($HCO3^-$).

3.5 Histologia encefálica

Ao término dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com volume de 200 ml solução salina seguido por 500 ml de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M, pH 7,4, por meio de uma bomba de infusão com fluxo de 17 ml/min. Os encéfalos foram retirados, guardados nesse fixador por 4 horas e logo após foram transferidos para uma solução de sacarose a 20% em PBS a 4 °C por 24 horas. Após serem removidos da solução de sacarose, os encéfalos foram seccionados em plano coronal numa espessura de 40 µm por meio de um micrótomo de congelamento. Os cortes foram distribuídos em placas contendo 6 colunas e 4 linhas de poços preenchidas com solução crioprotetora (20% de glicerol, 30% de etileno glicol em 50 mM de PBS, pH 7,4) e posteriormente as placas foram armazenadas a -20°C aguardando a análise imunoistoquímica.

Após tratamento imunoistoquímico, os cortes histológicos foram montados em lâminas gelatinizadas e observados no microscópio Zeiss Axioimager A1 (Zeiss, Muenchen, Germany) para localização das microinjeções dos traçadores no BVLr e PVH, assim como a análise das marcações especificadas em cada protocolo experimental. A análise e nomenclatura neuroanatômica foi feita de acordo com os atlas de Paxinos e Watson (1998) (PAXINOS; WATSON, 1998).

3.6 Imunoistoquímica

A detecção do traçador anterógrado PHA-L foi realizada utilizando o anticorpo primário cabra anti-PHA-L (AS2224; Vector, Burlingame, CA; diluição 1:2500). O transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2) e a enzima decarboxilase do ácido glutâmico 65 e 67 (GAD65/67) foram detectados por imunofluorescência utilizando os anticorpos primários porco da índia anti-VGLUT2 (AB2251; Millipore, Temecula, CA, USA; diluição 1: 2000) e coelho anti-GAD65/67 (AB1511; Millipore; diluição 1: 5000), respectivamente.

A imunorreatividade para CTb foi detectada utilizando anticorpo primário cabra anti-cólera toxina b (104; List Laboratories, Burlingame, CA; diluição 1:10000), a enzima tirosina hidroxilase (TH) foi detectada utilizando um anticorpo primário camundongo anti-TH (MAB 318; Millipore; diluição 1:2000) e a imunorreatividade para Fos foi detectada utilizando o anticorpo primário coelho anti-Fos (Ab-5; Calbiochem, Darmstadt, Germany; diluição 1:20.000).

Todos os anticorpos primários foram incubados por 48 horas em PBS contendo 1% soro de burro (017-000-121, Jackson ImmunoResearch Laboratories) e 0,3% Triton 100-X. Os cortes foram posteriormente lavados em PBS e incubados por 2 horas nos respectivos anticorpos secundários: Alexa 594 burro anti-cabra (705-586-147; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA; diluição 1:200) para a imunomarcação do PHA-L, Alexa 488 burro anti- porco da índia (706-545-148; Jackson ImmunoResearch Laboratories, diluição 1:200) para VGLUT2 e Alexa 488 burro anti-coelho (711-545-152; Jackson ImmunoResearch Laboratories, diluição 1:200) para GAD65/67. CTb foi revelado com Alexa 594 burro anti-cabra (705-586-147; Jackson ImmunoResearch Laboratories, diluição 1:200), TH foi revelada com Alexa 488 burro anti-camundongo (715-545-150, Jackson ImmunoResearch Laboratories, diluição 1:200) e para a imunomarcação do Fos foi utilizado Dylight 405 burro anti-coelho (711-475-152; Jackson ImmunoResearch Laboratories, diluição 1:200). Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, cobertas com *ProLong Gold Antifade Mountant* (P36930; Molecular Probes/Life technologies) e lamínula.

No protocolo de imunoperoxidase, o PHA-L foi detectado utilizando o anticorpo primário coelho anti-PHA-L (Dako, Carpenteria, CA; diluição 1:5000), a imunoreatividade para o CTb foi detectada utilizando o anticorpo primário cabra anti-CTb (104; List Laboratories, Burlingame, CA; diluição 1:2000), a enzima TH foi detectada utilizando o anticorpo primário camundongo anti-TH (MAB 318; Millipore; diluição 1:1000) e o Fos, utilizando o anticorpo primário coelho anti-Fos (Ab-5; Calbiochem; dilution 1:10.000). Os cortes foram incubados por 24 horas em uma solução contendo PBS com 10% soro de cavalo (008-000-001; Jackson ImmunoResearch Laboratories) e 0,3% Triton-100X. Após várias lavagens, os cortes foram transferidos para uma solução contendo os respectivos anticorpos secundários biotinilados: cabra anti-coelho (BA-1000, Vector, diluição 1:500) para PHA-L e Fos; burro anti-cabra (705-065-147, Jackson ImmunoResearch Laboratories, diluição 1:500) para CTb e burro anti-camundongo (715-065-151, Jackson ImmunoResearch Laboratories, diluição 1:500) para TH, todos diluídos em PBS contendo 1% soro de cavalo e 0,3% Triton 100-X por 24 horas. Após esse período, os cortes foram lavados e incubados em PBS contendo complexo Extravidin (E2886; Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA; diluição 1:2000) por 4 h.

A reação de peroxidase foi visualizada utilizando a enzima glicose oxidase e diamenobenzidine (DAB) tetrahydrochloride 3,30 como cromógeno para PHA-L e TH, e foi adicionado sulfato de níquel 0,5% para a imunomarcação do Fos e CTb. Os cortes foram lavados em PBS, ordenados em sequência rostro-caudal em lâminas gelatinizadas, desidratados em uma série de concentrações ascendentes de ethanol, transferidos para Xilol e cobertos com DPX (06522; Sigma Aldrich).

3.7 Imagens

O microscópio Zeiss Axioimager A1 (Zeiss, Muenchen, Germany) foi usado para a análise das imagens. A imunofluorescência foi analisada sob iluminação de epi-fluorescência e a imunoperoxidase em campo claro.

As fotomicrografias foram feitas com auxílio da câmera Zeiss Axiocam HRc. As imagens com mais de uma marcação na peroxidase e fluorescência foram analisadas

com o software Axiovision (Zeiss), que permite à aquisição de imagens em diferentes canais fluorescentes, bem como, a subsequente sobreposição das imagens.

O microscópio Zeiss LSM 780-NLO com sistema High Content Imaging InCell Analyzer 2200 GE, foi utilizado para avaliar a co-localização do traçador anterógrado PHA-L com VGLUT2 ou GAD65/67 em varicosidades axonais localizadas no PVH. Image J (versão 1.41; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) foi utilizado para contagem de neurônios e varicosidades e o software Canvas (ACD Systems, Victoria, Canada, v. 9.0) para desenho das imagens.

3.8 Registro de pressão arterial e frequência cardíaca

Dependendo do nível e da duração da hipóxia, podemos observar alterações cardiovasculares. Dessa maneira, foram feitos registros da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados submetidos à hipoxia aguda.

Esta análise foi realizada, a fim de caracterizar a variabilidade da pressão arterial e da frequência cardíaca durante todo o período de exposição à hipóxia (3 horas) e avaliar se durante este período ocorrem mudanças significativas nos parâmetros cardiovasculares, quando comparado a uma situação basal (normóxia).

Para isto, uma mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (7 mg/kg) foram administradas intraperitonealmente e os animais foram submetidos previamente à canulação da artéria femoral na qual um tubo de polietileno (PE-10 ligado a um PE-50) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral, para registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A cânula da artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão (MLT0699, ADInstruments) acoplado a um pré-amplificador (FE221 Bridge Amp, ADInstruments) e ao sistema de registro computadorizado Powerlab (modelo Powerlab 8SP ADInstruments) de 8 canais.

Durante os registros, os ratos foram mantidos em uma câmara de pletismografia que consiste em uma caixa de acrílico de 5 litros, onde o animal pode mover-se livremente. A hipóxia foi realizada infundindo uma mistura de 92% de N_2 e 8% de O_2, a

uma taxa de 1 L/min durante três horas. Os animais controle foram submetidos aos mesmos procedimentos, com exceção de que a câmara foi ventilada com 21% O2 / 79% de N2 durante 3 horas. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (24-26 °C).

3.9 Medida dos níveis de RNA mensageiro por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Dois diferentes grupos experimentais com animais que receberam injeções de veículo ou minociclina foram parte submetidos à hipóxia (8% O_2, balanceado com N_2 por 3h) e parte permaneceram em normóxia (21% O_2, balanceado com N_2 por 3 h) e após os estímulos foram imediatamente sacrificados por decapitação para coleta de tecido encefálico.

Para análise central e periférica dos mediadores inflamatórios, foi feito microdissecação do BVLr, PVH e córtex (controle). Nos animais que receberam somente injeções de veículo foi coletado uma amostra do coração, pulmão, fígado e rim e os tecidos foram imediatamente armazenados em freezer -80°C.

Os tecidos coletados foram mantidos em tubos de centrifugação e o RNA total foi extraído com o kit Illustra RNAspin Mini Kit da General Electrics seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (“Nanodrop 3300” - Thermo scientific, Bremen, Germany). A síntese de cDNA foi realizada com o kit da SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen™) a partir de 1 ug de RNA total e o cDNA foi diluído e destinado para qPCR.

Os níveis de RNAm de diferentes interleucinas (IL) e proteínas relacionadas com o processo inflamatório foram quantificados, utilizando primers Taqman® (Life Technologies). A reação de amplificação foi realizada no aparelho 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies).

A análise dos resultados foi feita com o programa Sequence Detection Software 1.9 (SDS) e a expressão do RNAm foi normalizada pela abundância do HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1) como gene de referência. Todos os

resultados foram expressos em relação à expressão dos respectivos animais controles (normóxia) e aos tratamentos (veículo ou minociclina).

3.10 Medida da ventilação pulmonar

Outro grupo de animais foi submetido a uma situação de hipóxia com 8% O_2, balanceado com N_2 por 10 minutos antes e após o tratamento com minociclina.

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

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

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

animal, pressão barométrica, pressão de vapor de água a temperatura corporal, pressão de vapor de água na câmara do animal e temperatura ambiente.

A V_E é medida pelo produto entre fR e V_T. A V_E e o V_T serão apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, temperatura corporal e saturados com vapor de água.

3.11 Monitoramento dos níveis e da variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca

Após o período de tratamento com veículo ou minociclina por 5 dias, um grupo de animais foram anestesiados intraperitonealmente (i.p) com cetamina (80 mg/kg, i.p) e xilasina (7 mg/kg, i.p), seguido do implante de uma cânula de polietileno na artéria femoral de cada animal. O cateter foi exteriorizado na região escapular por via subcutânea e ao final da cirurgia foram colocados em caixas individuais. No dia seguinte, foi registrado a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) no animal acordado em livre movimentação.

Os registros da PA e FC foram feitos conectando-se a cânula arterial, previamente heparinizada, a um transdutor de pressão (MLT0699, ADInstruments) o qual foi acoplado a um pré-amplificador (FE221 Bridge Amp, ADInstruments) e a um sistema de aquisição de dados digital (modelo Powerlab 8SP ADInstruments) de 8 canais. A frequência de amostragem utilizada para os registros hemodinâmicos foi de 4000 Hertz. Os valores de pressão arterial pulsátil, média e frequência cardíaca bem como da variabilidade da PA e FC foram analisados *off-line*. Após estabilização dos parâmetros observados do animal, foram registrados os valores basais da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) e frequência cardíaca por um período de 3 horas de exposição á hipóxia. A temperatura dentro da sala de registro foi mantida entre 24 e 26º C.

Os índices de atividade simpática e parassimpática foram obtidos por análise da variabilidade da pressão arterial sistólica e intervalo de pulso, avaliados por meio da análise espectral dos registros. Para isto, os registros foram analisados por um programa computacional (Cardioseries, v. 2.4 Brasil – http://sites.google.com/site/cardioseries) desenvolvido por Daniel Penteado Martins Dias

(OLIVEIRA et al., 2012) que detecta pontos de inflexão em sinais periódicos sendo geradas séries temporais da pressão arterial sistólica (SAP) batimento a batimento. Séries temporais de intervalo de pulso (PI) também foram calculadas, pelos intervalos consecutivos dos valores de pressão sistólica. Para cada registro, foram calculados índices de variabilidade da SAP e PI no domínio do tempo e no domínio da frequência, por meio da análise espectral. As séries temporais da SAP e PI foram interpoladas em 20 Hz e divididas em segmentos contínuos de 512 batimentos, sobrepostos em 50%. Cada segmento foi submetido a um “janelamento” do tipo *Hanning* e a análise espectral foi realizada pela transformada rápida de Fourier (FFT). Os componentes oscilatórios encontrados foram quantificados em faixas de baixa (LF: 0,2 a 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 a 3,0 Hz) em valores absolutos e razão LF/ HF.

3.12 Droga utilizada

Cloridrato de minociclina (M9511-Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA): 30 mg/kg/dia durante 5 dias i.p., diluída utilizando 50% salina, 50% água destilada, pH 7,4.

3.13 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Sigma Stat 4.0 (Jandel Corporation, Point Richmond, CA). Os dados foram tabelados e representados em gráficos como média ± erro padrão da média. Teste de Student-Newman-Keuls precedido de análise de variância de uma e duas vias foi utilizado para comparação entre as médias. O índice de significância será fixado em $p < 0,05$.

4 DESCRIÇÃO DO PLANO REALIZADO

4.1 Protocolos experimentais

4.1.1 Evidências anatômicas de projeções do grupamento catecolaminérgico C1 para núcleo paraventricular do hipotálamo durante uma situação de hipóxia aguda

Protocolo Experimental: Um primeiro grupo de animais foi anestesiado com uma mistura de cetamina (80 mg/kg, i.p) e xilasina (7 mg/kg, i.p) e adaptado a um aparelho estereotáxico para injeção do traçador anterógrado PHA-L na região do BVLr, mais especificamente no grupamento catecolaminérgico C1. As coordenadas utilizadas foram as seguintes: 8,3 mm abaixo da dura-máter, 1,8 mm lateral em relação à linha média e 2,7 mm caudal em relação ao lambda. Após 15 dias, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg), perfundidos, os encéfalos foram retirados, cortados em microtómo de congelamento numa espessura de 40 μm e receberam o tratamento de imunoistoquímica para revelação do traçador PHA-L, juntamente com a expressão de marcadores glutamatérgicos (VGLUT2) e gabaérgicos (GAD65/67).

Para a real confirmação da via anatômica entre o grupamento C1 e o PVH, outro grupo de animais foi anestesiado com uma mistura de cetamina (80 mg/kg, i.p) e xilasina (7 mg/kg, i.p) e adaptados a um aparelho estereotáxico para injeção do traçador retrógrado CTb na região do PVH. As coordenadas estereotáxicas utilizadas para atingir o PVH foram as seguintes: AP= -1,2 mm em relação ao bregma; ML= ± 0,4 mm em relação ao seio venoso e DV = -7,8 mm ventral à dura-máter.

Após uma semana, os animais foram expostos a uma situação de hipóxia. Os quimiorreceptores periféricos foram ativados mediante uma diminuição nos valores de O_2 (mistura gasosa de 8% O_2, balanceada com 92% N_2) dentro da caixa de pletismografia durante 3 horas. Imediatamente após o término da hipóxia, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital (60 mg/kg), perfundidos, os encéfalos foram retirados, cortados em microtómo numa espessura de 40 µm e receberam o tratamento de imunoistoquímica para revelação do traçador CTb, juntamente com a expressão da proteína Fos e tirosina hidroxilase (TH) na região C1. Com esse protocolo experimental, avaliamos qual a sub-população de neurônios C1 que projeta-se para o PVH durante uma situação de hipóxia, levando em consideração: a) a localização das células C1 que projetam-se para o PVH (positivo para CTb e TH) e b) as células catecolaminérgicas/ grupamento C1 que projetam-se para o PVH e foram ativadas por hipóxia (estes neurônios devem ser positivos para CTb, TH e Fos). Utilizamos o protocolo de 3 horas de hipóxia, pois esse é o tempo que apresenta maior

expressão da proteína Fos em áreas encefálicas relacionadas ao controle cardiorrespiratório já descritos na literatura e também de trabalhos realizados no nosso laboratório (BERQUIN et al., 2000; HIROOKA et al., 1997; KING et al., 2013; TAKAKURA et al., 2006b).

Está bem descrito na literatura de que a hipóxia aguda promove alterações no metabolismo e na temperatura corporal (MORTOLA, 2013). Dessa maneira, para avaliarmos se estávamos estudando apenas os neurônios ativados pelos quimiorreceptores periféricos, analisamos também o grupamento serotoninérgico na rafe pálido/região parapiramidal (RPa/ppy). Essa região esta bem descrita por ser essencial na regulação da atividade simpática para o tecido adiposo marrom, o qual é imprescindível para controle de temperatura corporal. Diante dessas evidencias, avaliamos se a hipóxia aguda promove a ativação de neurônios envolvidos no controle da temperatura corporal. Com esse protocolo experimental, temos um controle experimental que nos mostra como está à ativação neuronal, frente a uma hipóxia aguda.

4.1.2 A integridade do grupamento C1 é necessária para que os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo sejam ativados pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos

Protocolo experimental: O próximo protocolo experimental consistiu em comparar a ativação do PVH, induzida por hipóxia, em um grupo de animais que receberam injeções unilaterais da imunotoxina saporina conjugada com anti-dopamina β hidroxilase (anti-DβH-SAP) na região do PVH com o objetivo de eliminar os terminais adrenérgicos dessa região e promover a destruição retrógrada ipsilateral das células do grupamento C1. Essa imunotoxina consiste em um anticorpo conjugado com a dopamina β-hidroxilase, enzima que converte a dopamina em noradrenalina. A enzima DβH está associada à membrana das vesículas, e, portanto, é exposta extracelularmente durante o processo de exocitose na liberação do neurotransmissor. Esta exposição permite que a porção do anticorpo da imunotoxina se ligue a DβH. Após a reciclagem vesicular por endocitose, a anti-DβH-SAP é levada para o interior do neurônio. Uma vez dentro do neurônio, a saporina inativa a subunidade 60s dos ribossomos, desta forma bloqueando a síntese protéica, e causando morte celular

(STIRPE; BARBIERI, 1986). Os neurônios não estão mais funcionais após 3-4 dias e fisicamente eliminados em aproximadamente 12 dias após a injeção da toxina (PERRY et al., 2001). Após 15 dias, os animais que receberam injeções de DβH-sap no PVH, foram expostos a uma situação de hipóxia (8% O_2, balanceado com N_2) durante um período de 3 horas. Imediatamente após o término da hipóxia, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg), perfundidos, os encéfalos foram retirados, cortados em micrótomo numa espessura de 40 µm e receberam o tratamento de imunoistoquímica para revelação da expressão da proteína Fos e tirosina hidroxilase (TH) na região do grupamento C1 e PVH.

Para avaliar se os neurônios do BVL/ grupamento catecolaminérgico C1, bem como suas projeções hipotalâmicas são necessárias para um adequado funcionamento dos neurônios do PVH numa situação de hipóxia, avaliamos se há redução do número de neurônios imunorreativos para a proteína Fos na região do PVH, o que justificaria possíveis alterações nas respostas desencadeadas por este núcleo durante a ativação do quimiorreflexo periférico em situações de depleção de vias catecolaminérgicas envolvendo uma integração bulbo e hipotálamo (SCHILTZ; SAWCHENKO, 2007). Além disso, avaliamos a expressão de Fos e TH no BVLr a fim de caracterizar se a destruição seletiva dos neurônios catecolaminérgicos reduz significativamente a expressão de TH e Fos em animais submetidos á hipóxia.

4.1.3 Determinação dos níveis de RNA mensageiro para IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, CD86, matriz metaloproteinase 9 (MMP-9) e matriz metaloproteinase 2 (MMP2) após hipóxia em animais tratados com veículo ou minociclina

Protocolo experimental: Para análise central e periférica dos mediadores inflamatórios, foi feito microdissecação do BVLr, PVH e córtex (controle), coração, pulmão, fígado e rim. O RNA total foi extraído dos tecidos, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro, a síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total e o cDNA resultante foi diluído e destinado para qPCR. Os níveis de RNAm de diversos mediadores do processo inflamatório foram quantificados utilizando primers Taqman® (Life Technologies). A reação de amplificação foi realizada no aparelho 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies).

Existem poucas informações na literatura mostrando possíveis interações neuro-imunes em uma situação de exposição á hipóxia *in vivo*. Experimentos realizados utilizando um protocolo de hipóxia crônica intermitente mostraram que este estímulo foi capaz de promover a expressão de diferentes genes inflamatórios no SNC e que a expressão e o tipo de gene diferem entre a microglia isolada presente em diferentes regiões do SNC e homogenatos de tecido (SMITH et al., 2013).

Diante disso, o nosso protocolo experimental procurou avaliar se a exposição á hipóxia por 3 horas é capaz de desencadear um processo inflamatório e promover um aumento na expressão de mediadores inflamatórios em núcleos específicos do SNC, e mais que isso, avaliamos também os efeitos da inibição da atividade da microglia por meio da injeção da tetraciclina minociclina (30 mg/kg/dia, por 5 dias) sob as respostas inflamatórias centrais desencadeadas pela hipóxia.

4.1.4 Minociclina pode influenciar a expressão de Fos em neurônios do BVLr e PVH e alterar as respostas respiratória e autônomas cardiovasculares desencadeadas pela hipóxia

Protocolo experimental: A primeira etapa desse grupo de experimentos visou avaliar se a inibição da atividade da microglia seria capaz de desencadear uma alteração na expressão de Fos em neurônios catecolaminérgicos do BVLr e também em neurônios do PVH. Para isso um grupo de animais recebeu injeções intraperitoneais de minociclina (30 mg/kg/dia) ou veículo por 5 dias. Ao final do tratamento, parte dos animais permaneceram em normóxia e parte foi submetida à hipóxia por 3h. Ao término dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo. Os encéfalos foram seccionados e submetidos à análise imunoistoquímica. O protocolo de imunoperoxidase foi utilizado para a marcação da enzima TH e Fos. Uma alteração na expressão de Fos nos neurônios catecolaminérgicos do BVLr e em neurônios do PVH após a hipóxia nos animais tratados com minociclina nos indica uma possível inter-relação entre a microglia e neurônios durante a hipóxia.

A segunda etapa dos experimentos objetivou avaliar se o tratamento com minociclina promoveria uma alteração do padrão de respostas clássicas desencadeadas pela hipóxia como respostas respiratórias e cardiovasculares. Animais

tratados previamente com veículo e posteriormente com minociclina foram expostos a hipóxia por 10 minutos, e tiveram os parâmetros respiratórios (V_E, V_T e f_R) avaliados por meio de pletismografia de corpo inteiro. Após um intervalo de 6 horas, esses animais tiveram a artéria femoral canulada para posterior registro de parâmetros cardiovasculares para monitoramento dos níveis e da variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca durante 3h de hipóxia.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos da hipóxia na gasometria arterial

O período de 3 horas de hipóxia foi capaz de aumentar o pH (7,54 ± 0,02 vs. normóxia 7,38 ± 0,02, p = 0,001) e diminuir significativamente a PaO_2 (25,6 ± 0,81 vs. normóxia 80 ± 4,45, p<0,0001), sO_2 (64,60 ± 2,22 vs. normóxia 94,9 ± 0,04, p<0,0001), $PaCO_2$ (13,88 ± 1,35 vs. normóxia 32,44 ± 2,11, p<0,0001) e HCO_3- (13,8 ± 1,3 vs. normóxia 23,08 ± 1,99, p = 0,004) (Tabela 1).

Tabela 1: Alterações gasométricas produzidas após 3 horas em normóxia (21% O_2 balanceado com N_2) e 3 horas em hipóxia (8% O_2 balanceado com N_2).

	pH	PaO_2 (mmHg)	sO_2(%)	$PaCO_2$(mmHg)	HCO_3^- (mmol/L)
Normóxia (n=5)	7,38 ± 0,02	80 ± 4,45	94,9 ± 0,04	32,44 ± 2,11	23,08 ± 1,99
Hipóxia (n=5)	7,54 ± 0,02*	25,6 ± 0,81*	64,60 ± 2,22*	13,88 ± 1,35*	13,8 ± 1,3*

Abreviações:
PaO_2 Pressão parcial arterial de O_2
sO_2 Saturação de O_2
$PaCO_2$ Pressão parcial arterial de CO_2
HCO_3^- Bicarbonato
***** Diferente de Normóxia

5.2 Hipóxia aguda ativa neurônios do BVLr

Para avaliar a ativação de neurônios do BVLr por hipóxia, foi utilizado o protocolo de imunoistoquímica para a proteína Fos. A figura 1 A-B mostram os exemplos de células ativadas (imunorreativas para Fos, marcadas em níquel) no BVLr de animais que foram expostos durante três horas de normóxia (grupo controle) (21% O_2) ou três horas de hipóxia (8% O_2) respectivamente. Nos animais controles (normóxia) foi verificada uma pequena quantidade de células marcadas para Fos no BVLr (Fig. 1A). Em uma situação de hipóxia, há um aumento significativo no número de células ativadas na região do BVLr (67,5 ± 2,5, vs. normóxia: 11,5 ± 1,5, $p = 0,002$; $n = 4$) (Figs. 1A-C).

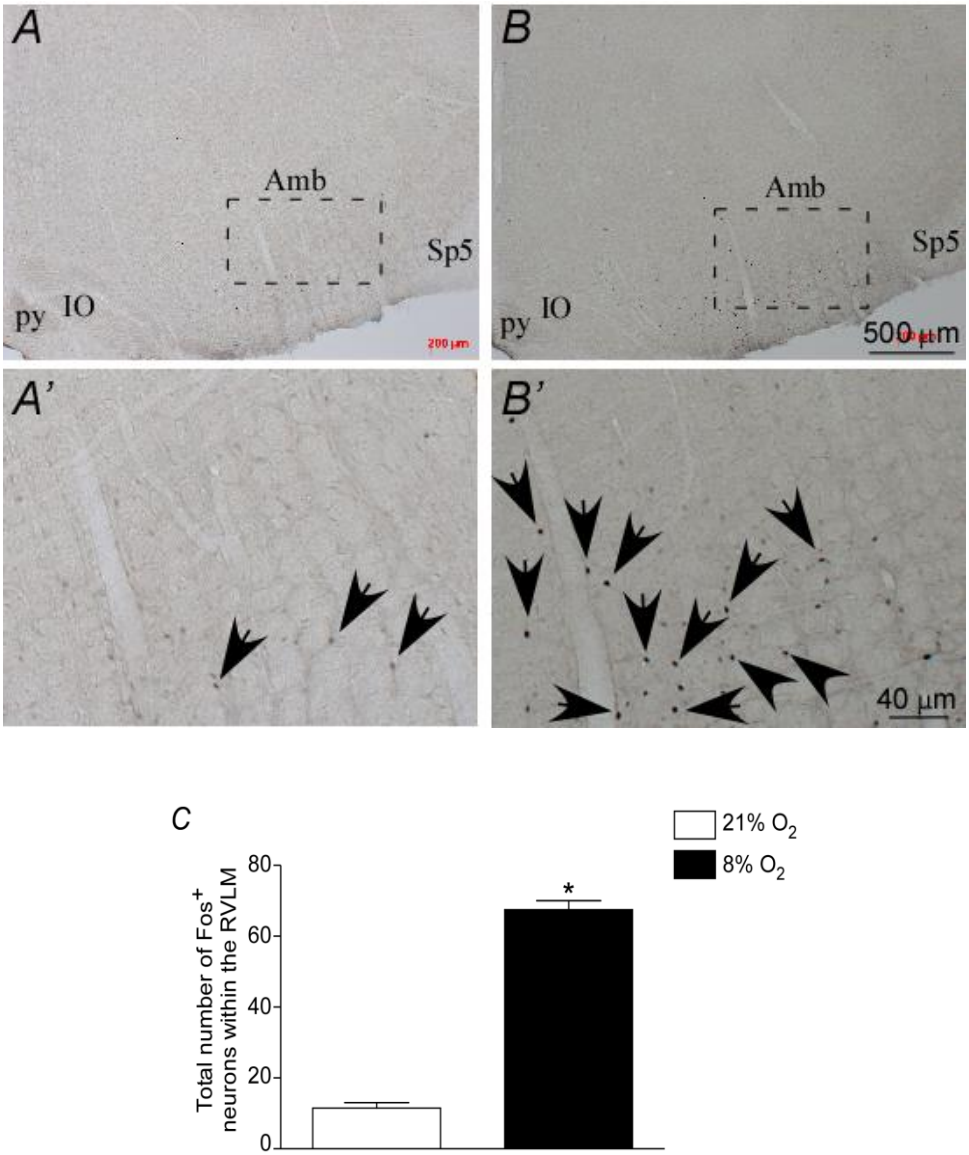

Figura 1. Hipóxia aguda ativa neurônios do BVLr

Fotomicrografia de secções coronais do BVLr que receberam tratamento imunoistoquímico para Fos marcado em níquel-DAB. A) Expressão de Fos após normóxia; B) expressão de Fos após hipóxia. C) Número total de neurônios imunorreativos para Fos no BVLr em resposta a normóxia e hipóxia. As células ativadas foram contadas em 5 níveis do BVLr: -12.72 a -11.60 mm relativos ao bregma. *Diferente do grupo controle (p = 0,002), n = 4. Abreviações: py: trato piramidal; Sp5: trato espinal do trigêmio; IO: olivas inferiores. Escalas em A-B = 500 µm; A'- B'= 40 µm.

5.3 Neurônios catecolaminérgicos do BVLr são ativados por hipóxia

As figuras 2 A-B ilustram exemplos de células catecolaminérgicas do BVLr que estão ativadas em uma situação de normóxia e hipóxia respectivamente. Para esta análise foram contabilizados os neurônios que expressaram dupla marcação para TH e Fos (TH^+/Fos^+), marcados por imunoístoquimica respectivamente por DAB e DAB-níquel bilateralmente no BVLr.

Após a hipóxia, podemos observar que houve uma aumento significativo do número de neurônios catecolaminérgicos do BVLr que foram ativados (46 ± 6,2 vs. normóxia: 9,5 ± 1,0, $p = 0,02$; $n = 4$) (Fig. 2C).

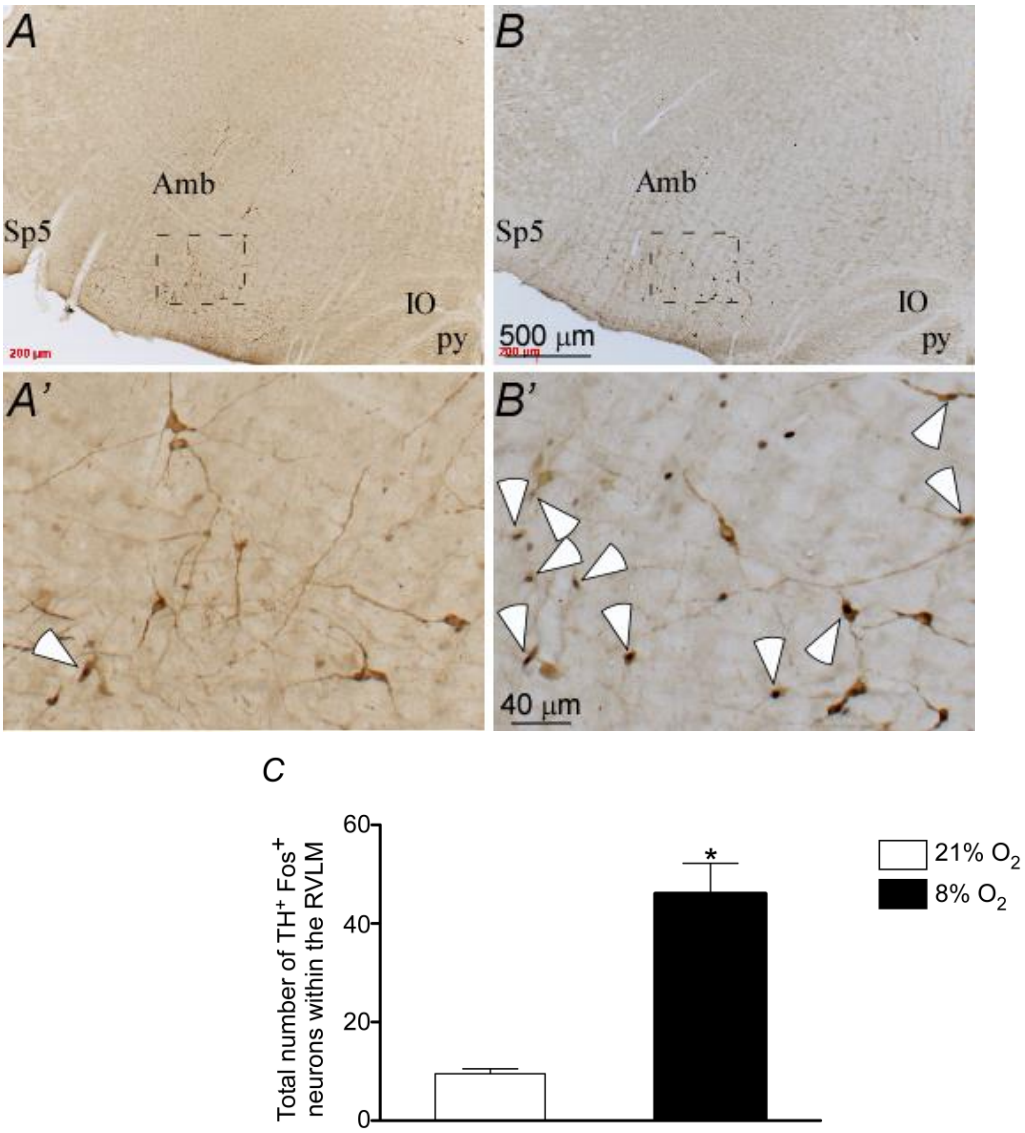

Figura 2. Hipóxia aguda ativa neurônios catecolaminérgicos do BVLr

As fotomicrografias ilustram secções coronais do BVLr que receberam tratamento imunoistoquímico para TH e Fos. A) Expressão de TH^+/Fos^+ após normóxia; B) expressão de TH^+/Fos^+ após hipóxia. As setas brancas indicam neurônios duplamente marcados para TH e Fos. C) Média do número total de neurônios imunorreativos para TH e Fos no BVLr em resposta a normóxia e hipóxia. As células ativadas foram contadas em 5 níveis do BVLr: -12.72 a -11.60 mm relativos ao bregma. *Diferente do grupo controle ($p = 0,02$), $n = 4$. Abreviações: Amb: núcleo ambíguo; py: trato piramidal; Sp5: trato espinal do trigêmio; IO: olivas inferiores. Escalas em A-B = 200 µm.

5.4 Caracterização neuroanatômica de projeções do grupamento C1 para o PVH

5.4.1 Traçador anterógrado

A fotomicrografia na figura 3B, ilustra o sítio de injeção do traçador anterógrado PHA-L localizado na região do BVLr, abaixo do núcleo ambíguo, atingindo a região descrita como “região pressora” (WILLETTE et al., 1983). Os centros das injeções localizaram entre 11,80 a 12,30 mm caudal ao bregma, região de maior concentração dos neurônios que compõem o grupamento catecolaminérgico C1 (GUYENET et al., 2013).

A imunorreatividade para o PHA-L foi analisada nas regiões anterior, medial e posterior do PVH em todos os casos analisados. Foi observada uma quantidade moderada de varicosidades imunorreativas para PHA-L (Figs. 3D e 4A), ipsilateral a injeção, em todas as porções da divisão parvocelular do PVH, em especial nas porções medial e dorsal desta divisão (Fig. 4A). Os nossos achados estão em concordância com dados da literatura (CARD et al., 2006; SAWCHENKO et al., 1985).

A etapa seguinte foi verificar se as varicosidades contendo PHA-L seriam predominantemente glutamatérgicas ou GABAérgicas. Para isso, as secções dos mesmos casos foram reagidas por imunofluorescência para detecção de PHA-L e VGLUT2 ou PHA-L e GAD 65/67 e posteriormente analisadas por microscopia confocal.

As varicosidades marcadas com PHA-L na região do PVH foram predominantemente excitatórias, isto é 81,5% do total de varicosidades marcadas com PHA-L foram imunorreativas para VGLUT2 (PHA-L+VGLUT2: 396 ± 31, vs. total de PHA-L: 486 ± 18, $p = 0,1$; $n = 3$). Somente 34% do total de varicosidades marcadas com PHA-L foram imunorreativas para GAD 65/67 (PHA-L+GAD 65/67: 158 ± 33, vs total de PHA-L: 464 ± 62, $p = 0,04$; $n = 3$) (Figs. 4B-H).

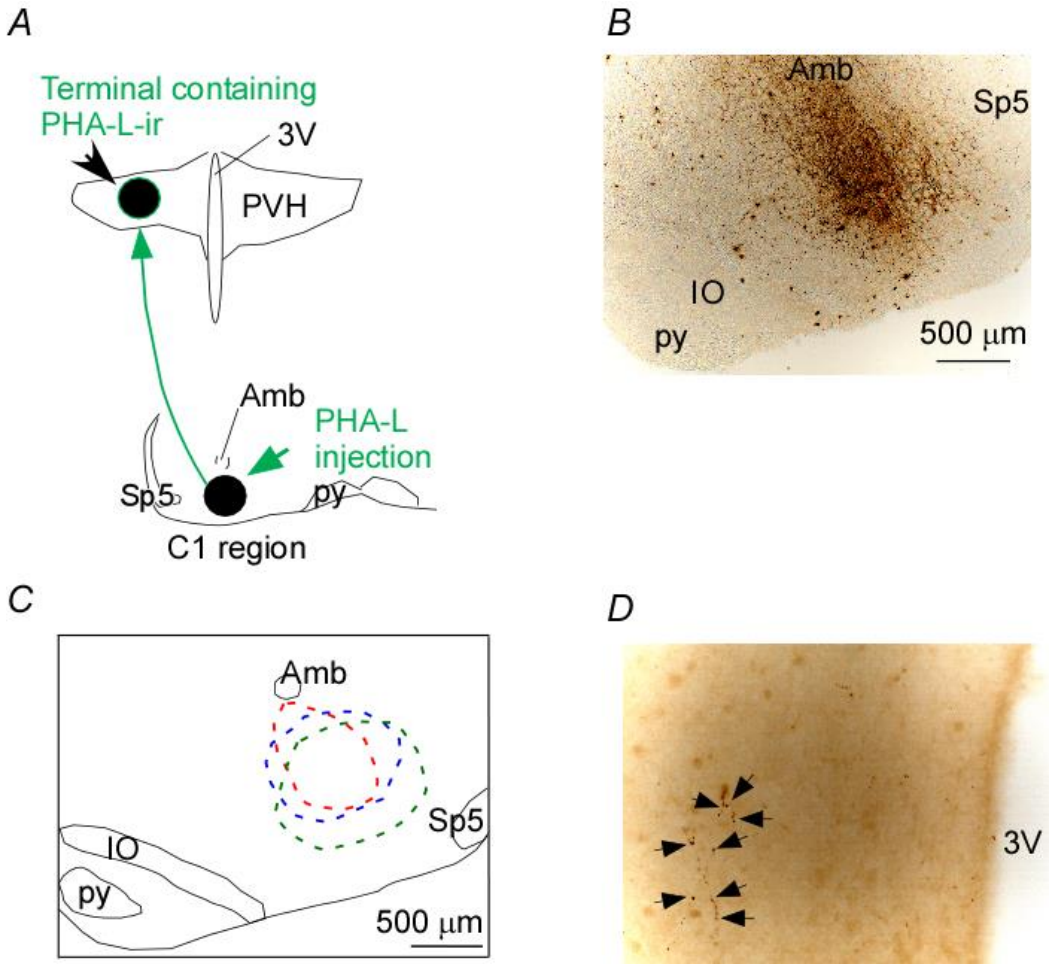

Figura 3: Localização das injeções de PHA-L no BVLr

A) Modelo esquemático do protocolo experimental de injeção de traçador anterógrado no BVLr. B) Fotomicrografia de uma secção coronal mostrando injeção unilateral do traçador anterógrado PHA-L no BVLr, bregma: 11,96 mm. C) Secção coronal esquemática da localização e distribuição das injeções de PHA-L no BVLr, n = 3. D) Fotomicrografia de uma secção coronal mostrando varicosidades contendo PHA-L na divisão parvocelular do PVH, bregma 1,8 mm. Seta preta: PHA-L^{+}. Abreviações: Amb, núcleo ambiguo; C1; grupamento catecolaminérgico do bulbo ventrolateral rostral; IO: olivas inferiores; PVH, núcleo paraventricular do hipotálamo; py: trato piramidal; Sp5: trato espinal do trigêmio; 3V, terceiro ventrículo. Escalas em B e C = 500 µm.

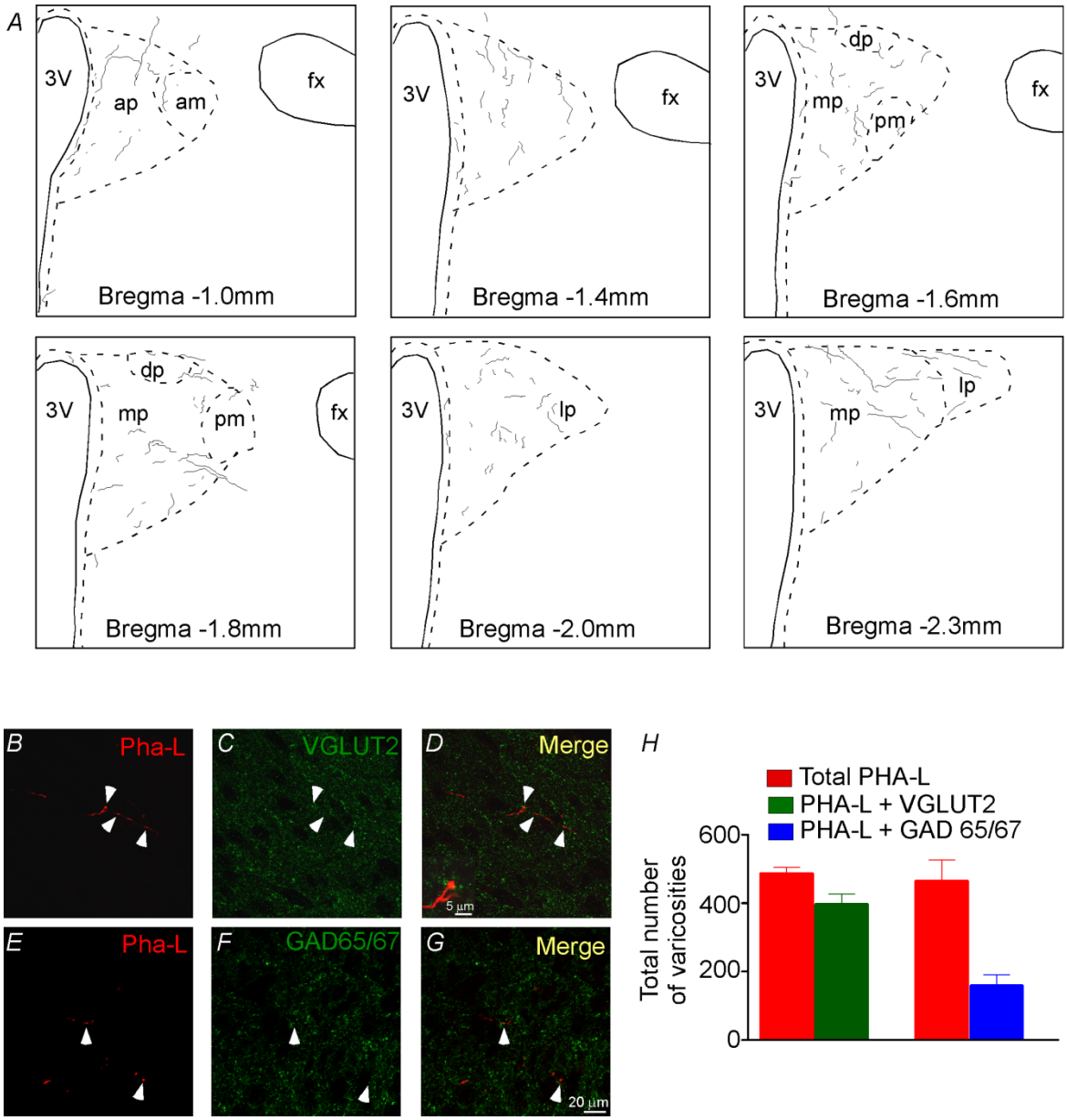

Figura 4. Projeções do BVLr para o PVH

A) Representação esquemática da distribuição de varicosidades contendo PHA-L na região do PVH ao longo do bregma. As varicosidades foram contadas em 6 níveis do hipotálamo: -1,00 a -2,30 mm relativos ao bregma, n = 3. B-D) Exemplos de varicosidades marcadas com PHA-L (vermelho em B) que foram imunorreativas para VLGUT2 na região parvocelular do PVH (Verde em C, amarelo em D). E-G) Exemplos de varicosidades marcadas com PHA-L (vermelho em E) que foram imunorreativas para GAD 65/67 na região parvocelular do PVH (Verde em F, amarelo em G). H) Número total de varicosidades imunorreativas para PHA-L que contêm VGLUT2 ou GAD 65/67. Setas brancas representam as varicosidades com dupla marcação, ou seja, PHA-L^{+}/VGLUT2^{+} ou PHA-L^{+}/GAD 65/67^{+}. Escala em A = 500 µm; em G = 20 µm. Abreviações: ap, anterior parvicellular; am, anterior magnocellular; dp, dorsal parvicellular; mp, medial parvicellular; pm, posterior magnocellular; lp, lateral parvicellular; 3V, terceiro ventrículo; fx: fornix.

5.5 Neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 ativados numa situação de hipóxia se projetam para o PVH

5.5.1 Traçador retrógrado

Sabe-se que há uma moderada quantidade de neurônios do BVLr que são catecolaminérgicos, imunorreativos para a enzima PNMT, e que se projetam para o hipotálamo (CUNNINGHAM et al., 1990), sendo esta projeção principalmente relacionada à regulação do eixo hipotálamo hipófise adrenal (GUYENET et al., 2013).

Ao confirmarmos a existência das varicosidades glutamatérgicas vindas do BVLr no PVH e associar essa informação com a significativa quantidade de neurônios catecolaminérgicos do BVLr (possivelmente neurônios C1) que expressam Fos em uma situação de hipóxia, consideramos importante saber qual seria a proporção desses neurônios que, além de expressarem Fos durante uma hipóxia aguda, também são catecolaminérgicos e se projetam para o PVH.

Sendo assim, para avaliar se neurônios catecolaminérgicos/C1 que se projetam para o PVH estão ativados em uma situação de hipóxia foram realizadas injeções unilaterais do traçador retrógrado CTb na região do PVH que, após transporte axoplasmático, é capaz de se expressar no corpo celular dos neurônios do BVLr. Os locais de injeções de CTb no PVH foram verificados histologicamente. A figura 5B representa um sítio de injeção e a figura 5C ilustra o resumo de todos os sítios de injeções incluídos neste estudo.

Nos animais que receberam as injeções de CTb no PVH, foram observados, em secções do BVLr, neurônios catecolaminérgicos (imunorreativos para TH [TH^+]), que se projetam para o PVH (imunorreativos para CTb [CTb^+] e estão ativados (Fos^+) após serem submetidos à três horas de hipóxia (Fig. 6A-D).

A figura 6E, representa a média do número total de neurônios marcados ipsilaterais a injeção para, TH^+ (46,25 ± 0,67), CTb^+ (15,25 ± 3), Fos^+ (42,65 ± 0,67), $Fos^+CTb^+TH^+$ (10,25 ± 1,7) e $Fos^+CTb^+TH^-$ (1,75 ± 2,06), como ilustrado a seguir.

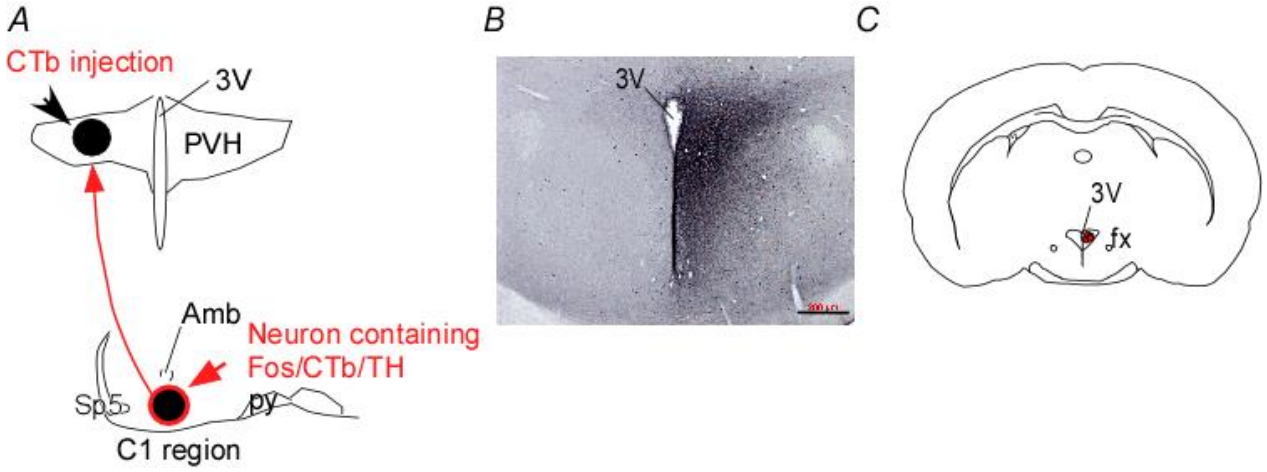

Figura 5. Localização das injeções de CTB no PVH

A) Modelo esquemático do protocolo experimental de injeção de traçador retrógrado no PVH. B) Fotomicrografia de uma secção coronal mostrando injeção unilateral do traçador retrógrado CTb na região do PVH, n=4. C) Secção coronal esquemática da localização das injeções unilaterais no PVH. Abreviações: 3V: terceiro ventrículo; fx: fornix. Escala em B = 200 µm.

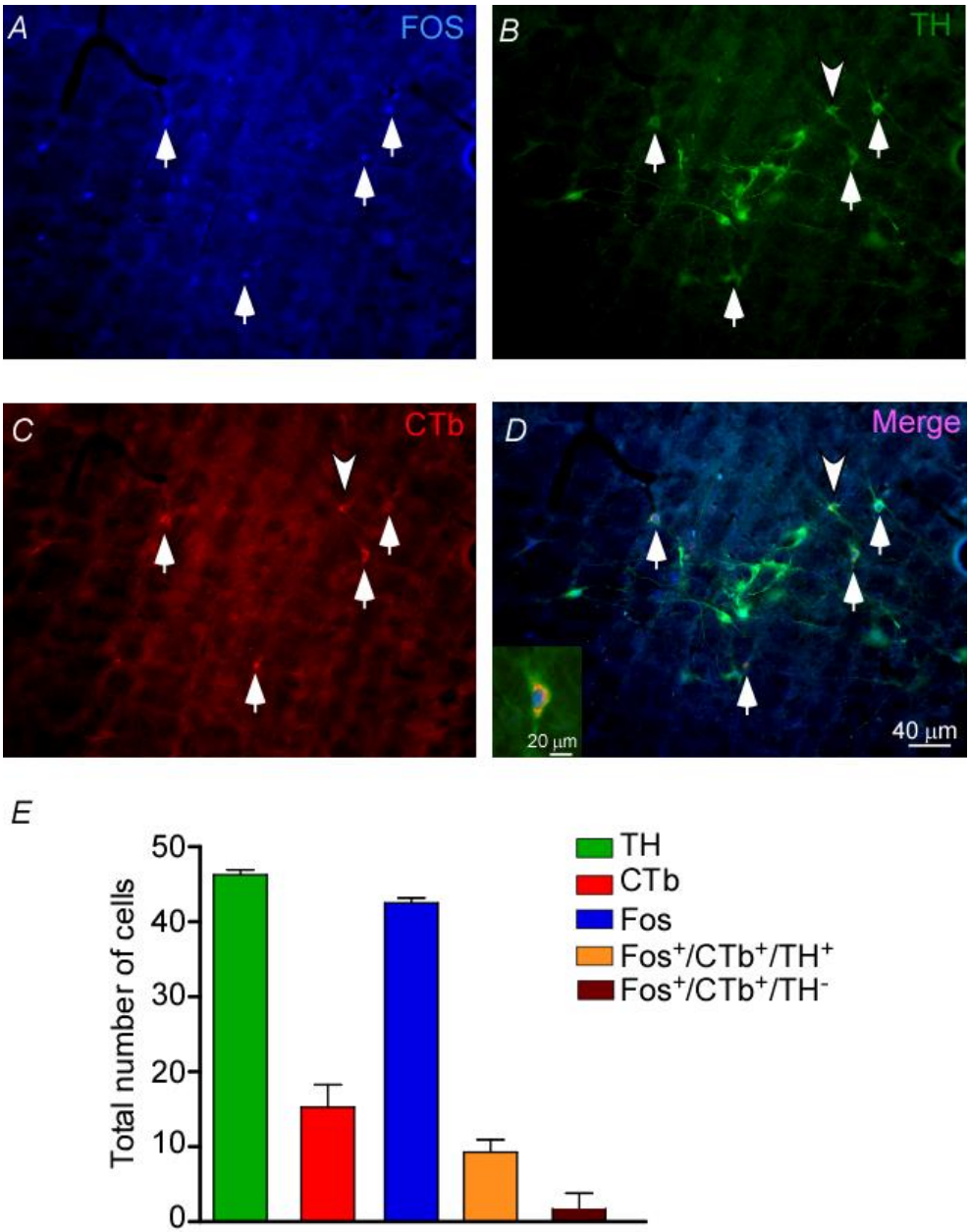

Figura 6. Neurônios do BVLr responsivos à hipóxia são catecolaminérgicos e se projetam para o PVH

Fotomicrografia representativa de tripla marcação em imunofluorescência. A) Neurônios imunorreativos para Fos em azul (Dylight 405). B) neurônios imunorreativos para TH em verde (Alexa 488). C) neurônios imunorreativos para CTb em vermelho (Alexa 594). D) Co-localização de neurônios catecolaminérgicos que se projetam para o PVH e são ativados por hipóxia - imunorreativos para TH/ CTb/ Fos, respectivamente. Setas brancas: Fos^{+}/ CTB^{+}/TH^{+}. E) Número total de neurônios do BVLr ipsilateral à injeção de CTb em resposta a hipóxia. As células marcadas por imunoistoquímica foram contadas em 5 níveis do BVLr: -12.72 a -11.60 mm relativos ao bregma, n = 4. Escala em D = 40 µm e 20 µm.

5.6 Hipóxia aguda não altera a expressão de Fos em neurônios do grupamento serotoninérgico na rafe pálido/região parapiramidal (RPa/ppy)

Diante do fato da hipóxia promover uma diminuição do metabolismo corporal e queda na temperatura, foi realizada uma avaliação da região da rafe pálido/região parapiramidal (RPa/ppy) quanto à expressão de Fos pelo protocolo de hipóxia aguda. Para isso, secções da RPa/ppy foram avaliadas quanto a expressão de triptofano hidroxilase (TrpOH), enzima que participa da síntese de serotonina e Fos por meio da técnica de imunoperoxidase.

Não foi observado expressão de Fos na região nos neurônios imunorreativos para TrpOH na região da RPa/ppy (Fig. 7).

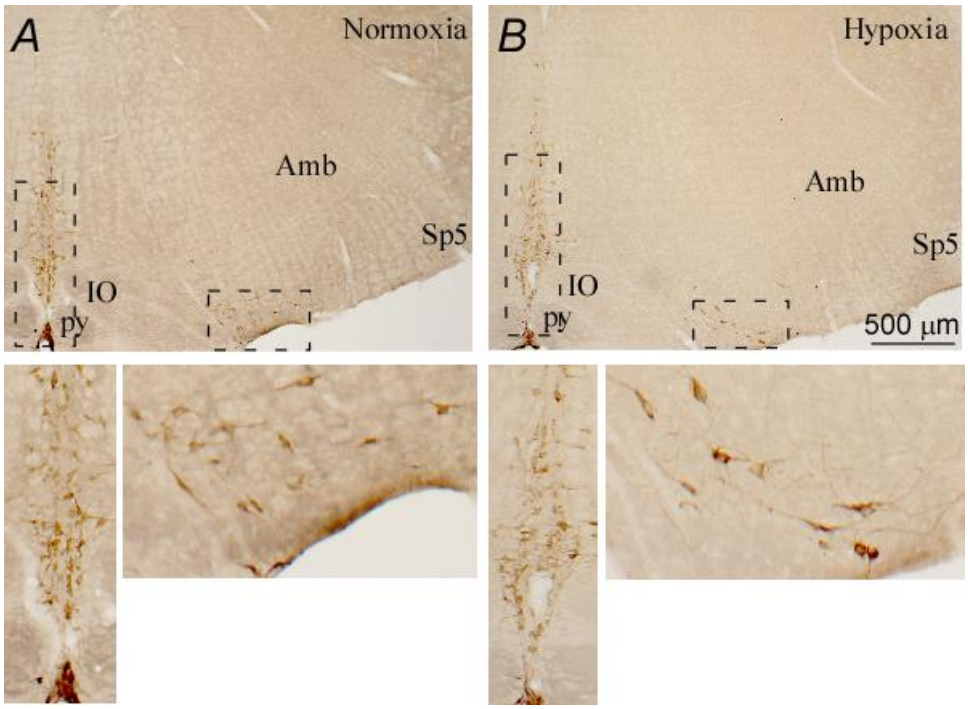

Figura 7. Hipóxia aguda não ativa neurônios serotoninérgicos da RPa/ppy

As fotomicrografias ilustram secções coronais do BVLr que receberam tratamento imunoistoquímico para TrpOH e Fos. A) Expressão de TrpOH /Fos após normóxia; B) expressão de TrpOH/Fos após hipóxia. As células marcadas foram avaliadas em 6 níveis do BVLr: -12.72 a -11.30 mm relativos ao bregma. n = 4. Abreviações: Amb, núcleo ambíguo; IO: olivas inferiores; py: trato piramidal; Sp5: trato espinal do trigêmio. Escalas em A-B = 500 µm.

5.7 Saporina anti-DβH no PVH é efetiva na lesão dos neurônios catecolaminérgicos do bulbo ventrolateral rostral (BVLr)

Para uma melhor descrição da via C1-PVH, foram realizadas injeções unilaterais da imunotoxina saporina anti-DβH na região do PVH com o objetivo de promover degeneração retrógrada dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1.

As injeções no PVH foram unilaterais a fim de utilizar o lado contralateral como controle. A eficácia da lesão, juntamente com o comprometimento da inervação catecolaminérgica foi avaliada analisando-se: a) a localização do sítio de injeção da toxina no PVH; b) os neurônios imunorreativos para TH no tronco encefálico foram quantificados para avaliação da porcentagem da lesão.

Injeções unilaterais de saporina conjugada com anti-DβH (Figs. 8A-B) no PVH foram capazes de promover degeneração retrógrada ipsilateral eliminando-se aproximadamente 41% das células catecolaminérgicas localizadas no BVLr (33 ± 5,6, vs. lado controlateral: 56 ± 4; $p = 0,01$) (Figs. 9 A-B). A figura 9C representa a média do número total de neurônios TH contados em 5 níveis do BVLr: -12.72 a -11.60 mm relativos ao bregma.

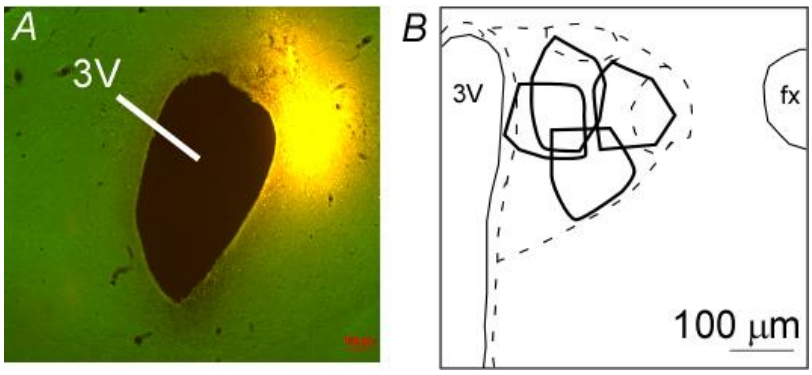

Figura 8. Localização das injeções unilaterais da toxina saporina conjugada com anti-DβH no PVH

A) Fotomicrografia de uma secção coronal mostrando injeção unilateral de saporina anti-DβH no PVH. A foto mostra fluorescência às microesferas de látex adicionado à imunotoxina para auxiliar a verificação do sítio de injeção. B) Secção coronal esquemática mostrando localização das injeções unilaterais de anti-DβH no PVH, n = 4. Abreviações: VL: ventrículo lateral; 3V: terceiro ventrículo e fx: fórnix. Escalas em A-B = 100 µm.

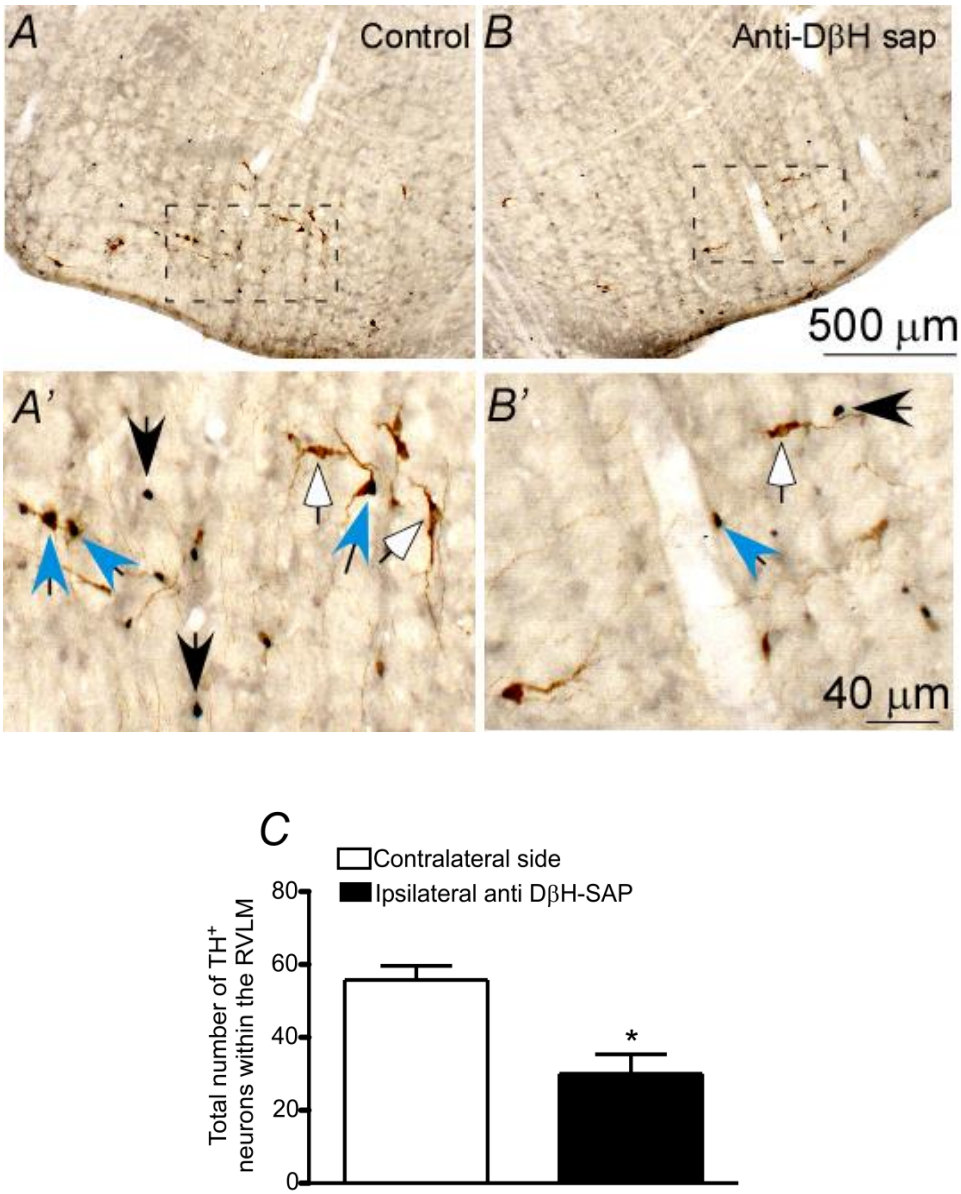

Figura 9. Injeção unilateral da toxina saporina conjugada com anti-DβH no PVH reduz seletivamente neurônios catecolaminérgicos do bulbo ventrolateral rostral (BVLr)

Fotomicrografia de uma secção coronal do BVLr mostrando o tratamento imunoistoquímico para tirosina hidroxilase (setas pretas). A) Lado contralateral a injeção de saporina anti-DβH no PVH com maior número de células imunorreativas para TH (controle). B) A injeção unilateral da toxina saporina anti-DβH no PVH promoveu degeneração retrógrada ipsilateral de neurônios catecolaminérgicos (TH^+) do BVLr. C) Média do número total de neurônios TH^+ contados em 5 níveis do BVLr: -12.72 a -11.60 mm relativos ao bregma. *Diferente do grupo controle ($p = 0.01$); $n = 4$. Abreviações: Amb: núcleo ambíguo; py: trato piramidal; Sp5: trato espinal do trigêmio; IO: olivas inferiores. Escalas em A-B = 500 µm; A' – B' 40 µm.

5.8 Saporina anti-DβH no PVH reduz o número de neurônios catecolaminérgicos do BVLr ativados por hipóxia

Injeções unilaterais da toxina saporina anti-DβH (Figs. 8A-B) no PVH não foram eficazes em promover uma diminuição significativa da expressão de neurônios não catecolaminérgicos ativados por hipóxia (Fos^+/TH^-) (27 ± 4, vs. contralateral 35 ± 5, p = 0,28, n = 4) no BVLr (Fig. 10A). Por outro lado, observamos uma redução significativa de neurônios catecolaminérgicos ativados no BVLr (Fos^+/TH^+) (10 ± 2,5, vs. contralateral 18 ± 2, p = 0,04, n = 4) (Fig. 10B). Esses resultados sugerem que parte dos neurônios catecolaminérgicos do BVLr ativados pela hipóxia (55%) se projetam para o PVH.

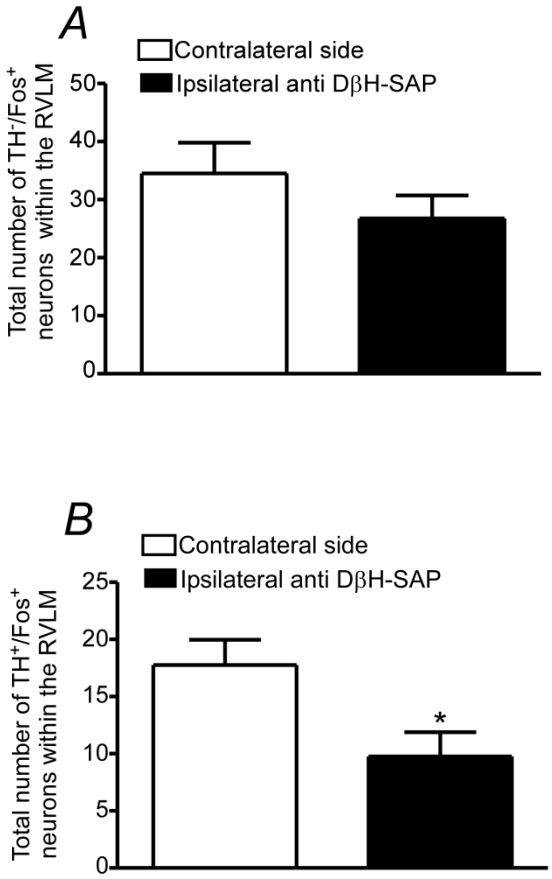

Figura 10. Injeção unilateral da toxina saporina anti-DβH no PVH alterou o número de neurônios catecolaminérgicos ativados por hipóxia do bulbo ventrolateral rostral (BVLr)

A) A injeção unilateral da toxina saporina anti-DβH no PVH não promoveu alteração no número de neurônios não catecolaminérgicos do BVLr ativados após hipóxia aguda (Fos^+/TH^-). B) Número de neurônios catecolaminérgicos ativados por hipóxia (Fos^+/TH^+) no BVLr. O lado contralateral a injeção de saporina anti-DβH foi utilizado como controle. Foram analisados 5 níveis do BVLr: -12.72 a -11.60 mm relativos ao bregma. *Diferente do grupo controle (p=0,04); n = 4.

5.9 Saporina anti-DβH no PVH reduz o número de neurônios catecolaminérgicos do BVLr contralateral

Diante da possibilidade dos neurônios catecolaminérgicos bilaterais do BVLr poderem se projetar para o PVH, decidimos comparar o lado ipsilateral e contralateral do BVLr de animais que receberam injeção de saporina anti-DβH no PVH com outro grupo de animais controle, os quais receberam injeção de salina no PVH.

De acordo com a figura 11A, podemos observar que em comparação com o grupo controle, como esperávamos, houve uma redução do número de neurônios TH^+ (33 ± 5, vs. controle: 84 ± 11, p = 0,007, n = 4) no lado ipsilateral a injeção de saporina anti-DβH. Além disso, a injeção de saporina promoveu uma redução significativa dos neurônios TH^+ no lado contralateral (55 ± 3, vs. controle: 88 ± 10, p = 0,01, n = 4), o que sugere a possibilidade de projeções bi-direcionais dos neurônios catecolaminérgicos do BVLr para o PVH.

Quando comparado o número de neurônios catecolaminérgicos do BVLr ativados do grupo saporina anti-DβH com o lado ipsilateral do grupo controle (figura 11B), observamos uma redução do número de neurônios TH^+/Fos^+ (9 ± 2, vs. controle: 30 ± 3, p = 0,003, n = 4), mas, não uma redução dos neurônios TH^+/Fos^+ quando analisado o lado contralateral (18 ± 2, vs. controle: 30 ± 5, p= 0,08, n = 4), o que indica que a maior parte dos neurônios catecolaminérgicos ativados pela hipóxia que se projetam para o PVH, (lesados pela injeção de saporina anti-DβH), se localizam no lado ipsilateral.

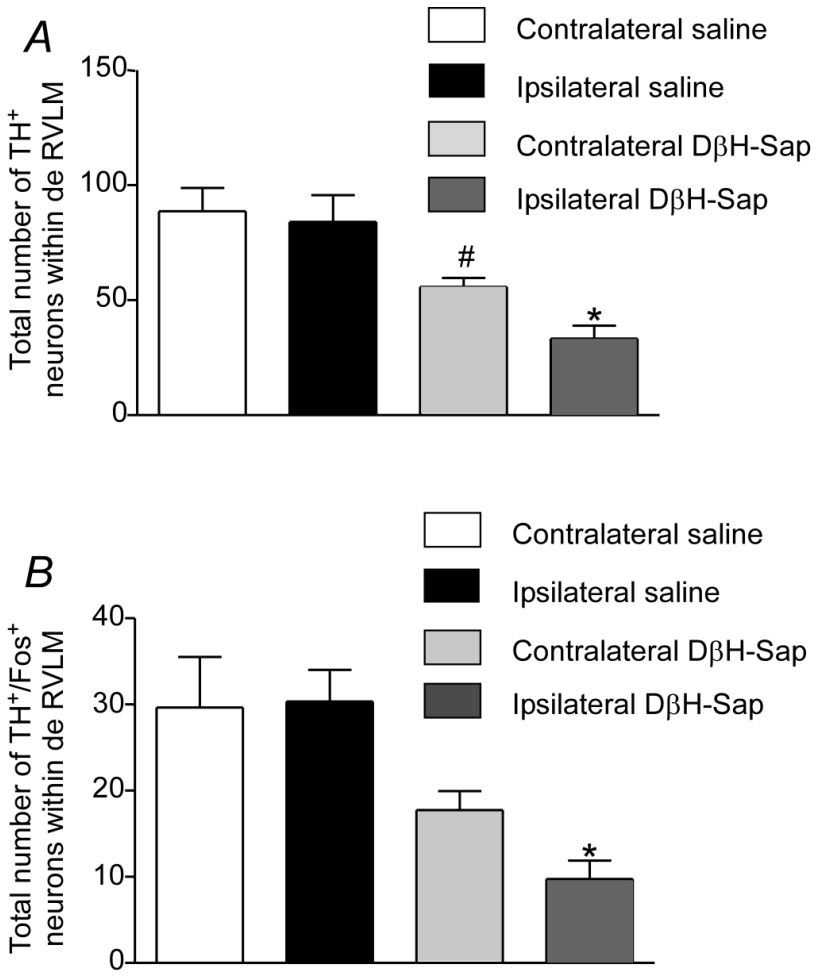

Figura 11. Neurônios catecolaminérgicos bilaterais do BVLr projetam-se para o PVH

A) A injeção unilateral da toxina saporina anti-DβH no PVH reduziu número de neurônios catecolaminérgicos ipsilaterais e contralaterais do BVLr quando comparado com animais controle. B) A injeção de saporina anti-DβH reduz o número de neurônios catecolaminérgicos ativados por hipóxia (TH^+Fos^+) ipsilaterais, mas, não altera (TH^+Fos^+) contralaterais quando comparados com um grupo controle. # Diferente do lado contralateral do grupo controle; * diferente do lado ipsilateral do grupo controle. Foram analisados 5 níveis do BVLr: -12.72 a -11.60 mm relativos ao bregma, n = 4.

5.10 A destruição seletiva dos neurônios catecolaminérgicos do BVLr altera a expressão de Fos em neurônios do PVH após estimulação dos quimiorreceptores periféricos

Para avaliar a relação entre as projeções hipotalâmicas com origem no BVLr/ grupamento C1 e os neurônios do PVH em uma situação de hipóxia, as secções coronais de PVH dos animais que receberam injeções unilaterais de saporina anti-DβH foram analisadas quanto à imunorreatividade para Fos (Figs. 12A-B).

Ao analisar a expressão de Fos, após três horas de hipóxia, pode-se observar uma redução significativa da expressão de Fos no PVH (92 ± 10, vs contralateral: 132 ± 12, $p = 0,006$, $n = 3$) (Fig. 12C).

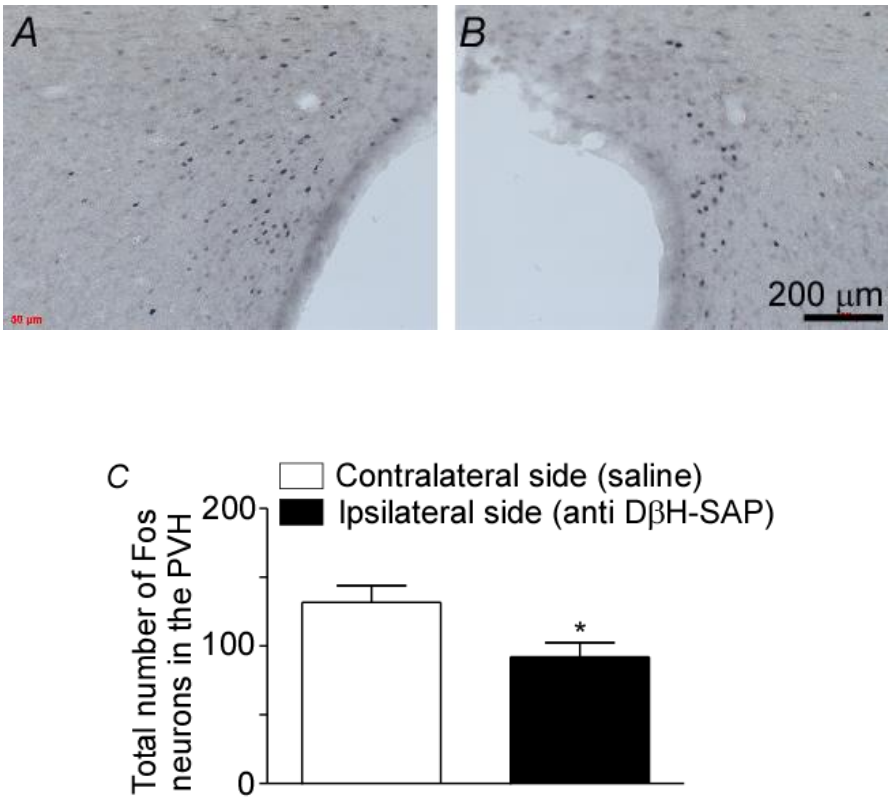

Figura 12. A destruição seletiva dos neurônios C1 altera a expressão de Fos em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo após hipóxia

A e B) Fotomicrografias mostrando o tratamento imunoistoquímico para Fos de uma secção coronal do PVH de um animal que recebeu injeção unilateral de saporina anti-DβH e posteriormente foi submetido a três horas de hipóxia. A) Expressão de Fos após hipóxia no lado contralateral a injeção (controle). B) Expressão de Fos após hipóxia lado lesado. B) Número total de neurônios imunorreativos para Fos no PVH em resposta a hipóxia. As células ativadas foram contadas em 6 níveis do hipotálamo: -1,0 a -2,30 mm relativos ao bregma. * Diferente do lado contralateral (p= 0,006) n = 3. Abreviações: 3V: terceiro ventrículo. Escalas em A-B = 200µm.

5.11 Efeitos cardiovasculares da hipóxia

O efeito da hipóxia na PAM e FC em ratos acordados foi avaliado devido à possibilidade da hipotensão causada pela hipóxia poder desencadear a expressão de Fos na região do BVLr. Os parâmetros cardiovasculares obtidos durante a exposição à hipóxia foram comparados com os valores em relação à condição de normóxia (basal), quando as variáveis cardiovasculares eram estáveis.

Os valores de PAM durante a hipóxia não foram diferentes em relação à normóxia em todos os períodos de exposição à hipóxia analisados (5, 30, 60, 120, 180 min), no entanto, os valores de FC apresentaram alterações significativas durante a exposição à hipóxia (basal: PAM: 96 ± 2,4 mmHg, FC: 372 ± 5,7 bpm; 5 min após hipóxia: PAM: 106 ± 3,1 mmHg, FC: 455 ± 13,7 bpm; 30 min após hipóxia: PAM: 102 ± 5,3 mmHg, FC: 469 ± 29 bpm; 60 min após hipóxia: PAM: 92 ± 0,9 mmHg, FC: 449 ± 37 bpm); 120 min após a hipóxia: PAM: 94 ± 4,0 mmHg, FC: 456 ± 32 bpm); 180 min após hipóxia: PAM: 95 ± 4 mmHg, FC: 440 ± 26 bpm) (Figs. 13A-B).

A PAM dos animais submetidos à hipóxia aumentou em aproximadamente 10 mmHg após 5 minutos de exposição, sendo este o aumento máximo da pressão arterial durante o período do estímulo. Até 30 minutos de hipóxia, a PAM permaneceu neste nível e, em seguida, gradualmente retornou para o nível basal até o final da exposição á hipóxia (Fig. 13A). A frequência cardíaca aumentou gradualmente durante a hipóxia, a taquicardia persistiu durante todo o período analisado, atingindo um nível de cerca de 97 bpm acima do nível basal após 30 min do início da exposição (Fig. 13B).

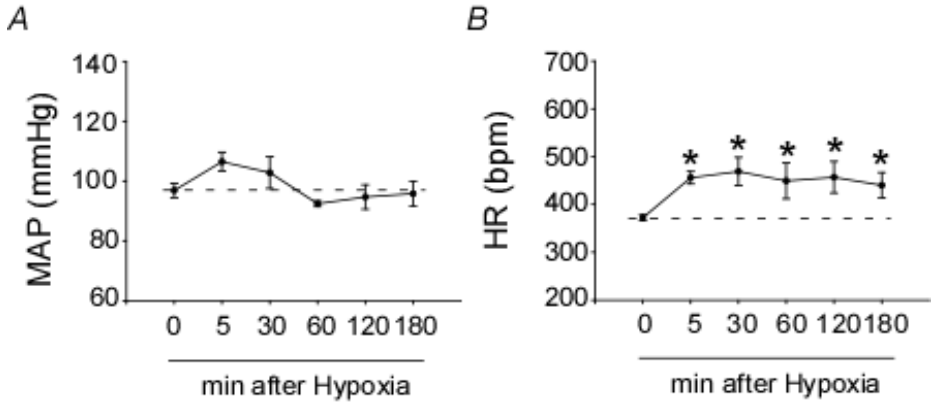

Figura 13. **Hipóxia aguda não promove alterações significativas na PAM de ratos acordados**

A) Alterações na pressão arterial média (PAM) e B) frequência cardíaca (FC) de ratos expostos a hipóxia (8% O_2 balanceado com 92% N_2) por um período de 3 horas. * Diferente de normóxia (basal), $p < 0,05$, Newman-Keuls multiple comparison test; n=4.

5.12 Minociclina altera a expressão de RNAm de mediadores do processo inflamatório no BVLr e PVH desencadeada pela hipóxia

Diante de evidências prévias da literatura a respeito do envolvimento do BVL/grupamento C1 e do PVH em resposta a situações emergenciais, que promovem um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e também, a participação deste grupamento em resposta a ativação do quimiorreflexo periférico, a próxima série de experimentos teve como objetivo avaliar se a hipóxia seria capaz de alterar a expressão de citocinas e fatores inflamatórios especificamente nesses núcleos, para entendermos se essas duas importantes regiões encefálicas podem ser alvos desses mediadores ou integrar respostas relacionadas a esses mediadores.

A expressão de RNAm para mediadores inflamatórios também foi avaliada em um grupo de animais tratados com minociclina, afim de avaliarmos se a inibição da atividade da microglia poderia alterar os níveis de RNAm expressos nestes núcleos durante a hipóxia.

Na figura 14 A-C podemos observar que a exposição dos animais por 3 horas à hipóxia levou a um aumento no RNAm para IL-6 no BVLr (2,3 ± 0,2 vs. normóxia: 1,0 ± 0,09, $p = 0,002$; $n = 12$) e PVH (1,8 ± 0,2 vs. normóxia: 0,8 ± 0,1, $p = 0,02$; $n = 7$), IL-1β no BVLr (2,2 ± 0,7 vs. normóxia: 0,8 ± 0,07, $p = 0,01$; $n = 8$) e PVH (1,7 ± 0,3 vs. normóxia: 0,9 ± 0,1, $p = 0,03$; $n = 7$) e para TNFα no BVLr (2,2 ± 0,7 vs. normóxia: 0,7 ± 0,04, $p = 0,02$; $n = 7$). Não observamos alterações nos níveis de IL-6, IL-1β ou TNFα no córtex (Figs 14A-C).

O tratamento prévio com minociclina (30 mg/kg/dia - durante 5 dias) promoveu um aumento ainda maior nos níveis de IL-6 no BVLr (5,1 ± 1,3 vs. salina: 2,3 ± 0,2, $p < 0,0001$; $n = 11$) e PVH (4,8 ± 0,3 vs. salina: 1,8 ± 0,2, $p < 0,0001$; $n = 7$) após a hipóxia (Figs 14A-C). Minociclina também foi capaz de promover um aumento da expressão de IL-6 no córtex (4,8 ± 0,8 vs. salina: 1,5 ± 0,19, $p < 0,001$; $n = 11$), após hipóxia. Por outro lado, o tratamento prévio com minociclina atenuou a expressão de RNAm especificamente para IL-1β (0,94 ± 0,1 vs. salina: 2,2 ± 0,7 $p = 0,01$; $n = 8$) e para TNFα (0,7±0,1 vs. hipóxia: 2,2±0,6, $p < 0,007$; $n = 7$) no BVLr (Figs. 14B-C).

A hipóxia foi efetiva em promover um aumento da expressão de RNAm para a molécula co-estimulatória CD-86 no PVH (1,4 ± 0,1 vs. normóxia: 0,9 ± 0,08, $p = 0,01$; n

= 11; Fig. 14D). Essa molécula é expressa na superfície das células apresentadoras de antígeno incluindo macrófagos/microglia inflamatória M1 e sua expressão não foi alterada pelo tratamento com minociclina (1,3 ± 0,2 vs. salina: 1,4± 0,1, $p > 0,05$; n = 10), (Fig 14D).

A manutenção da homeostase no SNC é realizada por diversas células e mecanismos. As células que compõem a barreira hematoencefálica (BHE) atuam em consonância a fim de manter a impermeabilidade e baixo fluxo paracelular no ambiente neuronal, sendo que, alterações na integridade da BHE podem ocasionar eventos que levam a danos e disfunções que podem evoluir para doenças neurológicas (ENGELHARDT et al., 2014).

Estudos *in vivo* mostram que a hipóxia pode ser um dos principais fatores estressores que induziriam danos na BHE (BAUER et al., 2010) e diante dessas evidências, decidimos avaliar a expressão de MMP9 e MMP2 no BVLr e PVH de animais submetidos a 3 horas de hipóxia. As MMPs estão envolvidas com mecanismos que levam a um aumento na permeabilidade da BHE como parte de uma resposta neuroinflamatória à isquemia, esclerose múltipla e processos infecciosos (CUNNINGHAM et al., 2005).

Nossos resultados mostram que 3 horas de hipóxia foi capaz de promover um aumento na expressão de RNAm para MMP9 no BVLr (2,6 ± 0,4 vs. normóxia: 0,80 ± 0,07, $p = 0,002$; n = 9) e PVH (1,2 ± 0,2 vs. normóxia: 0,6 ± 0,06, $p = 0,01$; n = 9; Fig. 14E), sem alterar a expressão de MMP2 (Fig. 14F). O tratamento com minociclina bloqueou a expressão de MMP9 desencadeado pela hipóxia no BVLr (1,0 ± 0,1 vs. salina: 2,6 ± 0,4, $p < 0,001$; n = 9) (Fig 14E).

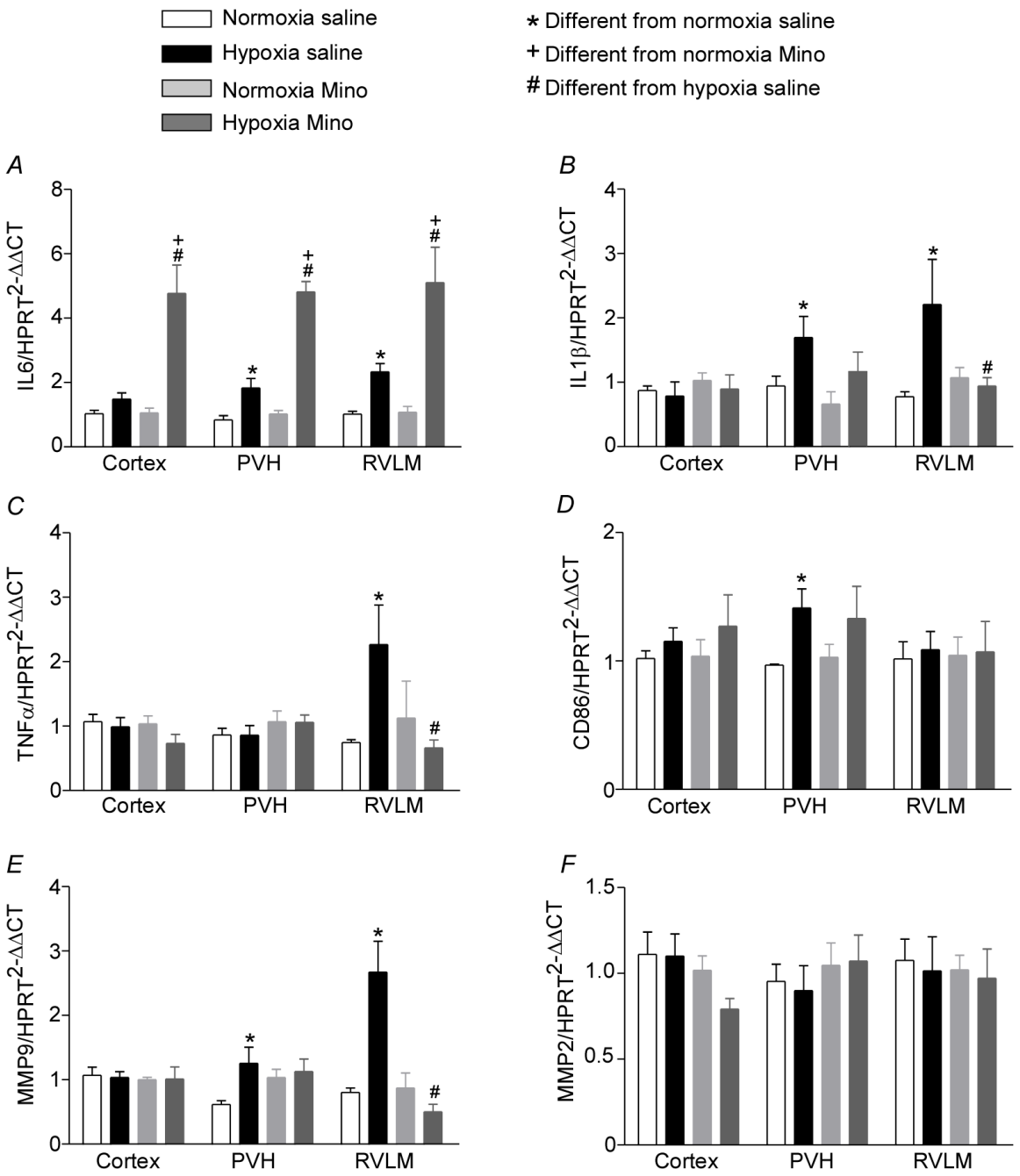

Figura 14. Valores do qPCR de citocinas e fatores relacionados à inflamação no PVH e BVLr de ratos tratados com salina ou minociclina e submetidos a hipóxia por 3 horas

Expressão de A) interleucina-6 (IL-6) no córtex, PVH e BVLr; B) interleucina-1β (IL-1β) no córtex, PVH e BVLr; C) fator de necrose tumoral (TNF) no córtex, PVH e BVLr; D) molécula co-estimulatória 86 (CD-86) no córtex, PVH e BVLr; E) MMP9 no córtex, PVH e BVLr e F) MMP2 no córtex, PVH e BVLr. *Diferente do grupo normóxia salina; + Diferente do grupo normóxia salina; # diferente do grupo hipóxia mino.

5.13 Hipóxia aguda é capaz de modificar a expressão RNAm para citocinas pró-inflamatórias em órgãos periféricos

Além de promover alterações na expressão de RNAm para diferentes mediadores inflamatórios no SNC, a hipóxia também foi capaz de modificar a expressão de citocinas em órgãos periféricos.

O propósito desse experimento foi avaliar se a hipóxia seria capaz de modular uma resposta sistêmica, provavelmente por estimular um recrutamento de diferentes células do sistema imune (SI) aos órgãos alvos ou até mesmo por promover diferentes respostas das próprias células, capazes de reagir à diminuição da demanda de O_2.

Nas figuras 15A-B podemos observar que a exposição dos animais por 3 horas à hipóxia promoveu aumento significativo na expressão de RNAm para IL-6 no coração (90,83 ± 20,92 vs. normóxia: 1,84 ± 0,73, $p = 0,002$), pulmão (15,98 ± 3,13 vs. normóxia: 3,34 ± 1,4, $p = 0,02$), fígado (2,95 ± 0,5 vs. normóxia: 1,0 ± 0,06, $p = 0,02$) e rim (12,19 ± 3,27 vs. normóxia: 1,22 ± 0,28, $p = 0,006$). Hipóxia aumentou IL-1β no coração (3,0 ± 0,29 vs. normóxia: 1,1 ± 0,17, $p = 0,01$). Hipóxia aguda não foi capaz de promover alteração na expressão de RNAm para TNFα em nenhum dos órgãos avaliados (Fig. 15C).

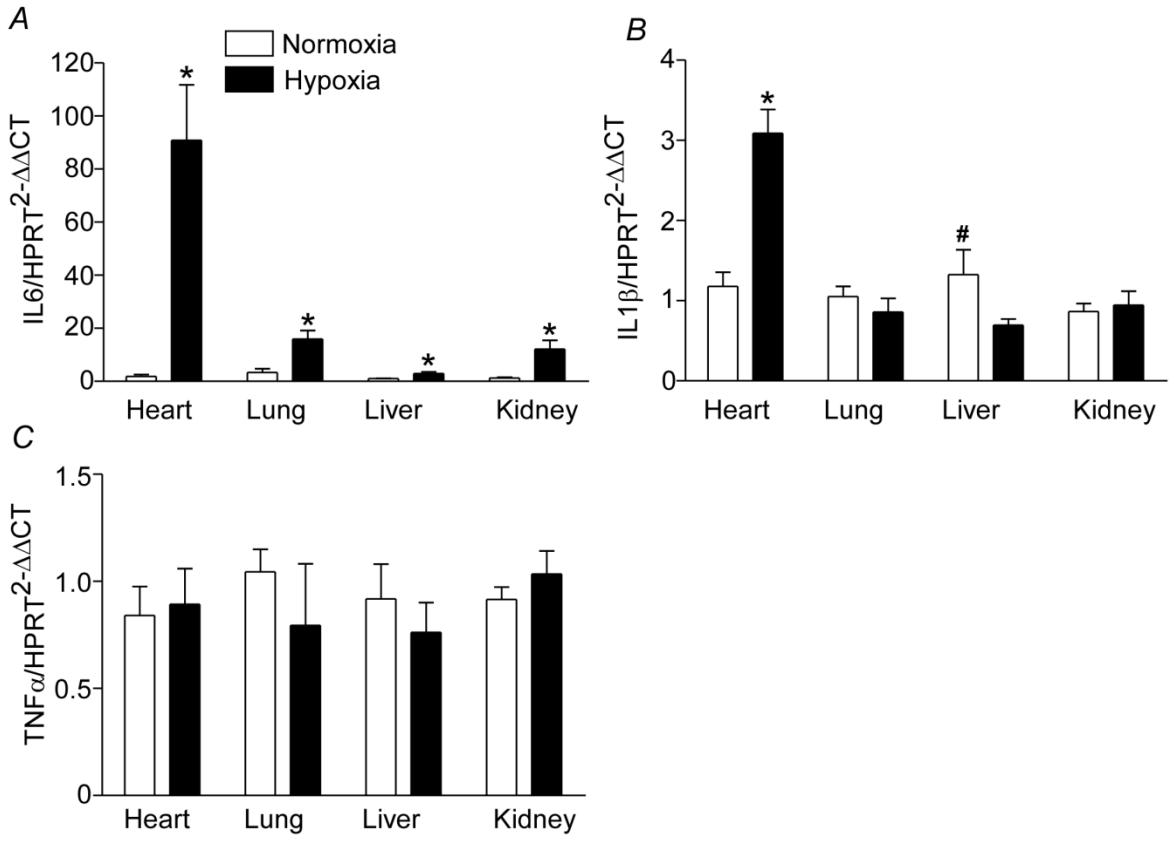

Figura 15. Valores do qPCR para citocinas pró-inflamatórias em órgãos periféricos de ratos submetidos a hipóxia por 3 horas

A) interleucina-6 (IL-6) no coração, pulmão, fígado e rim; B) interleucina-1β (IL-1β) no coração, pulmão, fígado e rim; C) fator de necrose tumoral (TNF) no coração, pulmão, fígado e rim. *Diferente do grupo controle; # Diferente do grupo hipóxia, n = 4.

5.14 Minociclina reduz a expressão de Fos em neurônios do BVLr e PVH em resposta a uma situação de hipóxia

A partir dos resultados apresentados mostrando que uma situação de hipóxia é capaz de promover um aumento significativo na expressão de Fos em neurônios catecolaminérgicos do BVLr e também em neurônios do PVH, esse experimento foi realizado para avaliar se a inibição da atividade da microglia por meio do tratamento com minociclina seria capaz de modificar essa resposta.

As figuras 16A-D representam cortes coronais do BVLr e PVH de um caso controle, tratado com salina e um caso tratado com minociclina que foram submetidos a hipóxia e posteriormente a imunoistoquímica para marcar TH e Fos.

Após 3 horas de hipóxia podemos observar que o tratamento com minociclina promoveu uma diminuição significativa no número de neurônios catecolaminérgicos que expressam Fos no BVLr (28,6 ± 2,9 vs. salina: 60 ± 9,5, $p = 0,03$; $n = 4$) e PVH (838 ± 27 vs. salina: 1449 ± 139, $p = 0,04$; $n = 4$) (Fig. 16 E-F).

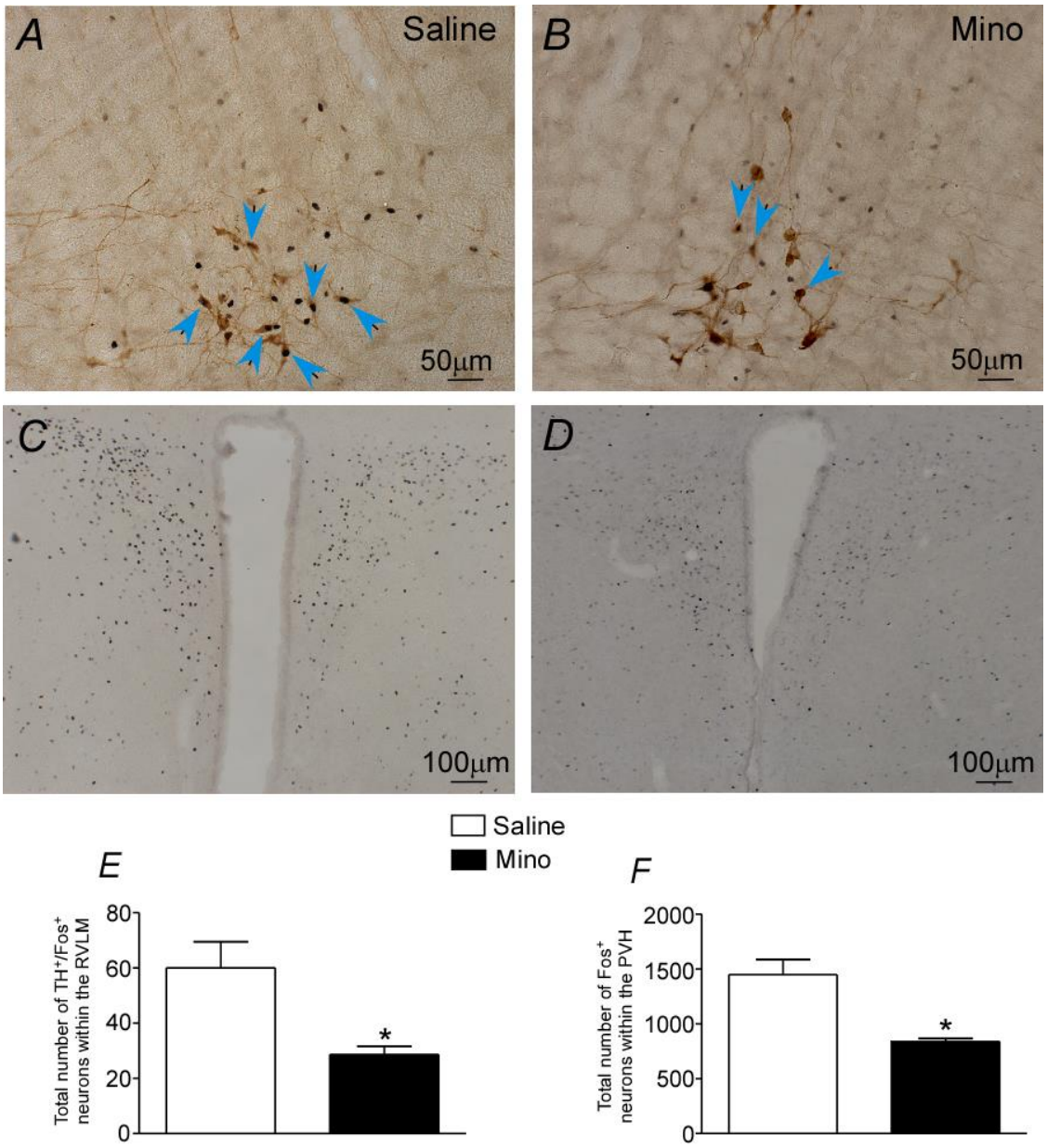

Figura 16. Minociclina reduz a expressão de Fos no BVLr e PVH após hipóxia

As fotomicrografias ilustram secções coronais do BVLr que receberam tratamento imunoistoquímico para TH e Fos e também de secções coronais do PVH que receberam tratamento para Fos. A) Expressão de TH /Fos no BVLr em animais tratados com salina após hipóxia; B) Expressão de TH /Fos no BVLr em animais tratados com Minociclina após hipóxia. C) Expressão de Fos no PVH em animais tratados com salina após hipóxia; D) Expressão de Fos no PVH em animais tratados com Minociclina após hipóxia. E) Número de neurônios catecolaminérgicos ativados por hipóxia (Fos^+/TH^+) bilaterais no BVLr. F) Número de neurônios ativados por hipóxia (Fos^+) no PVH. As células marcadas foram avaliadas em 5 níveis do BVLr: -12.72 a -11.30 mm relativos ao bregma para o BVLr e em 6 níveis do hipotálamo: -1.00 a -2.30 mm relativos ao bregma, n = 4. Escalas em A-B = 50 µm; em C-D= 100 µm.

5.15 Minociclina atenua o aumento respiratório promovido pela hipóxia

O tratamento com minociclina por 5 dias atenuou o aumento na resposta respiratória induzida pela a exposição à hipóxia (8% O_2, balanceado com N_2 por 10 minutos) quando comparado com o grupo controle, onde os parâmetros respiratórios foram avaliados previamente ao início do tratamento com minociclina. As alterações foram observadas no V_T (7,6 ±0,3 vs. mino: 6,4 ± 0,3 ml/kg, $p<0,05$; n=7) e no V_E (1302 ± 71 vs. mino: 969 ± 48 ml/kg/min, $p<0,001$; n=7) (Figs. 17A e C). Não foram observadas alterações no aumento da f_R (170,6 ± 3,7 vs. mino: 153,1 ± 8,7 resp/min, $p>0,05$; n=7) produzida pela hipóxia em animais quando tratados com salina ou minociclina (Fig. 17B)

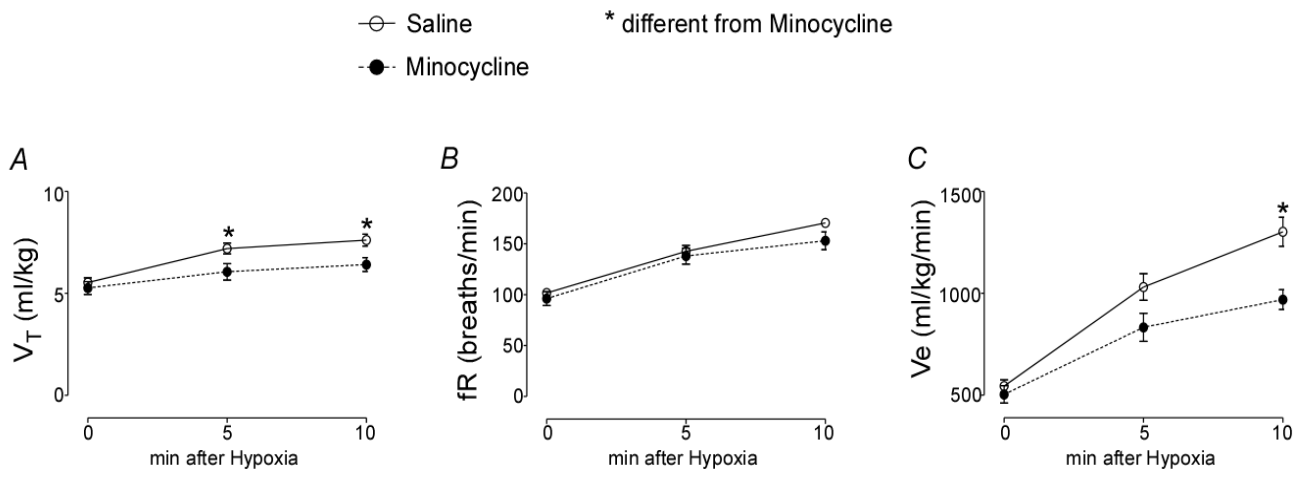

Figura 17. Minociclina atenua o aumento respiratório promovido pela hipóxia

A-C) Alterações no A) volume corrente (V_T, ml/kg), B) frequência respiratória (f_R, respirações/min), C) volume minuto (V_E, ml/kg/min) promovidas pela exposição á hipóxia (8% O_2) em animais tratados com salina e após o tratamento com minociclina. *Diferente do tratamento com minociclina; n = 7.

5.16 Minociclina altera respostas autônomas cardiovasculares desencadeadas pela hipóxia

A próxima série de experimentos foi elaborada para avaliar os efeitos do tratamento com minociclina no controle autônomo cardiovascular em condições basais e durante o protocolo de hipóxia. Dessa maneira, seria possível avaliar se a inibição da atividade da microglia seria capaz de alterar as respostas autônomas à hipóxia.

No quinto e último dia de tratamento com minociclina ou salina, os animais foram submetidos à canulação da artéria femoral e após um dia de recuperação, os parâmetros cardiovasculares foram registrados durante 3 horas de hipóxia, e posteriormente foi realizado a análise espectral da variabilidade da pressão arterial e intervalo de pulso. Evidenciamos que o protocolo de hipóxia não promoveu diferença na pressão arterial média entre os animais que receberam injeções intraperitoneais de salina ou minociclina em nenhum dos tempos analisados (basal: 101,1 ± 2,4 vs. mino: 105,3 ± 2,9 mmHg; 5 min após hipóxia: 110,6 ± 3 vs. mino: 110,5 ± 2,4 mmHg; 30 min após hipóxia: 104 ± 3,8 vs. mino: 105 ± 2,9 mmHg; 60 min após hipóxia: 95 ± 3,2 vs. mino: 102 ± 3,2 mmHg; 120 min após a hipóxia: 95,3 ± 2,7 vs. mino 94 ± 3,6 mmHg; 180 min após hipóxia: 97,2 ± 3,5 mmHg vs. mino: 92,7 ± 3,5 mmHg), (Fig. 18A), o que provavelmente se deve a manutenção do padrão de variabilidade da pressão arterial sistólica (SAP) (Fig. 18C) e do componente de baixa frequência (LF), (Fig. 18D) durante a hipóxia ao longo do tempo. Os trechos utilizados para análise dos registros de pressão arterial e frequência cardíaca foram os mesmos utilizados para análise espectral na pressão arterial sistólica e também do intervalo de pulso (PI). O tratamento com minociclina também não modificou o componente de alta frequência (HF) da SAP, que representa a modulação respiratória da pressão arterial (Fig. 18E).

No período inicial da hipóxia também representado no tempo de 5 minutos após o início do estímulo, no grupo controle foi observado um aumento na variabilidade do intervalo de pulso (PI) (5 min após hipóxia: 45,2 ± 6 vs. mino: 19,4 ± 2,9 ms^2, $p < 0,05$), (Fig. 18F) e seus respectivos componentes LF (5 min após hipóxia: 3,7 ± 0,5 vs. mino: 1,3 ± 0,2 ms^2; $p < 0,001$), (Fig. 18G) e HF (5 min após hipóxia: 9,6 ± 1 vs. mino: 4,0 ± 0,7 ms^2; $p < 0,001$), (Fig. 18H). O tratamento prévio com minociclina não alterou a

variabilidade da PI e os componentes LF e HF desencadeado pela hipóxia (Figs. 18F-H). O aumento simultâneo em LF e HF resulta uma ausência de alteração na razão entre os componentes de baixa e alta frequência (LF/HF) (5 min após hipóxia: 0,37 ± 0,03 vs. mino: 0,33 ± 0,05), (Fig. 18I). O tratamento com minociclina não foi eficaz em alterar o aumento da FC (435,1 ± 16,1 vs. mino: 375,9 ± 9,3 bpm) produzido pela hipóxia (Fig. 18B).

Os animais tratados com minociclina responderam com um aumento ainda maior da frequência cardíaca 60 minutos após o início da hipóxia (60 min após hipóxia: 407,6 ± 14,3 vs. mino: 475 ± 18 bpm mino, $p < 0,05$), (Fig. 18 B), também demonstrada por um aumento na variabilidade do intervalo de pulso PI (60 min após hipóxia: 6,3± 1,7 vs. mino: 25,8 ± 6,0 ms^2; $p < 0,05$), (Fig. 18F), LF (60 min após hipóxia: 0.41 ± 0,18 vs. mino: 2 ± 0,4 ms^2; $p <0,01$), (Fig. 18G) e razão (LF/HF) (60 min após hipóxia: 0,18 ± 0,02 vs. mino: 0,4 ± 0,08; $p < 0,001$), (Fig. 18I).

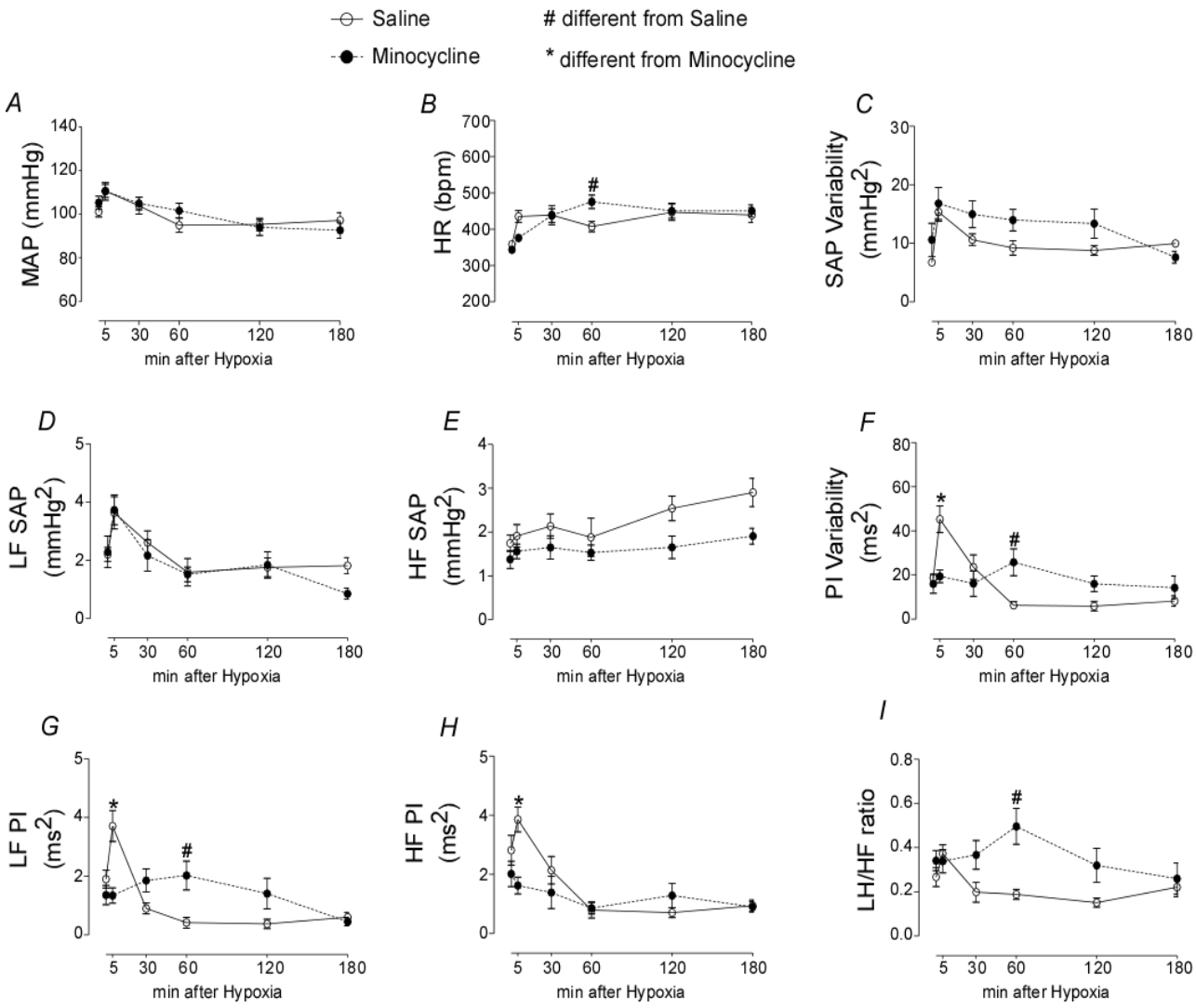

Figura 18. Pressão arterial, frequência cardíaca e análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca

Análise espectral da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de ratos tratados com salina ou minociclina submetidos à hipóxia. A) pressão arterial média, B) frequência cardíaca, C) Variância, D) LF absoluto e E) HF absoluto da pressão arterial sistólica. F) Variância, G) LF absoluto e H) HF absoluto referentes ao intervalo de pulso. I) razão LF/HF do intervalo de pulso. *Diferente em comparação ao grupo tratado com minociclina; #diferente do grupo tratado com salina (controle); n = 7.

6 DISCUSSÃO

Diante dos resultados apresentados buscamos demonstrar a possível participação dos neurônios catecolaminérgicos do BVLr (região C1) que projetam-se para o PVH e são ativados em uma situação de hipóxia aguda. A ativação dos quimiorreceptores periféricos mediante um protocolo de redução dos níveis de O_2 de 21% para 8% O_2 por um período de três horas foi capaz de ativar significativamente os neurônios do BVLr, porém, nesta condição somente uma parcela de neurônios catecolaminérgicos ativados se projetam para o PVH. Adicionalmente mostramos que o nosso protocolo experimental de 3 horas de hipóxia foi eficaz em promover a ativação de mediadores inflamatórios em regiões encefálicas cruciais para a manutenção da homeostase como o BVLr e o PVH. A hipóxia também promoveu um aumento dos níveis de citocinas inflamatórias em tecidos periféricos como coração, pulmão e rim. O tratamento com minociclina foi capaz de modificar as respostas de expressão gênica, respostas respiratórias e autônomas desencadeadas pela hipóxia.

6.1 Caracterização neuroanatômica da via C1-PVH durante hipóxia aguda

Estudos neuroanatômicos que combinam técnicas de transporte anterógrado, retrógrado e de imunoistoquímica mostram que o PVH possui grande quantidade de terminais axonais catecolaminérgicos e que núcleos do tronco encefálico contribuem com essas projeções (SAWCHENKO; SWANSON, 1983b; SWANSON; SAWCHENKO, 1983). Dentre os núcleos do tronco encefálico que enviam projeções catecolaminérgicas para o PVH há os grupamentos adrenérgicos C1, C2, C3, com terminais que se distribuem preferencialmente para divisão parvocelular do PVH (CUNNINGHAM et al., 1990). De acordo com as respectivas topografias, os grupamentos C1, localizado no BVLr, C2 na região rostro medial do núcleo do trato solitário e C3 disperso pelo fascículo longitudinal medial e núcleo do hipoglosso, recebem fundamentalmente aferências distintas e transmitem informações sensoriais para neurônios efetores viscerais no hipotálamo (CUNNINGHAM et al., 1990; SAWCHENKO et al., 1985).

Nossos resultados de injeções do traçador anterógrado PHA-L no BVLr estão de acordo com essas informações e mostram a distribuição das fibras dos neurônios do BVLr no PVH. Pode-se observar uma quantidade moderada de varicosidades positivas para o PHA-L principalmente na divisão parvocelular do PVH, mais especificamente nas regiões medial e dorsal dessa divisão. Algumas fibras foram visualizadas na região magnocelular, porém, nos casos escolhidos, representando a injeção de PHA-L no BVLr, observamos que a divisão parvocelular recebeu maior inervação do que a divisão magnocelular.

De acordo com a distribuição das varicosidades PHA-L positivas mostradas nesse estudo, podemos sugerir que essas projeções ascendentes com origem na região do BVLr podem estar envolvidas com a modulação da atividade autônoma, assim como influenciar mecanismos neuroendócrinos exercidos pelo PVH. Estudos neuroanatômicos mostram que são principalmente os neurônios da divisão parvocelular que se projetam para a coluna intermédio lateral (SWANSON; KUYPERS, 1980; SWANSON et al., 1980), assim como já está descrito que é nesta divisão que se localizam neurônios hipofisários que se projetam para eminência mediana (WIEGAND; PRICE, 1980).

Embora os neurônios C1 possuam todas as enzimas necessárias para sintetizar catecolaminas, não há evidências diretas que mostram que esses neurônios liberam essas substâncias (GUYENET et al., 2013). Experimentos com camundongos que expressam a proteína Cre sob o controle de um promotor específico para dopamina-β hidroxilase (DβH), que receberam injeções no BVLr de um adenovírus Cre dependente conjugado com mCherry, uma proteína fluorescente vermelha, tiveram o PVH avaliado quanto a expressão do transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2). Os resultados mostraram uma densa quantidade de varicosidades no PVH marcadas com mCherry que se sobrepõem ao VGLUT2 (ABBOTT et al., 2013).

Em nossos experimentos decidimos confirmar se as varicosidades PHA-L positivas encontradas no PVH com origem no BVLr são VGLUT2 positivas ou expressam a enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD 65/67), indicando neurotransmissão glutamatérgica ou gabaérgica, respectivamente. Como apresentado em nossos resultados, a maior parte das varicosidades PHA-L se colocalizam com

VGLUT2, apesar de também haver em menor proporção a expressão de GAD65/67. Esses resultados sugerem que essas projeções originadas do BVLr podem contribuir com a sinalização glutamatérgica no PVH.

A região do BVLr possui neurônios que têm papel essencial na geração das atividades simpáticas e respiratórias (ALHEID et al., 2011). Sabe-se que os neurônios do grupamento C1 estão envolvidos na modulação da resposta cardiorrespiratória e o presente estudo em conjunto com dados da literatura, reforça a evidência de que em animais não anestesiados há uma grande proporção de neurônios C1 que expressam Fos após uma situação de hipóxia (ERICKSON; MILLHORN, 1994; HIROOKA et al., 1997), condição diretamente relacionada com projeções oriundas da região do núcleo do trato solitário caudal, o qual recebe aferências diretas dos quimiorreceptores periféricos (CHITRAVANSHI; SAPRU, 1995).

As vias neurais pelas quais os neurônios C1 ativam a respiração ainda não estão totalmente esclarecidas. Presume-se a existência de uma conexão direta entre neurônios C1 e os neurônios geradores da atividade respiratória, pois, os axônios desses neurônios arborizam ao longo da extensão rostro-caudal da coluna respiratória, formando uma circuitaria sináptica local (AGASSANDIAN et al., 2012). Além do mais, neurônios geradores de ritmo respiratório, localizados no complexo pre-Bötzinger, também podem ter contato direto com células C1 por meio de dendritos distais (SPYER; GOURINE, 2009).

Outra evidência em relação à modulação da respiração pelos neurônios catecolaminérgicos do BVLr, são suas conexões indiretas com centros respiratórios via projeções para núcleo retrotrapezóide (RTN), núcleo parabraquial lateral, substância cinzenta periaquedutal e núcleos hipotalâmicos como região perifornicial/hipotálamo lateral (ABBOTT et al., 2009; CARD et al., 2006; GUYENET et al., 2013). Abbott e colaboradores (2013) mostraram que a estimulação seletiva dos neurônios C1, por meio da técnica de optogenética, promove aumento na frequência e amplitude respiratória em animais não anestesiados, sugerindo que esses neurônios podem ser uma peça importante nas respostas respiratórias produzidas pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos (ABBOTT et al., 2013). Resultados do nosso laboratório mostram que a inibição seletiva dos neurônios catecolaminérgicos do BVLr reduz o

aumento da atividade respiratória produzida pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos (Malheiros-Lima et al., dados não publicados).

Os resultados do presente estudo, mostrando que a via de comunicação C1 e PVH esta ativada numa situação de hipóxia, podem certamente ser mais uma peça no complexo sistema neural de regulação da respiração ou do sistema cardiovascular durante a ativação dos quimiorreceptores periféricos. Durante uma situação de hipóxia, os quimiorreceptores periféricos são capazes de detectar as alterações dos níveis de O_2 no sangue e enviar informações para o SNC, mais precisamente no núcleo do trato solitário (NTS). A partir do NTS, uma série de comunicações neurais são desencadeadas com o objetivo de regular a homeostase cardiovascular, endócrina, comportamental e respiratória. No presente estudo, estamos sugerindo que a via C1-PVH possa contribuir nas respostas cardiorrespiratória e endócrina. Mais estudos serão necessários para responder essas questões e serão objetivos de estudos futuros do nosso laboratório.

Os nossos resultados também mostraram que a injeção unilateral da toxina saporina conjugada com anti-DβH no PVH promoveu uma destruição parcial dos neurônios catecolaminérgicos ativados por hipóxia (Fos^+/TH^+). Curiosamente, a injeção da toxina no PVH não foi capaz de promover a redução dos neurônios não catecolaminérgicos do BVLr (Fos^+/TH^-), o que nos permite afirmar que os neurônios não C1 ativados pela hipóxia não estão comprometidos e poderiam contribuir para a compensação das respostas fisiológicas frente a uma possível perda dos neurônios do grupamento C1.

A análise dos resultados referentes à saporina conjugada com anti-DβH no PVH foi inicialmente realizada utilizando o lado contralateral a injeção como controle. Ao contabilizarmos o número de neurônios marcados para TH e Fos no BVLr e compararmos as marcações do lado contralateral em relação ao lado ipsilateral, identificamos a necessidade de termos um grupo controle, no qual fosse injetado salina, devido a possibilidade de projeções bilaterais dos neurônios do grupamento C1 projetando-se para o PVH. De acordo com nossa análise, em comparação com o grupo controle, a injeção de saporina no PVH promoveu uma diminuição do número de neurônios TH^+ no BVLr também no lado contralateral a injeção, o que sugere a

possibilidade de parte dos neurônios catecolaminérgicos bilaterais do BVLr, enviarem projeções para o PVH. Ao avaliarmos o número de neurônios TH^+/Fos^+ do BVLr, verificamos que não houve diferença significativa, o que indica que a maior parte dos neurônios catecolaminérgicos ativados pela hipóxia que se projetam para o PVH, (lesados pela injeção de saporina anti-DβH), se localizam no lado ipsilateral.

Como já descrito anteriormente, temos várias evidências sobre as possíveis funções dos neurônios C1 que se projetam para o PVH. Simultaneamente ao controle respiratório, os neurônios C1 estão envolvidos na manutenção da homeostase do organismo sob condições emergenciais, modulando respostas autônomas, metabólicas e neuroendócrinas (GUYENET et al., 2013). Dentre as respostas neuroendócrinas, resultados da literatura demonstram que células adrenérgicas C1 poderiam ativar neurônios neurossecretórios no PVH, que expressam o fator liberador da corticotrofina (CRF), para iniciar as respostas relacionadas à ativação do eixo hipotálamo hipófise adrenal (HPA) (ROSS et al., 1984; SAWCHENKO; BOHN, 1989).

Outro fator observado em nossos resultados é que a maioria dos neurônios catecolaminérgicos que se projetam para o PVH (TH^+/CTB^+) estavam localizados na região mais caudal do BVLr, resultado que corrobora dados da literatura que mostram que os neurônios catecolaminérgicos do BVL são organizados topograficamente em relação as projeções eferentes (GUYENET et al., 2013).

A região caudal do BVL possui projeções já descritas para o hipotálamo, enquanto que regiões mais rostrais do grupamento C1 possui uma maior população de neurônios que se projetam preferencialmente para medula espinhal (bulbo espinhais) (AGASSANDIAN et al., 2012; GUYENET et al., 2013). Um recente trabalho da literatura mostrou que os neurônios catecolaminérgicos do BVLc (possivelmente neurônios do grupamento A1) também projetam-se para o PVH e estão envolvidos nas respostas de ativação do quimiorreflexo (KING et al., 2013).

Estudos neuroanatômicos evidenciaram que o grupamento noradrenérgico A1 constitui a principal fonte de projeções catecolaminérgicas do tronco encefálico para o PVH (SAWCHENKO; SWANSON, 1982b). Esses neurônios são conhecidos por se projetarem tanto para divisão parvocelular, quanto para divisão magnocelular do PVH (CUNNINGHAM; SAWCHENKO, 1988), o que favorece dentre outras características a

atribuição desta projeção com funções relacionadas ao controle de respostas neuroendócrinas e respostas autônomas de controle da atividade simpática (KING et al., 2013; SAWCHENKO; SWANSON, 1982a; SMITH et al., 1995).

De acordo com King e colaboradores (2013), a hipóxia promove a ativação de uma grande proporção dos neurônios catecolaminérgicos do bulbo ventrolateral caudal (BVLc) que projetam-se para o hipotálamo, sugerindo que o BVLc exerce um papel importante no fornecimento de informações aferentes do quimiorreflexo periférico para o PVH. No presente estudo, estamos propondo que os neurônios catecolaminérgicos do BVLr/grupamento C1 também poderiam representar uma importante fonte de excitação para o PVH assim como os neurônios do grupamento A1.

A integridade dos neurônios C1, que se projetam para o PVH, pode contribuir para que os neurônios do PVH sejam ativados pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos, pois, após a lesão seletiva dos neurônios C1, que projetam-se para o PVH, observamos que o número de neurônios imunorreativos para Fos, após uma hipóxia, foi significativamente reduzido no PVH. Essa fração de neurônios C1 que compõem aferências fundamentais para os neurônios do PVH sob condições de hipóxia, poderia, dentre outras funções, estar envolvida com respostas neuroendócrinas e/ou cardiorrespiratórias a hipóxia. Estudos mostram que uma situação de hipóxia pode promover aumento da expressão de Fos em células vasopressinérgicas e ocitocinérgicas do PVH, mais especificamente em neurônios parvocelulares localizados na região medial do PVH, região que contém grande parte dos neurônios que expressam CRF (SMITH et al., 1995).

Dados da literatura mostraram que em uma situação de hipóxia além do aumento da expressão de Fos em neurônios vasopressinérgicos, este estímulo é capaz de desencadear aumento significativo dos níveis plasmáticos de vasopressina e que vias neurais catecolaminérgicas originárias da região ventral do bulbo podem desempenhar um papel na manutenção dessas concentrações (FORSLING; AZIZ, 1983; IOVINO et al., 2013; WALKER, 1986). Além da vasopressina, o CRF constitui um importante fator responsável por respostas neuroendócrinas a diferentes estímulos. Schiltz e Sawchenko (2007) mostraram que a integridade de vias catecolaminérgicas do bulbo são essenciais para promover a ativação do PVH com possível liberação de CRF em

resposta ao aumento de fatores inflamatórios periféricos (SCHILTZ; SAWCHENKO, 2007).

Assim como na inflamação, a hipóxia constitui uma situação emergencial para o organismo e nossos resultados além de corroborar com dados da literatura sobre a importância da integridade de neurônios catecolaminérgicos sobre a atividade de neurônios do PVH, reforçam evidências da participação da via C1-PVH em situações emergenciais como a hipóxia.

Dessa maneira, os resultados apresentados neste estudo constituem uma importante caracterização sobre a distribuição dos neurônios catecolaminérgicos do BVLr que estão ativados na hipóxia. O recrutamento dos neurônios C1, ativados na hipóxia e projetando-se para o PVH fariam parte do complexo sistema neural ativado pelos quimiorreceptores periféricos.

6.2 Hipóxia aguda não promove alterações significativas na PAM de ratos acordados

A fim de caracterizarmos o protocolo de hipóxia aguda, foi avaliada a gasometria do sangue arterial. De acordo com nossos resultados, hipóxia (8% O_2) durante 3 horas foi capaz de promover uma queda significativa na PaO_2 e também na sO_2. A intensa taquipnéia desencadeada pela hipóxia resultou em uma queda significativa na $PaCO_2$ e uma possível compensação renal com a diminuição dos níveis de HCO_3^-. Esse processo promoveu um ligeiro aumento no pH, caracterizando uma alcalose respiratória.

O fato que uma situação de hipóxia aguda pode produzir respostas depressoras na PAM que podem influenciar na imunorreatividade para Fos nos neurônios do BVLr já está bem estabelecido. A hipotensão pode promover a expressão de Fos em neurônios da região do BVLr/C1 (LI; DAMPNEY, 1994).

Nossos resultados não mostram nenhuma mudança significativa na pressão arterial durante 3 horas de exposição hipóxia e assim, vão de acordo com os resultados de Smith e colaboradores publicados em 1995, que mostraram que uma hipóxia sistêmica não produziu alterações significativas na pressão arterial durante os primeiros 90 min de exposição (SMITH et al., 1995).

Embora ambos, hipotensão e hipóxia possam provocar um reflexo simpato-excitatório, as vias centrais responsáveis por estes efeitos em animais acordados são fundamentalmente diferentes. A hipóxia ativa neurônios pré-simpáticos do BVLr principalmente através de projeções excitatórias direta dos neurônios do NTScom, bem como do grupamento noradrenérgico A5. Por outro lado, os neurônios do BVLr ativados por hipotensão parecem ser principalmente desinibidos por inter-neurônios inibitórios, indicando que os sinais aferentes que produzem estes efeitos são também nitidamente diferentes (HIROOKA et al, 1997; HORIUCHI et al., 1999).

Portanto, estes resultados em conjunto com a literatura sugerem que as respostas de Fos à hipóxia aguda na região do BVLr/ C1 com projeções para o PVH mostradas no presente estudo são, em grande parte devido à hipóxia e não ao efeito secundário da pressão arterial.

6.3 Hipóxia aguda não altera a expressão de Fos em neurônios do grupamento serotoninérgico na rafe pálido/região parapiramidal

A inibição da termogênese pela hipóxia é um mecanismo importante do padrão coordenado de respostas termorregulatórias para restringir o consumo de oxigênio durante a diminuição da perfusão de O_2 nas células (MADDEN; MORRISON, 2005). A região da rafe pálido (RPa) possui neurônios pré-motores simpáticos que se projetam para a medula espinhal, ativando o tecido adiposo marrom (BAT), o qual é imprescindível para controle de temperatura corporal (MORRISON et al., 2012).

Atualmente está bem descrito na literatura a participação do grupamento C1 em promover uma regulação inibitória da saída simpática para o tecido adiposo marrom, ou seja, evidências sugerem que catecolaminas liberadas pelo grupamento C1 podem promover inibição dos neurônios pré-simpáticos que regulam o BAT, via receptores α_2, nos neurônios da RPa para promover inibição da atividade simpática e termogênese (MADDEN et al., 2013).

Em 2005, Madden e Morrison mostraram que a estimulação dos quimiorreceptores periféricos pela administração sistêmica de cianeto de sódio (NaCN) ou por disponibilização de uma mistura hipóxica de 8% O_2 balanceado com N_2, inibiu completamente a atividade simpática para o BAT, além disso, essa resposta foi abolida

pela transecção bilateral dos corpúsculos carotídeos ou pela inibição com glicina ou muscimol dos neurônios do NTS, região onde chegam as aferências dos quimiorreceptores periféricos (FINLEY; KATZ, 1992; MADDEN; MORRISON, 2005). Esses resultados demonstram que uma situação de hipóxia aguda promove um efeito inibitório significativo na atividade simpática e termogênese para o tecido adiposo marrom e que esse mecanismo parece envolver a ativação do quimiorreflexo periférico.

Posteriormente, estudos do nosso laboratório (TAKAKURA; MOREIRA, 2013), determinaram as respostas eletrofisiológicas de neurônios serotonérgicos da rafe bulbar, mais especificamente da região parapiramidal (ppy) durante a ativação do quimiorreflexo periférico. Os resultados mostraram que hipóxia (8% O_2 balanceado com N_2) promoveu inibição dos neurônios serotoninérgicos da rafe. Esses neurônios também foram inibidos durante hipercapnia (9-10% CO_2), porém, essa resposta não se repetiu quando o estímulo de hipercapnia foi realizado em animais quimiodesnervados, situação em que os neurônios da rafe foram insensíveis ao estímulo por CO_2. Logo, podemos sugerir que a inibição desses neurônios é provavelmente mediada por quimiorreceptores periféricos (TAKAKURA; MOREIRA, 2013).

Nossos resultados mostram que o protocolo de 3 horas de hipóxia não promove expressão de Fos na RPa/ppy, provavelmente pelo fato da inibição dos neurônios serotoninérgicos da rafe ser originada por uma via inibitória dos neurônios C1, mediante ativação dos receptores adrenérgicos α_2 (GUYENET et al., 2013; MADDEN et al., 2013).

6.4 Hipóxia aguda aumenta a expressão RNAm de mediadores do processo inflamatório no BVLr e PVH

Importantes estudos têm sido realizados na tentativa de compreender como ocorrem interações entre o SNC e o sistema imune (STERNBERG, 2006; TRACEY, 2009), mas, ainda pouco se sabe sobre essas interações no controle cardiorrespiratório. A hipóxia é caracterizada pela diminuição da tensão de O_2, que pode ocorrer em diferentes situações fisiopatológicas, promovendo a ativação do quimiorreflexo periférico e gerando uma série de mecanismos neurais na tentativa de restabelecer a homeostase cardiorrespiratória (COSTA et al., 2014; MACHADO, 2001).

Nossos resultados mostram que a hipóxia além de recrutar diversos mecanismos neurais, também é capaz de promover um aumento na expressão de diferentes citocinas e fatores inflamatórios no BVLr e o PVH, áreas do SNC já caracterizadas como envolvidas em situações emergenciais (GUYENET et al., 2013) e, além disso, áreas possivelmente envolvidas com mecanismos que mobilizam a atividade do eixo HPA (SERRATS et al., 2010). A base dessa evidência vem de resultados que mostram que desafios sistêmicos como injeção intraperitoneal de IL-1β ou LPS foram descritos como desencadeadores da atividade de macrófagos perivasculares e células endoteliais que resultam na produção e liberação de prostaglandinas que agem de maneira parácrina na circuitaria que controla o eixo HPA. Mais que isso, nesse estudo ambos os desafios imunes promoveram aumento na expressão de Fos em neurônios catecolaminérgicos do BVLr, bem como na divisão parvocelular medial do PVH, sugerindo que a projeção BVLr-PVH seja fundamental no controle de mecanismos neuroendócrinos sob essas condições (SCHILTZ; SAWCHENKO, 2007; SERRATS et al., 2010).

A exposição de mamíferos a uma situação de hipóxia pode comprometer o eficiente sistema de fosforilação oxidativa, que transfere a energia química armazenada em ligações de carbono de moléculas orgânicas para ligações de fosfato de alta energia no ATP, que por sua vez é utilizado para sustentar reações físico-químicas nas células (SEMENZA, 2012).

Devido às células dependerem de uma adequada perfusão de O_2 para a manutenção de suas funções vitais, o organismo desenvolveu a capacidade de responder em nível celular a redução do O_2 por meio da indução de respostas transcricionais, para que haja um aumento no fornecimento de O_2 e também induzir uma adaptação metabólica a fim de superar os danos que a hipóxia poderá desencadear (PASCUAL et al., 2001; TAYLOR; CUMMINS, 2009).

O fator de transcrição da hipóxia induzida-1 (HIF-1) é responsável por respostas transcricionais em situações de hipóxia. A subunidade alfa do HIF-1 é rapidamente degradada sob condição de normóxia e é estabilizada quando *prolyl hydroxylases* (PHDs) dependentes de O_2 deixam de agir (RIUS et al., 2008; SEMENZA, 2012). A estabilização do HIF-1 é responsável pela transcrição de uma série de genes que

participam de respostas adaptativas que vão desde ajustes metabólicos a hematológicos requeridos pela queda na perfusão tecidual de O_2, como genes envolvidos na angiogênese, transporte de glicose e fatores hematopoiéticos com o propósito de aumentar a perfusão de O_2 para o tecidos e promover adaptação metabólica (PASCUAL et al., 2001; SEMENZA, 2012; TAYLOR; CUMMINS, 2009).

Além do HIF outros fatores de transcrição podem estar envolvidos nas repostas transcricionais ocasionadas pela hipóxia, dentre eles o fator nuclear k-B (NF-kB) cujo destaque torna-se indispensável diante dos resultados sobre expressão gênica obtidos nesse trabalho (CUMMINS; TAYLOR, 2005).

NF-kB é composto por um grupo de proteínas envolvidas em diferentes funções, dentre elas a regulação de genes relacionados à imunidade inata e inflamação como, por exemplo, TNF e IL-1β (ZHANG et al., 2013). A sensibilidade do NF-kB a hipóxia já foi demonstrada em estudos *in vitro* onde diferentes células são capazes de responder a hipóxia ativando vias de sinalização dependentes de NF-kB por meio da ativação do complexo IKK (CULVER et al., 2010). Ademais, estudos mais recentes mostram que as mesmas hidroxilases que conferem sensibilidade a hipóxia para o HIF-1, têm sido referidas como sendo responsáveis pela sensibilidade do NF-kB, o que indica um "*crosstalk"* entre as duas vias de sinalização durante a hipóxia e nos possibilita sugerir que o aumento dos níveis de interleucinas inflamatórias, demonstrados em nossos resultados como IL-1β e TNF, possam ser resultado da ação desses dois importantes fatores de transcrição (SCHOLZ et al., 2013).

O aumento nos níveis de IL-6, IL-β e TNF observados após o protocolo de hipóxia também estão de acordo com dados já publicados da literatura que mostram que um protocolo de hipóxia crônica intermitente (HCI) é capaz de promover um aumento na expressão dessas citocinas (SMITH et al., 2013). Assim como a molécula co-estimulatória CD86, essas citocinas parecem estar mais expressas em resposta à ativação da microglia, pois resultados de Smith e colaboradores mostram que ratos expostos a alternância de 2 episódios de hipóxia (10% O_2 inspirado) ou normóxia (21% O_2 inspirado) durante 8 h/dia por 14 dias, expressam uma maior quantidade dessas citocinas especificamente em células $CD11b^+$, quando comparado com a expressão

gênica em homogenato de tecido, o qual era composto por outros tipos celulares (SMITH et al., 2013).

Diante disso, além de mostrarmos a relação entre uma situação de hipóxia e o aumento na expressão de mediadores do processo inflamatório, também avaliamos se a microglia poderia mediar essas respostas ocasionadas pela hipóxia. Uma situação de baixa perfusão de O_2 nas células pode ser atribuída a eventos prejudiciais como excitotoxidade, estresse oxidativo e lesão vascular, o que promove alterações no microambiente cerebral e consequentemente no comportamento da microglia (FUMAGALLI et al., 2015).

O protocolo de hipóxia aguda realizado neste trabalho promoveu aumento na expressão de IL-6 especificamente no BVLr e PVH, e após o tratamento com minociclina, foi observado que a inibição da atividade da microglia exacerbou a expressão de IL-6 em ambos BVLr e PVH assim como no córtex, região escolhida como controle.

A IL-6 pode ser secretada por diferentes células no SNC, como microglia, astrócitos, células endoteliais, monócitos infiltrantes e células T. De maneira interessante, a microglia não somente secreta IL-6, mas também expressa o receptor IL-6R, o que sugere uma alça de *feedback* positivo (PERON et al., 2012). A partir dessas informações e características, de acordo com nossos resultados, possivelmente em uma situação de hipóxia a microglia exerça uma atividade de supressão da liberação de IL-6 por outras células do sistema nervoso central, ao passo que quando inibida pela minociclina a expressão de IL-6 duplica e ocorre de maneira não específica no encéfalo.

Em 1996, Hori e colaboradores mostraram que astrócitos submetidos à hipóxia expressam uma grande quantidade de IL-6 e que essa interleucina parece promover neuroproteção durante situações de isquemia, dessa maneira nossa hipótese é que possivelmente essas células junto à microglia podem ser as responsáveis pelos níveis de IL-6 em condições de hipóxia (HORI et al., 1996).

Astrócitos e microglia estão diretamente envolvidas com neuroinflamação após estímulos aversivos e lesões (KARVE et al., 2016). Essas células são capazes alterar sua morfologia, secretar citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, com isso,

influenciam o microambiente e determinam a extensão do dano e o consequente reparo tecidual (KARVE et al., 2016). Os astrócitos são células críticas na manutenção da homeostase do SNC, com papel importante no auxílio da função neuronal, neurotransmissão e sinalização via Ca^{2+} (CHEN; SWANSON, 2003).

Nossos resultados também mostram que o tratamento com minociclina diminui a expressão de RNAm para IL-1β no BVLr após a hipóxia. Além de IL-6, a microglia também é capaz de sintetizar o precursor da IL-1β e evidências sugerem que estas células possuem toda a maquinaria derivada de inflamassoma (CHAKRABORTY et al., 2010). A IL-1β exerce seus efeitos em células alvo quando interage com seu receptor, ativando a via de sinalização por *toll like receptors* (TLRs) por meio do *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88), o que promoveria a ativação do fator de transcrição pro-inflamatório chamado de fator nuclear kappa B (NF-κB). A ativação dessa cascata promove a produção de diferentes citocinas, como por exemplo, fator de necrose tumoral (TNF), que foi significativamente reduzido após o tratamento com minociclina, dentre outras (AKIRA et al., 2001; CHAKRABORTY et al., 2010; GUADAGNO et al., 2015; PERON et al., 2012; SIMS; SMITH, 2010). Ademais, IL-1β quando ativada, além de induzir rápida inflamação local estimulando a síntese de outras citocinas, também estimula a expressão de moléculas co-estimulatórias, dentre elas CD-86 que é expresso em microglia com fenótipo M1 (BUTOVSKY et al., 2014; CHEN; FLIES, 2013; PERON et al., 2012), e como mostrado em nossos resultados, foi mais expresso no PVH após uma situação de hipóxia e não teve expressão alterada após o tratamento com minociclina.

Outro fator importante a ser mencionado é o fato de a hipóxia aumentar a expressão de MMP9. As MMPs são proteinases capazes de romper a lâmina basal de vasos cerebrais e aumentar a permeabilidade vascular (LEE et al., 2007). São conhecidas por estarem ativadas durante a inflamação, e ambas MMP9 e MMP2, estão diretamente relacionadas com a abertura da BHE em diferentes condições fisiopatológicas como, resposta neuroinflamatória a isquemia, esclerose múltipla, infecções dentre outras (CUNNINGHAM et al., 2005).

As *tight junctions* (TJ) são compostas da combinação de proteínas transmembrana que são fundamentais para a manutenção e homeostasia da BHE,

como as proteínas claudina e ocludina. A MMP-9 pode interagir diretamente com proteínas TJ da BHE degradando-as, e de acordo com Bauer e colaboradores, a hipóxia além de aumentar MMP9 promove hiperpermeabilidade na BHE por reduzir a expressão de ocludina (BAUER et al., 2010).

Nossos resultados mostram que a hipóxia promoveu um aumento na expressão de MMP9 no BVLr e PVH, mas não de MMP2, resultados que estão de acordo com a literatura, pois, camundongos submetidos à hipóxia 8% O_2 por 48 horas, mimetizando elevadas altitudes, possuem um aumento da permeabilidade na microcirculação cerebral e também um aumento na expressão de MMP9 que não é acompanhado pelo aumento de MMP2, o que sugere que em ambos os protocolos de hipóxia a MMP9 é preferencialmente expressa (BAUER et al., 2010).

Devido a MMP9 poder ser sintetizada pela microglia também decidimos avaliar se o tratamento com minociclina poderia modificar sua expressão após a hipóxia (KONNECKE; BECHMANN, 2013). A expressão de MMP9 pode ocorrer de maneira constitutiva em células da microglia e pode aumentar na presença de citocinas inflamatórias como IL-1β e TNFα, como demonstrado. Após hipóxia, o tratamento com minociclina foi eficaz em atenuar a expressão dessas citocinas no BVLr, o que também pode ter influenciado a diminuição significativa de MMP9 neste núcleo (GOTTSCHALL; DEB, 1996).

Como já sabemos que alterações na BHE em meio à inflamação podem acarretar infiltração de células do sistema imune no SNC, devido o aumento na expressão de MMP9 constatado em nossos experimentos, avaliamos também a expressão de CD3, um marcador de células T, que não foi expresso em nenhuma das regiões encefálicas avaliadas nesse estudo após uma situação de hipóxia (dados não mostrados).

6.5 Hipóxia aguda é capaz de modificar a expressão RNAm para citocinas pró-inflamatórias em órgãos periféricos

A hipóxia foi capaz de promover aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias em todos os órgãos avaliados, mostrando que este estímulo foi capaz de

promover inflamação não somente em núcleos encefálicos, mas também em importantes órgãos periféricos.

Durante diferentes situações que podem levar a perda da homeostase dos órgãos, células do sistema imune desencadeiam uma série de respostas a fim de limitar o dano tecidual. A resposta inata é pouco específica, porém, muito rápida e por isso, constitui a primeira linha de defesa do organismo contra estímulos nocivos. Esta resposta imune e inflamatória envolve diferentes agentes efetores como neutrófilos, macrófagos, células Natural Killer (NK) e células dendríticas, também atuam o sistema complemento, citocinas, quimiocinas e proteínas da fase aguda (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015).

Nos tecidos periféricos, há maior aderência leucocitária ao endotélio vascular, os monócitos rapidamente se diferenciam em macrófagos, os linfócitos ficam ativados, os neutrófilos geram radicais livres derivados de oxigênio, há um aumento nos níveis de prostaglandinas e proteínas da fase aguda, ocorre proliferação de células hematopoiéticas, dentre outros acontecimentos (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015).

As células dependem de níveis estáveis de O_2 para manter suas funções fisiológicas e, em situações de hipóxia, desenvolveram a capacidade de responder promovendo a transcrição de genes no intuito de aumentar o fornecimento de O_2 e induzir uma adaptação metabólica com o objetivo de superar essa condição (TAYLOR; CUMMINS, 2009). Nossos resultados estão de acordo com essas informações e mostram um aumento na expressão gênica de IL-6 e IL-1β em órgãos importantes para funcionamento do organismo.

Além disso, nossos dados em conjunto com outros estudos mostram que a hipóxia aumenta a expressão de IL-6 no pulmão. Dados da literatura mostram também que camundongos expostos á 6% O_2 expressam IL-6 quando comparado a camundongos em normóxia (YAN et al., 1997; YAN et al., 1995). A expressão de IL-6 no pulmão pode ser atribuída a funções anti-inflamatórias, Yan e colaboradores (1995) mostraram neste mesmo trabalho com camundongos, que o aumento dos níveis de IL-6 no pulmão em uma situação de hipóxia pode estar relacionado com a supressão da produção de IL-1β e TNF por macrófagos ativados, o que pode ser um mecanismo que também justificariam os nossos resultados que mostram que, paralelo ao aumento de

IL-6 no pulmão, não há aumento nos níveis de IL-1β e TNF (YAN et al., 1997; YAN et al., 1995).

A diminuição dos níveis de O_2 também promoveu um aumento de IL-1β e IL-6 no coração. O aumento de IL-1β pode alterar a função contrátil do miocárdio (POMERANTZ et al., 2001; VAN TASSELL et al., 2013), provavelmente por aumentar a síntese de óxido nítrico e alterar os níveis de cálcio intracelular (SCHULZ et al., 1995). Os trabalhos que relacionam o aumento de IL-6 com alterações cardiovasculares ilustram que o aumento dessa citocina (expressa em cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos) pode causar hipertrofia de miócitos e disfunção do miocárdio (FREDJ et al., 2005). Esta citocina possui efeitos pleiotrópicos estimulando a diferenciação de células B, células T, macrófagos e células NK. No fígado, estimulam a síntese de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (PCR) (HUANG et al., 2015). A PCR é sintetizada pelo fígado, principalmente sob estímulo de IL-6, e constitui um importante marcador de futuro risco cardiovascular, por promover efeitos inflamatórios diretos no coração participando do início e progressão de lesões ateroscleróticas e até ao desenvolvimento de síndromes isquêmicas agudas (LI; FANG, 2004). O aumento de IL-6 no fígado pela hipóxia possivelmente levará a síntese de PCR, como demonstrado em um estudo que mostra que em elevadas altitudes a condição de hipóxia promove aumento dos níveis plasmáticos desta proteína (HARTMANN et al., 2000).

Além de promover o aumento de IL-6 no pulmão, coração e fígado, a hipóxia também foi capaz de promover aumento desta citocina no rim. Assim como nos outros órgãos avaliados, ainda não há evidências dos efeitos diretos dessa citocina nos rins em uma situação de hipóxia experimental. A maior parte das informações a respeito são provenientes de estudos nos quais a diminuição de O_2 ocorre por isquemia e reperfusão (CAMPANHOLLE et al., 2012). Jang e colaboradores mostram que após isquemia há um rápido influxo de células do sistema imune nos rins devido alterações endoteliais. Além disso, pode haver adesão de moléculas no endotélio renal e a ativação de receptores *toll like* no epitélio tubular contribuindo com uma cascata de respostas inflamatórias (JANG et al., 2009).

Os nossos resultados mostram o quanto a hipóxia, mesmo durante um curto período de tempo, constitui um estímulo implacável em desencadear diferentes respostas que podem integrar vários órgãos.

6.6 Minociclina é capaz promover mudanças na expressão de Fos no BVLr e PVH e nas respostas autônomas cardiovasculares e respiratórias promovidas pela hipóxia

Um dos primeiros experimentos realizados nesse trabalho tiveram como objetivo caracterizar o protocolo de hipóxia utilizado em relação à expressão de Fos e TH nos neurônios do BVLr. A partir dos resultados que mostraram que o protocolo de hipóxia foi capaz de promover um aumento dos níveis de mediadores inflamatórios no BVLr e PVH e que a microglia poderia estar envolvida na regulação da expressão desses mediadores, decidimos avaliar se a inibição da atividade da microglia por meio do tratamento com minociclina poderia modificar o número de neurônios catecolaminérgicos que expressam Fos no BVLr e o número de neurônios que expressam Fos no PVH.

Os efeitos neurais da minociclina ocorrem devido sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e, atuando no parênquima encefálico, ter ação anti-inflamatória por inibir a atividade da microglia (GARRIDO-MESA et al., 2013; KAPOOR et al., 2015; SANTISTEBAN et al., 2015). Nossos resultados estão de acordo com essa informação e mostram que a minociclina foi capaz de adentrar ao parênquima encefálico e atenuar a expressão de Fos tanto nos neurônios catecolaminérgicos do BVLr quanto nos neurônios do PVH, o que nos permite sugerir que durante a hipóxia, a microglia possa exercer funções relacionadas a regulação da atividade neuronal, embora os mecanismos pelos quais ocorrem essa regulação ainda necessitam ser determinados.

Como dito anteriormente, a real interação entre a microglia e os neurônios ainda é pouco compreendida. Existem trabalhos na literatura que mostram que a microglia é capaz de sintetizar neurotransmissores e também expressar receptores para diferentes neurotransmissores (GERTIG; HANISCH, 2014; KETTENMANN et al., 2011; POCOCK; KETTENMANN, 2007) e que, além disso, a presença da microglia pode modular a

sinalização de neurotransmissores em neurônios (HAYASHI et al., 2006; MORIGUCHI et al., 2003).

Pascual e colaboradores mostraram em 2011 que em slices a ativação da microglia com LPS pode rapidamente aumentar a frequência de correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas, mostrando que essas células quando ativadas são capazes de influenciar uma neurotransmissão excitatória. Ademais, neste mesmo trabalho, os autores permitem discutir que, quando em atividade, a microglia rapidamente libera ATP, recrutando astrócitos que por sua vez amplificam a liberação de ATP e também liberam glutamato o qual atuaria em receptores metabotrópicos para desencadear seus efeitos (PASCUAL et al., 2012).

Ambos PVH e BVLr compõem regiões encefálicas com grande influência sobre o controle da atividade simpática e também respiratória em respostas a hipóxia. A partir das alterações observadas em relação à atividade neuronal por meio da expressão de Fos, surgiu a possibilidade das respostas clássicas à hipóxia também estarem alteradas. Abboud e colaboradores em uma revisão publicada em 2012 ressaltaram que citocinas liberadas no SNC podem agir em núcleos específicos do hipotálamo e tronco encefálico e induzir aumento na atividade do sistema nervoso autônomo (ABBOUD et al., 2012).

A avaliação da variabilidade, utilizando análise espectral, permite a identificação de sequências de valores sucessivos de pressão arterial sistólica (SAP) ou intervalo de pulso (PI). As oscilações rítmicas presentes em várias frequências refletem a modulação simpática ou parassimpática sobre o sistema cardiovascular, que foram analisadas em condições de hipóxia em animais controle e tratados com minociclina (AKSELROD et al., 1981).

Em nosso estudo, durante os períodos avaliados ao longo de 3 horas de hipóxia, o tratamento com minociclina não promoveu alterações na variabilidade da SAP quando comparados com grupo controle. Em relação ao PI foi observado um aumento na variabilidade que pode ser justificado por um aumento da modulação simpática e parassimpática para o coração. Essas alterações foram bloqueadas em animais tratados com minociclina. Esses resultados confirmam o padrão de resposta cardiovascular exercido pelo sistema nervoso autônomo em relação à ativação do

quimiorreflexo periférico já bem estabelecido na literatura, descrito por um aumento na atividade simpática e parassimpática para o coração que não ocorreu nos animais em que a atividade da microglia foi inibida pelo tratamento com minociclina, mostrando a importância da atividade dessas células para as respostas cardiovasculares relacionadas à hipóxia.

Aos 60 minutos após o início da hipóxia, também foi observado um aumento da variabilidade nos animais tratados com minociclina, que pode ser justificado por um aumento na modulação simpática para o coração, que não é acompanhada pelos animais controle.

Não há relatos na literatura que mostrem os efeitos da minociclina sob parâmetros cardiovasculares de animais submetidos à hipóxia. Recentemente foi demonstrado que o tratamento com minociclina foi capaz de alterar os componentes simpático e parassimpático de ratos SHR e também animais submetidos à infusão crônica de angiotensina II (SANTISTEBAN et al., 2015). Em ambos os modelos, a inibição da atividade da microglia foi capaz de restaurar o balanço autônomo dos animais e produzir efeitos anti-hipertensivos por atenuar a inflamação (SANTISTEBAN et al., 2015).

O aumento na expressão de diferentes citocinas em núcleos centrais relacionados com o controle do sistema nervoso autônomo, após a hipóxia, apenas sugere que esses mediadores podem estar envolvidos com mecanismos responsáveis por respostas autônomas à hipoxia. No entanto, ainda não existem resultados na literatura que mostram diretamente qual a influência dos mediadores inflamatórios nas respostas do sistema nervoso autônomo á hipóxia.

Em relação à respiração, observamos que minociclina atenuou a resposta ventilatória após 10 minutos de hipóxia, por promover uma queda no volume corrente. Nossos resultados estão de acordo com a literatura atual que sugere que a inibição da microglia ou sua ativação pode modular a geração de ritmo respiratório e assim alterar a resposta respiratória ao quimiorreflexo (LOREA-HERNANDEZ et al., 2015). Os mecanismos pelos quais a inibição da microglia poderia alterar essas respostas ainda são desconhecidos, mas provavelmente os mediadores liberados pela microglia ativa estejam envolvidos com tais mecanismos (LOREA-HERNANDEZ et al., 2015).

Alguns estudos mostram que a IL-1β pode alterar a respiração, mas pouco se tem descrito sobre os mecanismos que desencadeiam essas repostas. Olsson e colaboradores mostraram em 2003 que ratos neonatos que receberam injeções intraperitoneais de IL-1β apresentaram uma queda significante da frequência respiratória durante a normóxia quando comparados com o grupo controle. Essa queda foi correlacionada com uma maior duração e frequência de episódios de "*gasping*". Além disso, quando os animais tratados com IL-1β foram desafiados em uma situação de anóxia, apresentaram um pior restabelecimento dos parâmetros respiratórios, sendo esses efeitos atenuados pelo pré-tratamento com indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas (OLSSON et al., 2003). Os resultados deste estudo mostram que a IL-1β pode deprimir a respiração, bem como a capacidade de sobrevivência a um desafio anóxico. O mecanismo proposto para tais respostas indica que o aumento dos níveis de prostaglandinas desencadeado pela injeção de IL-1β e de ciclooxigenase-2 (COX-2) pela hipóxia poderia influenciar neurônios no tronco encefálico que controlam a respiração, deprimindo a respiração e alterando as respostas de defesa a hipóxia (OLSSON et al., 2003; SILJEHAV et al., 2014). Recentemente, o papel da prostaglandina PGE_2 foi amplamente analisado pelo grupo do Prof. Jan-Marino Ramirez, que demonstrou que o produto da COX-2 estimula diferencialmente a atividade respiratória gerada pelo complexo preBötzinger (KOCH et al., 2015).

O corpúsculo carotídeo também pode ser alvo da ação da inflamação. A hipóxia crônica intermitente pode recrutar macrófagos para o corpúsculo carotídeo e aumentar a expressão de genes para MCP-1 (proteína quimiotáxica para macrófagos), IL-6, IL-1β, e TNF locais (LIU et al., 2009). Esses fatores inflamatórios já foram caracterizados como moduladores excitatórios da quimiorrecepção no corpúsculo carotídeo, além de também estarem envolvidos com o desenvolvimento da hipertensão causada pela HCI (GOZAL; KHEIRANDISH-GOZAL, 2008).

7 CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados apresentados no presente trabalho mostram que uma situação de hipóxia aguda é capaz de promover um aumento na expressão de Fos em neurônios catecolaminérgicos do BVLr que se projetam para o PVH, além de modificar a expressão gênica de mediadores inflamatórios diferencialmente em ambos os núcleos encefálicos estudados e também em importantes órgãos periféricos. Além disso, o tratamento com minociclina foi capaz de alterar a expressão gênica, a atividade neuronal e as respostas respiratórias e autônomas a hipóxia.

O protocolo experimental de hipóxia utilizado neste estudo é capaz de recrutar vias neurais específicas em dois núcleos conhecidos por estarem envolvidos com situações emergenciais. A diminuição da expressão de Fos no PVH ipsilateral a injeção de DβH, demonstra a importância da integridade de neurônios catecolaminérgicos do BVLr em uma situação de hipóxia, reforçando a hipótese de que o grupamento C1 constitui uma região de integração de informações oriundas dos quimiorreceptores periféricos além de ser capaz de sinalizar a importantes regiões encefálicas afim de desencadear uma série de mecanismos neurais na tentativa de restabelecer a demanda de O_2 para as células.

Podemos sugerir ainda que a hipóxia constitui um desafio sistêmico a homeostase corporal, visto o fato de poder alavancar um aumento na expressão de RNAm para diferentes mediadores do processo inflamatório central e perifericamente, e assim, envolver inflamação e suas respostas.

REFERÊNCIAS*

ABBOTT, S. B.; DEPUY, S. D.; NGUYEN, T.; COATES, M. B.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Selective optogenetic activation of rostral ventrolateral medullary catecholaminergic neurons produces cardiorespiratory stimulation in conscious mice. **J Neurosci.**, v. 33, n. 7, p. 3164-3177, 2013.

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

ABBOUD, F. M.; HARWANI, S. C.; CHAPLEAU, M. W. Autonomic neural regulation of the immune system: implications for hypertension and cardiovascular disease. **Hypertension**, v. 59, n. 4, p. 755-762, 2012.

AGASSANDIAN, K.; SHAN, Z.; RAIZADA, M.; SVED, A. F.; CARD, J. P. C1 catecholamine neurons form local circuit synaptic connections within the rostroventrolateral medulla of rat. **Neuroscience**, v. 227, p. 247-259, 2012.

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

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 8, p. 675-680, 2001.

AKSELROD, S.; GORDON, D.; UBEL, F. A.; SHANNON, D. C.; BERGER, A. C.; COHEN, R. J. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. **Science**, v. 213, n. 4504, p. 220-222, 1981.

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

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

ALOISI, F. Immune function of microglia. **Glia**, v. 36, n. 2, p. 165-179, 2001.

ASTON-JONES, G.; CHEN, S.; ZHU, Y.; OSHINSKY, M. L. A neural circuit for circadian regulation of arousal. **Nat. Neurosci.**, v. 4, n. 7, p. 732-738, 2001.

BAIRAM, A.; FRENETTE, J.; DAUPHIN, C.; CARROLL, J. L.; KHANDJIAN, E. W. Expression of dopamine D1-receptor mRNA in the carotid body of adult rabbits, cats and rats. **Neurosci. Res.**, v. 31, n. 2, p. 147-154, 1998.

BARNETT, S.; MULLIGAN, E.; WAGERLE, L. C.; LAHIRI, S. Measurement of carotid body blood flow in cats by use of radioactive microspheres. **J. Appl. Physiol. (1985)**, v. 65, n. 6, p. 2484-2489, 1988.

BARROS, R. C.; BONAGAMBA, L. G.; OKAMOTO-CANESIN, R.; DE OLIVEIRA, M.; BRANCO, L. G.; MACHADO, B. H. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Auton. Neurosci.**, v. 97, n. 2, p. 110-115, 2002.

BAUER, A. T.; BURGERS, H. F.; RABIE, T.; MARTI, H. H. Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 30, n. 4, p. 837-848, 2010.

BERQUIN, P.; BODINEAU, L.; GROS, F.; LARNICOL, N. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. **Brain. Res.**, v. 857, n. 1-2, p. 30-40, 2000.

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

BISCOE, T. J.; DUCHEN, M. R. Responses of type I cells dissociated from the rabbit carotid body to hypoxia. **J. Physiol.**, v. 428, p. 39-59, 1990b.

BOCHORISHVILI, G.; NGUYEN, T.; COATES, M. B.; VIAR, K. E.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. The orexinergic neurons receive synaptic input from C1 cells in rats. **J. Comp. Neurol.**, v. 522, n. 17, p. 3834-3846, 2014.

BRAGA, V. A.; SORIANO, R. N.; BRACCIALLI, A. L.; DE PAULA, P. M.; BONAGAMBA, L. G.; PATON, J. F.; MACHADO, B. H. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the

commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. **J. Physiol.**, v. 581, n. Pt 3, p. 1129-1145, 2007.

BROGDEN, R. N.; SPEIGHT, T. M.; AVERY, G. S. Minocycline: A review of its antibacterial and pharmacokinetic properties and therapeutic use. **Drugs**, v. 9, n. 4, p. 251-291, 1975.

BULLER, K.; XU, Y.; DAYAS, C.; DAY, T. Dorsal and ventral medullary catecholamine cell groups contribute differentially to systemic interleukin-1beta-induced hypothalamic pituitary adrenal axis responses. **Neuroendocrinology**, v. 73, n. 2, p. 129-138, 2001.

BUTOVSKY, O.; JEDRYCHOWSKI, M. P.; MOORE, C. S.; CIALIC, R.; LANSER, A. J.; GABRIELY, G.; KOEGLSPERGER, T.; DAKE, B.; WU, P. M.; DOYKAN, C. E.; FANEK, Z.; LIU, L.; CHEN, Z.; ROTHSTEIN, J. D.; RANSOHOFF, R. M.; GYGI, S. P.; ANTEL, J. P.; WEINER, H. L. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. **Nat. Neurosci.**, v. 17, n. 1, p. 131-143, 2014.

CAMPANHOLLE, G.; SILVA, R. C.; MARTINS, J. O.; LANDGRAF, M. A.; PAIVA, V. N.; FERREIRA, R. R.; AMANO, M. T.; HIYANE, M. I.; CENEDEZE, M. A.; PACHECO-SILVA, A.; CAMARA, N. O.; LANDGRAF, R. G. Modulation of lung allergic response by renal ischemia and reperfusion injury. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 29, n. 3-4, p. 523-532, 2012.

CARD, J. P.; SVED, J. C.; CRAIG, B.; RAIZADA, M.; VAZQUEZ, J.; SVED, A. F. Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurons: Implications for the central control of cardiovascular regulation. **J. Comp. Neurol.**, v. 499, n. 5, p. 840-859, 2006.

CHAKRABORTY, S.; KAUSHIK, D. K.; GUPTA, M.; BASU, A. Inflammasome signaling at the heart of central nervous system pathology. **J. Neurosci. Res.**, v. 88, n. 8, p. 1615-1631, 2010.

CHAMBERLIN, N. L. Functional organization of the parabrachial complex and intertrigeminal region in the control of breathing. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 143, n. 2-3, p. 115-125, 2004.

CHAMBERLIN, N. L.; SAPER, C. B. Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. **J. Neurosci.**, v. 14, n. 11 Pt 1, p. 6500-6510, 1994.

CHEN, L.; FLIES, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nat. Ver. Immunol.**, v. 13, n. 4, p. 227-242, 2013.

CHEN, Q.; LI, D. P.; PAN, H. L. Presynaptic alpha1 adrenergic receptors differentially regulate synaptic glutamate and GABA release to hypothalamic presympathetic neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, n. 2, p. 733-742, 2006.

CHEN, Y.; SWANSON, R. A. Astrocytes and brain injury. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 23, n. 2, p. 137-149, 2003.

CHITRAVANSHI, V. C.; SAPRU, H. N. Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n. 4 Pt 2, p. R851-858, 1995.

CHULUYAN, H. E.; SAPHIER, D.; ROHN, W. M.; DUNN, A. J. Noradrenergic innervation of the hypothalamus participates in adrenocortical responses to interleukin-1. **Neuroendocrinology**, v. 56, n. 1, p. 106-111, 1992.

COSTA, K. M.; ACCORSI-MENDONCA, D.; MORAES, D. J.; MACHADO, B. H. Evolution and physiology of neural oxygen sensing. **Front. Physiol.**, v. 5, p. 302, 2014.

CRUZ, J. C.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H.; BIANCARDI, V. C.; STERN, J. E. Intermittent activation of peripheral chemoreceptors in awake rats induces Fos expression in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Neuroscience**, v. 157, n. 2, p. 463-472, 2008.

CULVER, C.; SUNDQVIST, A.; MUDIE, S.; MELVIN, A.; XIRODIMAS, D.; ROCHA, S. Mechanism of hypoxia-induced NF-kappaB. **Mol. Cell Biol.**, v. 30, n. 20, p. 4901-4921, 2010.

CUMMINS, E. P.; TAYLOR, C. T. Hypoxia-responsive transcription factors. **Pflugers Arch.**, v. 450, n. 6, p. 363-371, 2005.

CUNNINGHAM, E. T., JR.; BOHN, M. C.; SAWCHENKO, P. E. Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 292, n. 4, p. 651-667, 1990.

CUNNINGHAM, E. T., JR.; SAWCHENKO, P. E. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. **J. Comp. Neurol.**, v. 274, n. 1, p. 60-76, 1988.

CUNNINGHAM, L. A.; WETZEL, M.; ROSENBERG, G. A. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 329-339, 2005.

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

DAMPNEY, R. A.; MOON, E. A. Role of ventrolateral medulla in vasomotor response to cerebral ischemia. **Am. J. Physiol.**, v. 239, n. 3, p. H349-358, 1980.

DEPUY, S. D.; STORNETTA, R. L.; BOCHORISHVILI, G.; DEISSEROTH, K.; WITTEN, I.; COATES, M.; GUYENET, P. G. Glutamatergic neurotransmission between the C1 neurons and the parasympathetic preganglionic neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 4, p. 1486-1497, 2013.

ELAM, M.; YAO, T.; THOREN, P.; SVENSSON, T. H. Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. **Brain Res.**, v. 222, n. 2, p. 373-381, 1981.

ENGELHARDT, S.; AL-AHMAD, A. J.; GASSMANN, M.; OGUNSHOLA, O. O. Hypoxia selectively disrupts brain microvascular endothelial tight junction complexes through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) dependent mechanism. **J. Cell Physiol.**, v. 229, n. 8, p. 1096-1105, 2014.

ERICKSON, J. T.; MILLHORN, D. E. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotoninergic neurons of the rat brainstem. **J. Comp. Neurol.**, v. 348, n. 2, p. 161-182, 1994.

FINLEY, J. C.; KATZ, D. M. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. **Brain Res.**, v. 572, n. 1-2, p. 108-116, 1992.

FORSLING, M. L.; AZIZ, L. A. Release of vasopressin in response to hypoxia and the effect of aminergic and opioid antagonists. **J. Endocrinol.**, v. 99, n. 1, p. 77-86, 1983.

FREDJ, S.; BESCOND, J.; LOUAULT, C.; DELWAIL, A.; LECRON, J. C.; POTREAU, D. Role of interleukin-6 in cardiomyocyte/cardiac fibroblast interactions during myocyte hypertrophy and fibroblast proliferation. **J. Cell Physiol.**, v. 204, n. 2, p. 428-436, 2005.

FUMAGALLI, S.; PEREGO, C.; PISCHIUTTA, F.; ZANIER, E. R.; DE SIMONI, M. G. The ischemic environment drives microglia and macrophage function. **Front. Neurol.**, v. 6, p. 81, 2015.

FUZESI, T.; WITTMANN, G.; LIPOSITS, Z.; LECHAN, R. M.; FEKETE, C. Contribution of noradrenergic and adrenergic cell groups of the brainstem and agouti-related protein-synthesizing neurons of the arcuate nucleus to neuropeptide-y innervation of corticotropin-releasing hormone neurons in hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. **Endocrinology**, v. 148, n. 11, p. 5442-5450, 2007.

GARRIDO-MESA, N.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. What is behind the non-antibiotic properties of minocycline? **Pharmacol. Res.**, v. 67, n. 1, p. 18-30, 2013.

GERTIG, U.; HANISCH, U. K. Microglial diversity by responses and responders. **Front. Cell Neurosci.**, v. 8, p. 101, 2014.

GOTTSCHALL, P. E.; DEB, S. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. **Neuroimmunomodulation**, v. 3, n. 2-3, p. 69-75, 1996.

GOZAL, D.; KHEIRANDISH-GOZAL, L. Cardiovascular morbidity in obstructive sleep apnea: oxidative stress, inflammation, and much more. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 177, n. 4, p. 369-375, 2008.

GUADAGNO, J.; SWAN, P.; SHAIKH, R.; CREGAN, S. P. Microglia-derived IL-1beta triggers p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis in neural precursor cells. **Cell Death Dis.**, v. 6, p. e1779, 2015.

GUNDERSEN, V.; STORM-MATHISEN, J.; BERGERSEN, L. H. Neuroglial Transmission. **Physiol. Rev.**, v. 95, n. 3, p. 695-726, 2015.

GUYENET, P. G. Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. **Respir. Physiol.**, v. 121, n. 2-3, p. 147-162, 2000.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006a.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006b.

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

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; ABBOTT, S. B.; DEPUY, S. D.; FORTUNA, M. G.; KANBAR, R. Central CO2 chemoreception and integrated neural mechanisms of cardiovascular and respiratory control. **J. Appl. Physiol., (1985)**, v. 108, n. 4, p. 995-1002, 2010.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BOCHORISHVILI, G.; DEPUY, S. D.; BURKE, P. G.; ABBOTT, S. B. C1 neurons: the body's EMTs. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 305, n. 3, p. R187-204, 2013.

HARTMANN, G.; TSCHOP, M.; FISCHER, R.; BIDLINGMAIER, C.; RIEPL, R.; TSCHOP, K.; HAUTMANN, H.; ENDRES, S.; TOEPFER, M. High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein. **Cytokine**, v. 12, n. 3, p. 246-252, 2000.

HAYASHI, Y.; ISHIBASHI, H.; HASHIMOTO, K.; NAKANISHI, H. Potentiation of the NMDA receptor-mediated responses through the activation of the glycine site by microglia secreting soluble factors. **Glia**, v. 53, n. 6, p. 660-668, 2006.

HIROOKA, Y.; POLSON, J. W.; POTTS, P. D.; DAMPNEY, R. A. Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. **Neuroscience**, v. 80, n. 4, p. 1209-1224, 1997.

HOKFELT, T.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.; JOHANSSON, O. Evidence for adrenaline neurons in the rat brain. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 89, n. 2, p. 286-288, 1973.

HOLLOWAY, B. B.; STORNETTA, R. L.; BOCHORISHVILI, G.; ERISIR, A.; VIAR, K. E.; GUYENET, P. G. Monosynaptic glutamatergic activation of locus coeruleus and other lower brainstem noradrenergic neurons by the C1 cells in mice. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 48, p. 18792-18805, 2013.

HORI, O.; MATSUMOTO, M.; KUWABARA, K.; MAEDA, Y.; UEDA, H.; OHTSUKI, T.; KINOSHITA, T.; OGAWA, S.; STERN, D. M.; KAMADA, T. Exposure of astrocytes to hypoxia/reoxygenation enhances expression of glucose-regulated protein 78 facilitating astrocyte release of the neuroprotective cytokine interleukin 6. **J. Neurochem.**, v. 66, n. 3, p. 973-979, 1996.

HUANG, M.; YANG, D.; XIANG, M.; WANG, J. Role of interleukin-6 in regulation of immune responses to remodeling after myocardial infarction. **Heart Fail. Rev.**, v. 20, n. 1, p. 25-38, 2015.

IOVINO, M.; GUASTAMACCHIA, E.; GIAGULLI, V. A.; FIORE, G.; LICCHELLI, B.; IOVINO, E.; TRIGGIANI, V. Role of central and peripheral chemoreceptors in vasopressin secretion control. **Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets**, v. 13, n. 3, p. 250-255, 2013.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nat. Immunol.**, v. 16, n. 4, p. 343-353, 2015.

JANG, H. R.; KO, G. J.; WASOWSKA, B. A.; RABB, H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. **J. Mol. Med. (Berl)**, v. 87, n. 9, p. 859-864, 2009.

JIANG, R. G.; EYZAGUIRRE, C. Effects of hypoxia and putative transmitters on [Ca2+]i of rat glomus cells. **Brain Res.**, v. 995, n. 2, p. 285-296, 2004.

KAPOOR, K.; BHANDARE, A. M.; FARNHAM, M. M.; PILOWSKY, P. M. Alerted microglia and the sympathetic nervous system: A novel form of microglia in the development of hypertension. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, 2015.

KARVE, I. P.; TAYLOR, J. M.; CRACK, P. J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. **Br. J. Pharmacol.**, v. 173, n. 4, p. 692-702, 2016.

KETTENMANN, H.; HANISCH, U. K.; NODA, M.; VERKHRATSKY, A. Physiology of microglia. **Physiol. Ver.**, v. 91, n. 2, p. 461-553, 2011.

KING, T. L.; HEESCH, C. M.; CLARK, C. G.; KLINE, D. D.; HASSER, E. M. Hypoxia activates nucleus tractus solitarii neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 302, n. 10, p. R1219-1232, 2012.

KING, T. L.; KLINE, D. D.; RUYLE, B. C.; HEESCH, C. M.; HASSER, E. M. Acute systemic hypoxia activates hypothalamic paraventricular nucleus-projecting catecholaminergic neurons in the caudal ventrolateral medulla. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 305, n. 10, p. R1112-1123, 2013.

KING, T. L.; RUYLE, B. C.; KLINE, D. D.; HEESCH, C. M.; HASSER, E. M. Catecholaminergic neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus are essential for cardiorespiratory adjustments to hypoxia. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, p. ajpregu.00540.02014, 2015.

KOCH, H.; CAUGHIE, C.; ELSEN, F. P.; DOI, A.; GARCIA, A. J., 3RD; ZANELLA, S.; RAMIREZ, J. M. Prostaglandin E2 differentially modulates the central control of eupnoea, sighs and gasping in mice. **J. Physiol.**, v. 593, n. 1, p. 305-319, 2015.

KOIZUMI, K.; TERUI, N.; KOLLAI, M. Neural control of the heart: significance of double innervation re-examined. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 7, n. 3-4, p. 279-294, 1983.

KOIZUMI, K.; TERUI, N.; KOLLAI, M.; BROOKS, C. M. Functional significance of coactivation of vagal and sympathetic cardiac nerves. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 79, n. 6, p. 2116-2120, 1982.

KONNECKE, H.; BECHMANN, I. The role of microglia and matrix metalloproteinases involvement in neuroinflammation and gliomas. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2013, p. 914104, 2013.

KOSHIYA, N.; GUYENET, P. G. NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. **Am. J. Physiol.**, v. 270, n. 6 Pt 2, p. R1273-1278, 1996.

KOSHIYA, N.; HUANGFU, D.; GUYENET, P. G. Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in the rat. **Brain Res.**, v. 609, n. 1-2, p. 174-184, 1993.

KUMAR, P.; PRABHAKAR, N. R. Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. **Compr. Physiol.**, v. 2, n. 1, p. 141-219, 2012.

LAHIRI, S.; ROY, A.; BABY, S. M.; HOSHI, T.; SEMENZA, G. L.; PRABHAKAR, N. R. Oxygen sensing in the body. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 91, n. 3, p. 249-286, 2006.

LEE, C. Z.; XUE, Z.; ZHU, Y.; YANG, G. Y.; YOUNG, W. L. Matrix metalloproteinase-9 inhibition attenuates vascular endothelial growth factor-induced intracerebral hemorrhage. **Stroke**, v. 38, n. 9, p. 2563-2568, 2007.

LI, J. J.; FANG, C. H. C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular diseases. **Med. Hypotheses.**, v. 62, n. 4, p. 499-506, 2004.

LI, Y. W.; DAMPNEY, R. A. Expression of Fos-like protein in brain following sustained hypertension and hypotension in conscious rabbits. **Neuroscience**, v. 61, n. 3, p. 613-634, 1994.

LIPSKI, J.; KANJHAN, R.; KRUSZEWSKA, B.; RONG, W. Properties of presympathetic neurones in the rostral ventrolateral medulla in the rat: an intracellular study "in vivo'. **J. Physiol.**, v. 490 (Pt 3), p. 729-744, 1996.

LIU, X.; HE, L.; STENSAAS, L.; DINGER, B.; FIDONE, S. Adaptation to chronic hypoxia involves immune cell invasion and increased expression of inflammatory cytokines in rat carotid body. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 296, n. 2, p. L158-166, 2009.

LOPEZ, E.; UDAONDO, J.; OLABARRI, M.; MARTINEZ-INDART, L.; BENITO, J.; MINTEGI, S. Mortality in Spanish pediatric emergency departments: a 5-year multicenter survey. **Eur. J. Emerg. Med.**, 2015.

LOREA-HERNANDEZ, J. J.; MORALES, T.; RIVERA-ANGULO, A. J.; ALCANTARA-GONZALEZ, D.; PENA-ORTEGA, F. Microglia modulate respiratory rhythm generation and autoresuscitation. **Glia**, 2015.

LYMAN, M.; LLOYD, D. G.; JI, X.; VIZCAYCHIPI, M. P.; MA, D. Neuroinflammation: the role and consequences. **Neurosci. Res.**, v. 79, p. 1-12, 2014.

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

MADDEN, C. J.; MORRISON, S. F. Hypoxic activation of arterial chemoreceptors inhibits sympathetic outflow to brown adipose tissue in rats. **J. Physiol.**, v. 566, n. Pt 2, p. 559-573, 2005.

MADDEN, C. J.; SVED, A. F. Cardiovascular regulation after destruction of the C1 cell group of the rostral ventrolateral medulla in rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 285, n. 6, p. H2734-2748, 2003.

MADDEN, C. J.; TUPONE, D.; CANO, G.; MORRISON, S. F. alpha2 Adrenergic receptor-mediated inhibition of thermogenesis. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 5, p. 2017-2028, 2013.

MANALO, D. J.; ROWAN, A.; LAVOIE, T.; NATARAJAN, L.; KELLY, B. D.; YE, S. Q.; GARCIA, J. G.; SEMENZA, G. L. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. **Blood**, v. 105, n. 2, p. 659-669, 2005.

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

MINSON, J.; LLEWELLYN-SMITH, I.; NEVILLE, A.; SOMOGYI, P.; CHALMERS, J. Quantitative analysis of spinally projecting adrenaline-synthesising neurons of C1, C2 and C3 groups in rat medulla oblongata. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 30, n. 3, p. 209-220, 1990.

MINSON, J. B.; LLEWELLYN-SMITH, I. J.; PILOWSKY, P. M.; CHALMERS, J. P. Bulbospinal neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the rat: comparison with adrenaline-synthesising neurons. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 47, n. 3, p. 233-243, 1994.

MIYAMOTO, A.; WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. **Front. Cell Neurosci.**, v. 7, p. 70, 2013.

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

MORIGUCHI, S.; MIZOGUCHI, Y.; TOMIMATSU, Y.; HAYASHI, Y.; KADOWAKI, T.; KAGAMIISHI, Y.; KATSUBE, N.; YAMAMOTO, K.; INOUE, K.; WATANABE, S.; NABEKURA, J.; NAKANISHI, H. Potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic responses by microglia. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 119, n. 2, p. 160-169, 2003.

MORRISON, S. F.; MADDEN, C. J.; TUPONE, D. Central control of brown adipose tissue thermogenesis. **Front. Endocrinol. (Lausanne)**, v. 3, n. 5, 2012.

MORTOLA, J. P. Thermographic analysis of body surface temperature of mammals. **Zoolog. Sci.**, v. 30, n. 2, p. 118-124, 2013.

NODA, M.; NAKANISHI, H.; NABEKURA, J.; AKAIKE, N. AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. **J. Neurosci.**, v. 20, n. 1, p. 251-258, 2000.

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

OLIVER, K. M.; GARVEY, J. F.; NG, C. T.; VEALE, D. J.; FEARON, U.; CUMMINS, E. P.; TAYLOR, C. T. Hypoxia activates NF-kappaB-dependent gene expression through the canonical signaling pathway. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 11, n. 9, p. 2057-2064, 2009.

OLSSON, A.; KAYHAN, G.; LAGERCRANTZ, H.; HERLENIUS, E. IL-1 beta depresses respiration and anoxic survival via a prostaglandin-dependent pathway in neonatal rats. **Pediatr. Res.**, v. 54, n. 3, p. 326-331, 2003.

PASCUAL, O.; BEN ACHOUR, S.; ROSTAING, P.; TRILLER, A.; BESSIS, A. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 4, p. E197-205, 2012.

PASCUAL, O.; DENAVIT-SAUBIE, M.; DUMAS, S.; KIETZMANN, T.; GHILINI, G.; MALLET, J.; PEQUIGNOT, J. M. Selective cardiorespiratory and catecholaminergic areas express the hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) under in vivo hypoxia in rat brainstem. **Eur. J. Neurosci.**, v. 14, n. 12, p. 1981-1991, 2001.

PATON, J. F.; DEUCHARS, J.; LI, Y. W.; KASPAROV, S. Properties of solitary tract neurones responding to peripheral arterial chemoreceptors. **Neuroscience**, v. 105, n. 1, p. 231-248, 2001.

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

PEÑA, F.; RAMIREZ, J. M. Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. **Mol. Neurobiol.**, v. 32, n. 3, p. 251-283, 2005.

PERON, J. P. S.; OLIVEIRA, W. N.; BRANDÃO, A.; FICKINGER, A. P.; LIGEIRO DE OLIVEIRA, L. V.; RIZZO; CÂMARA, N. O. Central Nervous System Resident Cells in Neuroinflammation: A Brave New World. **Autoimmune Diseases - Contributing Factors, Specific Cases of Autoimmune Deseases and Stem Cell and other Therapies**, 2012.

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

PILOWSKY, P. M. Neurochemical phenotypes of cardiorespiratory neurons. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 164, n. 1-2, p. 12-17, 2008.

POCOCK, J. M.; KETTENMANN, H. Neurotransmitter receptors on microglia. **Trends Neurosci.**, v. 30, n. 10, p. 527-535, 2007.

POMERANTZ, B. J.; REZNIKOV, L. L.; HARKEN, A. H.; DINARELLO, C. A. Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1beta. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 98, n. 5, p. 2871-2876, 2001.

RAFF, H.; ROARTY, T. P. Renin, ACTH, and aldosterone during acute hypercapnia and hypoxia in conscious rats. **Am. J. Physiol.**, v. 254, n. 3 Pt 2, p. R431-435, 1988.

REDDY, M. K.; PATEL, K. P.; SCHULTZ, H. D. Differential role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in modulating the sympathoexcitatory component of peripheral and central chemoreflexes. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 289, n. 3, p. R789-797, 2005.

RIUS, J.; GUMA, M.; SCHACHTRUP, C.; AKASSOGLOU, K.; ZINKERNAGEL, A. S.; NIZET, V.; JOHNSON, R. S.; HADDAD, G. G.; KARIN, M. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. **Nature**, v. 453, n. 7196, p. 807-811, 2008.

ROSS, C. A.; RUGGIERO, D. A.; PARK, D. H.; JOH, T. H.; SVED, A. F.; FERNANDEZ-PARDAL, J.; SAAVEDRA, J. M.; REIS, D. J. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. **J. Neurosci.**, v. 4, n. 2, p. 474-494, 1984.

SANTISTEBAN, M. M.; AHMARI, N.; CARVAJAL, J. M.; ZINGLER, M. B.; QI, Y.; KIM, S.; JOSEPH, J.; GARCIA-PEREIRA, F.; JOHNSON, R. D.; SHENOY, V.; RAIZADA, M. K.; ZUBCEVIC, J. Involvement of bone marrow cells and neuroinflammation in hypertension. **Circ. Res.**, v. 117, n. 2, p. 178-191, 2015.

SAPRU, H. N. Carotid chemoreflex. Neural pathways and transmitters. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 410, p. 357-364, 1996.

SAWCHENKO, P. E.; BOHN, M. C. Glucocorticoid receptor-immunoreactivity in C1, C2, and C3 adrenergic neurons that project to the hypothalamus or to the spinal cord in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 285, n. 1, p. 107-116, 1989.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 205, n. 3, p. 260-272, 1982a.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. **Brain Res.**, v. 257, n. 3, p. 275-325, 1982b.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization and biochemical specificity of afferent projections to the paraventricular and supraoptic nuclei. **Prog. Brain Res.**, v. 60, p. 19-29, 1983a.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 218, n. 2, p. 121-144, 1983b.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W.; GRZANNA, R.; HOWE, P. R.; BLOOM, S. R.; POLAK, J. M. Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **J. Comp. Neurol**, v. 241, n. 2, p. 138-153, 1985.

SCHILTZ, J. C.; SAWCHENKO, P. E. Specificity and generality of the involvement of catecholaminergic afferents in hypothalamic responses to immune insults. **J. Comp. Neurol.**, v. 502, n. 3, p. 455-467, 2007.

SCHOLZ, C. C.; CAVADAS, M. A.; TAMBUWALA, M. M.; HAMS, E.; RODRIGUEZ, J.; VON KRIEGSHEIM, A.; COTTER, P.; BRUNING, U.; FALLON, P. G.; CHEONG, A.; CUMMINS, E. P.; TAYLOR, C. T. Regulation of IL-1beta-induced NF-kappaB by

hydroxylases links key hypoxic and inflammatory signaling pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 110, n. 46, p. 18490-18495, 2013.

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

SCHREIHOFER, A. M.; GUYENET, P. G. Sympathetic reflexes after depletion of bulbospinal catecholaminergic neurons with anti-DbetaH-saporin. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 279, n. 2, p. R729-742, 2000.

SCHREIHOFER, A. M.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rat. **J. Physiol.**, v. 529 Pt 1, p. 221-236, 2000.

SCHULZ, R.; PANAS, D. L.; CATENA, R.; MONCADA, S.; OLLEY, P. M.; LOPASCHUK, G. D. The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, n. 1, p. 27-34, 1995.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. **Cell**, v. 148, n. 3, p. 399-408, 2012.

SEMENZA, G. L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 9, p. 47-71, 2014.

SERRATS, J.; SCHILTZ, J. C.; GARCIA-BUENO, B.; VAN ROOIJEN, N.; REYES, T. M.; SAWCHENKO, P. E. Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 94-106, 2010.

SILJEHAV, V.; SHVAREV, Y.; HERLENIUS, E. Il-1beta and prostaglandin E2 attenuate the hypercapnic as well as the hypoxic respiratory response via prostaglandin E receptor type 3 in neonatal mice. **J. Appl. Physiol., (1985)**, v. 117, n. 9, p. 1027-1036, 2014.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 2, p. 89-102, 2010.

SMITH, D. W.; BULLER, K. M.; DAY, T. A. Role of ventrolateral medulla catecholamine cells in hypothalamic neuroendocrine cell responses to systemic hypoxia. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 12, p. 7979-7988, 1995.

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

SONG, G.; XU, H.; WANG, H.; MACDONALD, S. M.; POON, C. S. Hypoxia-excited neurons in NTS send axonal projections to Kolliker-Fuse/parabrachial complex in dorsolateral pons. **Neuroscience**, v. 175, p. 145-153, 2011.

SPYER, K. M.; GOURINE, A. V. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 364, n. 1529, p. 2603-2610, 2009.

STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 318-328, 2006.

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

STORNETTA, R. L.; AKEY, P. J.; GUYENET, P. G. Location and electrophysiological characterization of rostral medullary adrenergic neurons that contain neuropeptide Y mRNA in rat medulla. **J. Comp. Neurol.**, v. 415, n. 4, p. 482-500, 1999.

STORNETTA, R. L.; INGLIS, M. A.; VIAR, K. E.; GUYENET, P. G. Afferent and efferent connections of C1 cells with spinal cord or hypothalamic projections in mice. **Brain Struct. Funct.**, 2015.

SVED, A. F.; CANO, G.; CARD, J. P. Neuroanatomical specificity of the circuits controlling sympathetic outflow to different targets. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 28, n. 1-2, p. 115-119, 2001.

SWANSON, L. W.; KUYPERS, H. G. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. **J. Comp. Neurol.**, v. 194, n. 3, p. 555-570, 1980.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. **Neuroendocrinology**, v. 31, n. 6, p. 410-417, 1980.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Annu. Ver. Neurosci.**, v. 6, p. 269-324, 1983.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E.; WIEGAND, S. J.; PRICE, J. L. Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the median eminence and to the medulla or spinal cord. **Brain Res.**, v. 198, n. 1, p. 190-195, 1980.

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

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Arterial chemoreceptor activation reduces the activity of parapyramidal serotonergic neurons in rats. **Neuroscience.**, v. 237, p. 199-207, 2013.

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

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

TAYLOR, C. T.; CUMMINS, E. P. The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1177, p. 178-184, 2009.

THOMAS, A. G.; O'DRISCOLL, C. M.; BRESSLER, J.; KAUFMANN, W.; ROJAS, C. J.; SLUSHER, B. S. Small molecule glutaminase inhibitors block glutamate release from stimulated microglia. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 443, n. 1, p. 32-36, 2014.

TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 6, p. 418-428, 2009.

TUCKER, D. C.; SAPER, C. B.; RUGGIERO, D. A.; REIS, D. J. Organization of central adrenergic pathways: I. Relationships of ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord. **J. Comp. Neurol.**, v. 259, n. 4, p. 591-603, 1987.

VAN TASSELL, B. W.; SEROPIAN, I. M.; TOLDO, S.; MEZZAROMA, E.; ABBATE, A. Interleukin-1beta induces a reversible cardiomyopathy in the mouse. **Inflamm. Res.**, v. 62, n. 7, p. 637-640, 2013.

VARDHAN, A.; KACHROO, A.; SAPRU, H. N. Excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarius mediate the responses to the stimulation of cardio-pulmonary vagal afferent C fiber endings. **Brain Res.**, v. 618, n. 1, p. 23-31, 1993.

VIMERCATI, C.; QANUD, K.; ILSAR, I.; MITACCHIONE, G.; SARNARI, R.; MANIA, D.; FAULK, R.; STANLEY, W. C.; SABBAH, H. N.; RECCHIA, F. A. Acute vagal stimulation attenuates cardiac metabolic response to beta-adrenergic stress. **J. Physiol.**, v. 590, n. Pt 23, p. 6065-6074, 2012.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; JINNO, S.; KOHSAKA, S.; NABEKURA, J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. **J. Neurosci.**, v. 29, n. 13, p. 3974-3980, 2009.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; MIYAMOTO, A.; NABEKURA, J. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. **Trends. Neurosci.**, v. 36, n. 4, p. 209-217, 2013.

WALKER, B. R. Role of vasopressin in the cardiovascular response to hypoxia in the conscious rat. **Am. J. Physiol.**, v. 251, n. 6 Pt 2, p. H1316-1323, 1986.

WEIDENFELD, J.; ABRAMSKY, O.; OVADIA, H. Evidence for the involvement of the central adrenergic system in interleukin 1-induced adrenocortical response. **Neuropharmacology**, v. 28, n. 12, p. 1411-1414, 1989.

WIEGAND, S. J.; PRICE, J. L. Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 192, n. 1, p. 1-19, 1980.

WILLETTE, R. N.; BARCAS, P. P.; KRIEGER, A. J.; SAPRU, H. N. Vasopressor and depressor areas in the rat medulla. Identification by microinjection of L-glutamate. **Neuropharmacology**, v. 22, n. 9, p. 1071-1079, 1983.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature.**, v. 496, n. 7446, p. 445-455, 2013.

XU, J.; TSE, F. W.; TSE, A. ATP triggers intracellular Ca2+ release in type II cells of the rat carotid body. **J. Physiol.**, v. 549, n. Pt 3, p. 739-747, 2003.

YAN, S. F.; OGAWA, S.; STERN, D. M.; PINSKY, D. J. Hypoxia-induced modulation of endothelial cell properties: regulation of barrier function and expression of interleukin-6. **Kidney Int.**, v. 51, n. 2, p. 419-425, 1997.

YAN, S. F.; TRITTO, I.; PINSKY, D.; LIAO, H.; HUANG, J.; FULLER, G.; BRETT, J.; MAY, L.; STERN, D. Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 19, p. 11463-11471, 1995.

YRJANHEIKKI, J.; KEINANEN, R.; PELLIKKA, M.; HOKFELT, T.; KOISTINAHO, J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 95, n. 26, p. 15769-15774, 1998.

ZHANG, G.; LI, J.; PURKAYASTHA, S.; TANG, Y.; ZHANG, H.; YIN, Y.; LI, B.; LIU, G.; CAI, D. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 211-216, 2013.