

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA



JULIANA REIS SOUZA

**Perfil cardiorrespiratório e características eletrofisiológicas de neurônios do Núcleo do Trato Solitário de camundongos *knockout* para receptores  $A_{2A}$  da adenosina submetidos à hipóxia mantida**

Ribeirão Preto – SP

2022

**JULIANA REIS SOUZA**

**Perfil cardiorrespiratório e características eletrofisiológicas de neurônios do Núcleo do Trato Solitário de camundongos *knockout* para receptores  $A_{2A}$  da adenosina submetidos à hipóxia mantida**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito H. Machado

Ribeirão Preto – SP

2022

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

Souza, Juliana Reis

Perfil cardiorrespiratório e características eletrofisiológicas de neurônios do Núcleo do Trato Solitário de camundongos *knockout* para receptores  $A_{2A}$  da adenosina submetidos à hipóxia mantida. Ribeirão Preto: 2021.

130 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Machado, Benedito Honório.

1. Adenosina; 2. Receptores do subtipo  $A_{2A}$ ; 3. Hipóxia; 4. Núcleo do Trato Solitário; 5. Quimiorreceptores; 6. Respostas cardiovasculares e respiratórias.

## FICHA DE APROVAÇÃO

**Aluno:** Juliana Reis Souza

**Título:** Perfil cardiorrespiratório e características eletrofisiológicas de neurônios do Núcleo do Trato Solitário de camundongos *knockout* para receptores  $A_{2A}$  da adenosina submetidos à hipóxia mantida

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

## BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benedito H. Machado (orientador)

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

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

Prof. Dr.

Instituição:

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

Prof. Dr.

Instituição

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

*Dedico aos meus pais, **Maria Lucia Reis e Tony Maciel Souza de Lima**, meus maiores apoiadores e a quem agradeço por tudo. Desde pequena me ensinaram o valor que o estudo possui, incentivando e comemorando cada etapa vencida.*

*Aos meus familiares e amigos que estiveram presentes durante toda minha caminhada até aqui.*

*Obrigada por todo apoio e carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Gostaria de agradecer inicialmente aos meus pais, pois sem eles nenhuma das minhas conquistas seria possível. Um dos maiores ensinamentos que eles me transmitem desde muito pequena é o valor que o estudo possui nas nossas vidas. Mesmo com todas as dificuldades sempre priorizaram a minha educação, e se hoje eu sou uma biomédica cientista devo isso a eles.*

*Agradeço à Deus pelas bênçãos e proteção durante toda a minha jornada neste mundo. Não me considero uma pessoa religiosa, no sentido de que não sigo ou pratico uma religião em específico. Portanto, quando me refiro à Deus não direciono meu olhar para uma entidade única, mas sim para tudo aquilo que represente amor, liberdade e generosidade.*

*Agradeço ao meu namorado e melhor amigo Jhonas Vinicius Camili pelos 5 anos que compartilhamos juntos. Todo carinho, companheirismo, respeito e incentivo que formam os pilares da nossa relação são essenciais para tornar a jornada das nossas vidas mais leves e felizes.*

*Agradeço ao meu orientador, o Professor Benedito Honório Machado, cientista e educador que mais admiro e tomo como exemplo a ser seguido. Se eu pudesse elencar 3 características do Professor Benedito que para mim são as mais marcantes da sua pessoa profissional, seriam elas: sabedoria, integridade e humildade. Ser inteligente significa desenvolver e aprofundar os conhecimentos e as habilidades. Ser sábio significa compreender como utilizar tudo isso adequadamente. Para mim a sabedoria do Professor Benedito está em deter o conhecimento e saber transmití-lo com gentileza, modéstia e honestidade. O laboratório de Controle Autônomo e Respiratório representa a minha base como pesquisadora e eu não tenho dúvidas que tive a melhor possível. Nenhum laboratório no mundo conseguirá ocupar o espaço que este laboratório possui em meu coração. Sou muito feliz e grata pela oportunidade de aprender com o Professor Benedito e todos os que fazem parte dessa equipe.*

*Agradeço à Dra. Daniela Accorsi Mendonça por todo conhecimento que me transmitiu durante esses anos. Graças à Dra. Daniela no meu mestrado tive a oportunidade de aprender e me aprofundar na técnica de eletrofisiologia, uma técnica que sempre tive enorme interesse e fascínio. Sem todo o treinamento e colaboração este trabalho não seria possível.*

*Gostaria de agradecer aqueles que não são apenas colegas de laboratório, mas sim grandes amigos que ganhei durante a pós-graduação. À doutoranda Karla Lima Rodrigue que desde 2019 representa uma parte muito importante da minha vida. Sou muito grata pela amizade que construímos durante todos esses anos e tenho muito orgulho da pessoa e pesquisadora que ela se torna a cada dia. Ao doutorando Mickael Luz, uma das pessoas mais bondosas que conheço, com quem me identifico em vários aspectos e tenho tanta sorte em ter como amigo. Ao Vinicius Castania e à pós-doutoranda Ludmila Lima Silveira que em tão pouco tempo já se tornaram pessoas essenciais na minha vida. A caminhada na pós-graduação nem sempre é fácil, mas com vocês posso dizer sem sombra de dúvidas que ela é muito mais leve e feliz.*

*Gostaria de agradecer as contribuições e colaboração técnicas do Professor Davi José Moraes, da Dra. Milene Mantovani e do Sr. Carlos Alberto Aguiar Silva para o presente estudo.*

*Ao Mauro de oliveira, pessoa que além de ter me ensinado a técnica de canulação em camundongos se tornou um amigo e confidente. Obrigada pelos conselhos e palavras de apoio.*

*Aos meus amigos Douglas Oliveira, Larissa Tinelli, Julia Cipolato e Anna Beatriz que a vida universitária de Ribeirão Preto me proporcionou. Em Ribeirão vivi os melhores anos da minha vida durante a graduação e tive o imenso prazer de compartilhar histórias e momentos inesquecíveis ao lado desses grandes amigos.*

*Agradeço também aos meus familiares, principalmente minha avó Maria Augusta que sempre se orgulhou da minha escolha em seguir a carreira acadêmica. A senhora é um exemplo de coragem e força para todos da nossa família.*

***Gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do presente projeto através da concessão de Bolsa de Mestrado, nº de processo 2021/01767-0.***

***À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, essencial para a realização deste trabalho.***

***Por fim, gostaria de agradecer ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por todo suporte estrutural indispensável para a realização deste trabalho.***



***“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”***

***Albert Einstein***

## RESUMO

SOUZA, Juliana Reis. Perfil cardiorrespiratório e características eletrofisiológicas de neurônios do Núcleo do Trato Solitário de camundongos *knockout* para receptores  $A_{2A}$  da adenosina submetidos à hipóxia mantida. 2021. 130 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2022.

A hipóxia é caracterizada pela redução da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial ( $PaO_2$ ). Sob essa condição os quimiorreceptores periféricos localizados principalmente no corpúsculo carotídeo são estimulados e desencadeiam respostas autonômicas e respiratórias com o objetivo de restaurar os níveis de oxigênio no sangue arterial. Localizado na superfície dorsal do tronco encefálico, o Núcleo do Trato Solitário (NTS) é um centro integrador de diversos sistemas sensoriais, incluindo o processamento sináptico das aferências do quimiorreflexo. Estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que a exposição à hipóxia mantida (HM – 24h,  $FiO_2$  0,1) promove aumento na transmissão glutamatérgica nos neurônios do NTS de ratos devido a uma redução na modulação astrocítica inibitória sobre as correntes glutamatérgicas. A adenosina é um importante neuromodulador da transmissão sináptica e situações de hipóxia e isquemia aumentam a sua concentração no meio extracelular. Estudos anteriores apontam que os receptores do subtipo  $A_{2A}$  representam um importante mecanismo pelo qual a adenosina modula as redes neurais presentes no NTS. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar se a adenosina liberada no NTS e atuando nos seus receptores do subtipo  $A_{2A}$  influencia as alterações no processamento sináptico no NTS de camundongos submetidos à HM. Para isso utilizamos um modelo de camundongo *knockout* para os receptores do subtipo  $A_{2A}$  da adenosina. Como seu controle *wild-type* (WT) foi utilizado o camundongo da linhagem Balb/c. Em uma primeira etapa realizamos uma completa caracterização das funções cardiovasculares e respiratórias de camundongos *knockouts* para os receptores da adenosina do subtipo  $A_{2A}$  não-anestesiados e com livre movimentação submetidos previamente aos protocolos de HM ou mantidos em normóxia. Os resultados obtidos com a caracterização *in vivo* das funções cardiovasculares e respiratórias mostrou que os camundongos  $A_{2A}$  *knockouts* apresentam respostas cardiovasculares à HM e à ativação dos quimiorreceptores periféricos semelhantes ao seu controle WT. Em condições de normóxia, os

camundongos *A<sub>2A</sub> knockouts* apresentam frequência respiratória basal significativamente maior em comparação com seu controle WT, sugerindo que os receptores *A<sub>2A</sub>* da adenosina são relevantes na geração e/ou modulação da atividade respiratória basal em camundongos. Os resultados obtidos com os registros eletrofisiológicos de neurônios do NTS mostraram que a exposição à HM facilita a transmissão glutamatérgica no NTS de camundongos WT Balb/c, o que não é observado nos camundongos *A<sub>2A</sub> knockouts*, sugerindo que os receptores *A<sub>2A</sub>* da adenosina possuem importante papel no aumento da transmissão glutamatérgica que ocorre após exposição à HM.

**Palavras-chave:** Adenosina, Receptores do subtipo *A<sub>2A</sub>*, Hipóxia, Núcleo do Trato Solitário, Quimiorreceptores, Respostas cardiovasculares e respiratórias.

## ABSTRACT

SOUZA, Juliana Reis. Cardiorespiratory profile and electrophysiological characteristics of neurons in the Nucleus of Tractus Solitarius of adenosine A<sub>2A</sub> receptors knockout mice submitted to sustained hypoxia. 2021. 130 p. Dissertation (Master in Physiology) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, State of São Paulo, 2022.

Hypoxia is characterized by a reduction in the partial pressure of oxygen in arterial blood (PaO<sub>2</sub>). Under this condition, peripheral chemoreceptors located mainly in the carotid body are stimulated and trigger autonomic and respiratory responses in order to restore oxygen levels in arterial blood. The Nucleus Tractus Solitarius (NTS) located on the dorsal surface of the brainstem is an integrating center for several sensory systems, including the synaptic processing of chemoreflex afferents. Previous studies from our laboratory demonstrated that exposure of rats to sustained hypoxia (SH – 24h, FiO<sub>2</sub> 0.1) promotes an increase in glutamatergic transmission in NTS neurons due to a reduction in inhibitory astrocytic modulation on glutamatergic currents. Adenosine is an important neuromodulator of synaptic transmission and hypoxia and ischemia increase its concentration in the extracellular environment. Previous studies indicate the A<sub>2A</sub> receptors as an important mechanism by which adenosine modulates the neuronal networks present in the NTS. In this context, the present study we evaluated whether adenosine released in the NTS and acting on its A<sub>2A</sub> subtype receptors are important to changes in NTS synaptic transmission of mice submitted to SH. For this, we used a knockout mouse model for adenosine A<sub>2A</sub> subtype receptor. The Balb/c strain was used as wild-type (WT) control. At first, we evaluated the cardiovascular and respiratory functions of non-anesthetized and freely-moving A<sub>2A</sub> adenosine receptor knockout mice previously submitted to SH protocols or maintained under normoxic conditions. The results obtained with the *in vivo* characterization of cardiovascular and respiratory functions showed that A<sub>2A</sub> knockout mice present cardiovascular responses to SH and peripheral chemoreceptor activation similar to their WT control. Under normoxic conditions, A<sub>2A</sub> knockout mice present a significantly higher baseline respiratory frequency in comparison with the control group, suggesting that adenosine A<sub>2A</sub> receptors are relevant in generating and/or modulating baseline respiratory activity in mice. The results obtained with the electrophysiological recordings of NTS neurons showed that exposure to SH enhances

excitatory glutamatergic transmission in the NTS of WT Balb/c mice, which was not observed in  $A_{2A}$  knockout mice, suggesting that adenosine  $A_{2A}$  receptors play an important role in the enhancement of excitatory neurotransmission in NTS neurons that occurs after exposure to SH.

**Keywords:** Adenosine,  $A_{2A}$  subtype receptors, Hypoxia, Nucleus of Tractus Solitarius, Chemoreceptors, Cardiovascular and respiratory responses.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1: Representação esquemática das principais regiões do tronco encefálico envolvidas nas respostas eferentes autonômicas e respiratórias frente à ativação do quimiorreflexo periférico.** A ativação dos quimiorreceptores periféricos frente à uma redução na pressão parcial de oxigênio no sangue arterial ( $\text{PaO}_2$ ) promove a despolarização de fibras neurais aferentes que levam essa informação da periferia até o SNC via Trato Solitário (TS). No SNC as fibras aferentes do TS realizam contato sináptico com neurônios do Núcleo do Trato Solitário (NTS), região localizada na superfície dorsal do bulbo. Os neurônios do NTS, por sua vez, enviam projeções para a região ventral e lateral do bulbo (RVLM), onde estão localizados neurônios geradores da atividade simpática para o coração e as arteríolas, para um conjunto de subnúcleos contendo neurônios pré-ganglionares parassimpáticos, o Núcleo Ambíguo (NA), e para neurônios dos grupos respiratórios ventrais (VRG). Em conjunto, esses núcleos do tronco encefálico produzem uma resposta cardiorrespiratória integrada caracterizada por intensa bradicardia, simpatoexcitação (a qual promove principalmente vasoconstrição), taquipneia e um aumento da atividade dos músculos abdominais (expiração ativa) (modificado de Costa et al., 2014).....33

**Figura 2: Fotomicrografia de um corte coronal do tronco encefálico contendo o NTS.** A linha tracejada branca destaca a pipeta utilizada para registros de patch-clamp e a linha tracejada amarela destaca o eletrodo de estímulo posicionado sobre as fibras aferentes do TS. AP: Área Postrema, NTS: Núcleo do Trato Solitário.....53

**Figura 3: Traçados representativos das TS-eEPSCs resultantes dos 5 estímulos na frequência de 10 Hz de um neurônio do NTS perfundido por 10 minutos em solução aCSF (traçado superior) e após 5 minutos de perfusão com aCSF contendo DNQX (antagonista do receptor não NMDA - 10  $\mu\text{M}$ ; (traçado inferior).** A figura mostra que as TS-eEPSCs foram completamente abolidas após a perfusão com aCSF contendo DNQX.....54

**Figura 4: Bandas de géis referentes à genotipagem das amostras de camundongos  $A_{2A}$  KO M1 a M30.** A linha tracejada amarela destaca os resultados da genotipagem de 2 camundongos wild-types (WT1 e WT2). A linha tracejada branca destaca o controle negativo (C-). A linha tracejada azul destaca o marcador de peso molecular 1 kb plus. A linha tracejada vermelha destaca a banda de gel correspondente ao peso molecular de 500 pb e a linha tracejada verde destaca a banda de gel correspondente ao peso molecular de 300 pb.....56

**Figura 5: Traçados representativos dos registros da pressão ventricular direita.** Registros realizados em camundongo Balb/c controle (mantido em normóxia; traçado marcado em cinza mais escuro), camundongo  $A_{2A}$ KO controle (mantido em normóxia; traçado marcado em cinza mais claro) e camundongo  $A_{2A}$ KO submetido à HM (traçado marcado em vermelho).....57

**Figura 6: Pressão sistólica ventricular direita ( $\Delta\text{P}$ ) de camundongos anestesiados.** Nos gráficos de barras são apresentados os valores individuais e médios de PSVD calculados a

partir da diferença entre a pressão ventricular máxima e mínima para cada curva ( $\Delta P$ ) de camundongos Balb/c WT mantidos em normóxia (Balb/c controle; n = 8), camundongos A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia (A<sub>2A</sub>KO controle; n = 7) e camundongos A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (A<sub>2A</sub>KO HM; n = 4). Foi utilizado o teste one-way ANOVA para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.....57

**Figura 7: Traçados representativos dos registros dos parâmetros cardiovasculares basais de um camundongo Balb/c WT mantido em normóxia (traçados à esquerda marcados em cinza), um camundongo Balb/c WT submetido à HM (traçados à esquerda marcados em vermelho), um camundongo A<sub>2A</sub>KO mantido em normóxia (traçados à direita marcados em cinza) e de um camundongo A<sub>2A</sub>KO submetido à HM (traçados à direita marcados em vermelho).** Na figura são mostrados os registros da pressão arterial pulsátil (PAP), adquiridos diretamente a partir da deformação do pulso na circulação arterial composto pela pressão arterial sistólica (PAS) e pela pressão arterial diastólica (PAD). Logo abaixo estão representados os traçados correspondentes aos registros da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), ambos derivados a partir dos registros da PAP.....59

**Figura 8: Parâmetros cardiovasculares basais de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO não-anestesiados mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** Os gráficos de barras apresentam os valores individuais e médios da pressão arterial média (PAM, Painel A), pressão arterial sistólica (PAS, Painel B), pressão arterial diastólica (PAD, Painel C) e frequência cardíaca (FC, Painel D) de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 11), Balb/c WT submetidos à HM (n = 11), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 13) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 10). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados. \* Diferente do respectivo controle normóxia (P<0,05).....60

**Figura 9: Traçados representativos das respostas de elevação da pressão arterial e de bradicardia frente à ativação do quimiorreflexo com KCN (0,16 mg/Kg) de um camundongo Balb/c WT mantido em normóxia (traçados à esquerda marcados em cinza), um camundongo Balb/c WT submetido à HM (traçados à esquerda marcados em vermelho), um camundongo A<sub>2A</sub>KO mantido em normóxia (traçados à direita marcados em cinza) e de um camundongo A<sub>2A</sub>KO submetido à HM (traçados à direita marcados em vermelho).** A porção superior da figura ilustra os traçados referentes aos registros da pressão arterial pulsátil (PAP), medida direta a partir da deformação do pulso na circulação arterial composto pela pressão arterial sistólica (PAS) e pela pressão arterial diastólica (PAD). Logo abaixo estão representados os traçados correspondentes aos registros da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), ambos derivados a partir dos registros da PAP. A linha pontilhada indica o momento da administração do KCN via cateter da jugular. Os traçados logo após a administração do KCN correspondem às respostas cardiovasculares frente à ativação dos quimiorreceptores periféricos.....62

**Figura 10: Respostas cardiovasculares à ativação dos quimiorreceptores periféricos com KCN (0,16 mg/Kg; iv) em camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO não-anestesiados mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** Os gráficos de barras apresentam os valores individuais e médios das respostas de elevação da pressão arterial média ( $\Delta PAM$ , Painel A) e redução da frequência cardíaca ( $\Delta FC$ , Painel B) frente à ativação dos quimiorreceptores de

camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 7), Balb/c WT submetidos à HM (n = 9), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 8) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 7). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.....63

**Figura 11: Traçados representativos dos registros da ventilação pulmonar.** Registros realizados em um camundongo Balb/c WT mantido em normóxia (traçado à esquerda marcado em cinza), um camundongo Balb/c WT submetido à HM (traçado à esquerda marcado em rosa), um camundongo A<sub>2A</sub>KO mantido em normóxia (traçado à direita marcado em cinza) e de um camundongo A<sub>2A</sub>KO submetido à HM (traçado à direita marcado em rosa).....66

**Figura 12: Parâmetros respiratórios basais de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO não-anestesiados antes e após a HM.** Os gráficos de barras apresentam os valores individuais e médios de frequência respiratória ( $f_R$  – Painel A), volume corrente ( $V_T$  – Painel B) e ventilação pulmonar ( $V_E$  – Painel C) de camundongos Balb/c WT antes (grupo controle, n = 8) e após a HM (grupo HM, n = 8), e camundongos A<sub>2A</sub>KO antes (grupo controle, n = 11) e após a HM (grupo HM, n = 10). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados. \* Diferente do respectivo controle normóxia (P<0,05). # Diferente do respectivo controle genético (P<0,05).....66

**Figura 13: Gases sanguíneos e parâmetros bioquímicos no sangue arterial de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO não-anestesiados antes e após a HM.** Os gráficos de barras apresentam os valores individuais e médios de pH sanguíneo (Painel A), concentração de bicarbonato ( $HCO_3^-$ , Painel B), pressão parcial de dióxido de carbono ( $pCO_2$ , Painel C), pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$  – Painel D), saturação de oxigênio ( $sO_2$ , Painel E) e concentração de lactato (Lac, Painel F) no sangue arterial de camundongos Balb/c WT antes (grupo controle, n = 8) e após a HM (grupo HM, n = 8), e camundongos A<sub>2A</sub>KO antes (grupo controle, n = 11) e após a HM (grupo HM, n = 10). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados. \* Diferente do respectivo controle normóxia (P<0,05).....67

**Figura 14: Potencial de membrana em repouso de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** A figura mostra os traçados representativos do registro do potencial de membrana em repouso de um neurônio silente (Painel A) e de um neurônio com disparo espontâneo de potenciais de ação (Painel B). Na parte inferior são apresentados gráficos de barras com os valores individuais e médios do potencial de membrana em repouso (RMP; Painel C) de neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 29), Balb/c WT submetidos à HM (n = 18), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 15) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 20). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.....70

**Figura 15: Relação percentual de neurônios do NTS silentes e com disparo espontâneo de potenciais de ação (PA's) nos grupos de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** A figura mostra a proporção de neurônios silentes e de



neurônios com disparo espontâneo de potenciais de ação dentro de cada grupo experimental (Painel A). O Painel B apresenta gráficos de barras com os valores individuais e médios da frequência de disparos de PA's em neurônios com disparo espontâneo de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 14), Balb/c WT submetidos à HM (n = 9), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 8) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 12). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.....71

**Figura 16: Resistência de entrada da membrana de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** A figura mostra um traçado representativo (traçado à direita; Painel A) do protocolo de injeção de correntes negativas (-12,4; -25; -37,5; -50 pA) e um traçado representativo (traçado à esquerda; Painel A) das alterações no potencial de membrana da célula em resposta à injeção das correntes negativas. O Painel B ilustra a relação entre corrente injetada e voltagem da membrana (gráfico V x I), a qual foi utilizada para calcular a resistência de entrada da célula (R<sub>input</sub>). O Painel C apresenta gráficos de barras com os valores individuais e médios de R<sub>input</sub> de neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 12), Balb/c WT submetidos à HM (n = 11), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 17) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 19). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.....72

**Figura 17: Traçados representativos do protocolo de análise das propriedades ativas de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** No lado esquerdo da figura são ilustrados os traçados representativos do disparo de potenciais de ação de um neurônio do NTS em resposta às correntes injetadas. No lado direito, os traçados representativos do protocolo de injeção de correntes despolarizantes (positivas; +12,5; +25; +37,5; +50 e +62,5 pA). No lado esquerdo da figura são ilustrados os traçados representativos do disparo de potenciais de ação de um neurônio do NTS em resposta às correntes injetadas.....74

**Figura 18: Disparo de potenciais de ação de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM em resposta à injeção de correntes despolarizantes.** O Painel A da figura apresenta os valores médios do número relativo de potenciais de ação disparados (valores expressos em porcentagem da resposta máxima) para cada amplitude de corrente despolarizante injetada em neurônios silentes do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 7), Balb/c WT submetidos à HM (n = 4), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 9) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 9). O Painel B apresenta os valores médios do número relativo de potenciais de ação disparados (valores expressos em porcentagem da resposta máxima) para cada amplitude de corrente despolarizante injetada em neurônios com disparo espontâneo de PA's do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 6), Balb/c WT submetidos à HM (n = 5), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 4) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 4). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos. \* Diferente do respectivo controle normóxia (P<0,05). # Diferente do respectivo controle genético (P<0,05).....76

**Figura 19: Correntes pós-sinápticas espontâneas excitatórias (sEPSCs) de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** A figura mostra os traçados representativos dos registros das sEPSCs de neurônios do NTS de cada um dos 4 grupos experimentais (Painel A). Na porção inferior da figura são apresentados gráficos de barras com os valores individuais e médios de amplitude (Painel B) e frequência (Painel C) das sEPSCs de neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 7), Balb/c WT submetidos à HM (n = 10), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 12) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 6). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.....78

**Figura 20: Relação entre intensidade de estímulo (V) e amplitude (pA) das correntes pós-sinápticas excitatórias de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM evocadas pela estimulação das fibras do Trato Solitário (TS-eEPSC).** A figura mostra os traçados representativos do aumento da amplitude das TS-eEPSC em resposta ao aumento da intensidade de estímulo das fibras do TS (de 10 a 100V) de neurônios do NTS de cada um dos 4 grupos experimentais (Painel A). As setas pretas indicam o momento exato em que foram realizados os estímulos. O Painel B apresenta as médias das amplitudes relativas das TS-eEPSC (valores expressos em porcentagem da amplitude máxima) para cada intensidade de estímulo de neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 13), Balb/c WT submetidos à HM (n = 14), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 15) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 13). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos. \* Diferente do respectivo controle normóxia (P<0,05).....82

**Figura 21: Traçados representativos das TS-eEPSCs resultantes de um trem de 5 estímulos na frequência de 10 Hz em neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** As setas pretas indicam o momento exato em que foram realizados os 5 estímulos sequenciais.....83

**Figura 22: Correntes pós-sinápticas excitatórias de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM evocadas pela estimulação do Trato Solitário (TS-eEPSC).** A figura mostra os traçados representativos das TS-eEPSC de neurônios do NTS de cada um dos 4 grupos experimentais (Painel A). As setas pretas indicam o momento exato em que foram realizados os estímulos. No Painel B são apresentados os gráficos de barras com os valores individuais e médios da amplitude das TS-eEPSC de neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 12), Balb/c WT submetidos à HM (n = 10), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 14) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 12). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados. \* Diferente do respectivo controle normóxia (P<0,05).....84

**Figura 23: Depressão sináptica de curto prazo das TS-eEPSCs em neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** O painel

A da figura mostra um traçado representativo das TS-eEPSCs resultantes de um trem de 5 estímulos na frequência de 10 Hz que ilustra os protocolos de análises utilizados para avaliar o processo de depressão sináptica de curto prazo. As linhas tracejadas vermelhas destacam a análise do decaimento na amplitude das correntes evocadas seguindo os 5 estímulos consecutivos. A linha tracejada verde destaca a análise da razão de pulso pareado (PPR) que leva em consideração a amplitude das duas primeiras TS-eEPSCs. A linha tracejada azul destaca a análise do  $1/CV^2$  que leva em consideração a amplitude das correntes evocadas pelo primeiro estímulo do TS. No Painel B são apresentados os valores da porcentagem média de decaimento das TS-eEPSCs em relação a primeira corrente evocada. Os Painéis C e D mostram os valores individuais e médios de PPR e  $1/CV^2$ , respectivamente, de neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 12), Balb/c WT submetidos à HM (n = 10), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 14) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 12). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.....86

**Figura 24: Atividade sináptica evocada pela estimulação do TS em neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** O Painel A da figura mostra os traçados representativos dos potenciais de ação resultantes de um trem de 5 estímulos na frequência de 10 Hz de neurônios do NTS de cada um dos 4 grupos experimentais. Os círculos pretos indicam o momento exato em que os estímulos foram realizados. No Painel B são apresentados os valores médios do número de potenciais de ação evocados em resposta a cada um dos 5 estímulos do TS em neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 16), Balb/c WT submetidos à HM (n = 13), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 16) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 12). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos.....88

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Sequências de *primers* que foram utilizados na amplificação do DNA dos camundongos WT e C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc/J</sup>.....43

**Tabela 2:** Média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de disparos de potenciais de ação de neurônios silentes do NTS de cada grupo experimental em resposta à injeção de correntes despolarizantes.....75

**Tabela 3:** Média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de disparos de potenciais de ação de neurônios com disparo espontâneos no NTS de cada grupo experimental em resposta à injeção de correntes despolarizantes.....75

**Tabela 4:** Média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem da amplitude das TS-eEPSC de neurônios do NTS de cada grupo experimental em resposta a intensidades de estímulo crescentes.....81

**Tabela 5:** Média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de decaimento da amplitude das TS-eEPSC de neurônios do NTS de cada grupo experimental em resposta a um trem de 5 estímulos com frequência de 10 Hz.....85

**Tabela 6:** Média  $\pm$  erro padrão da média do número de potenciais de ação disparados pelos neurônios do NTS de cada grupo experimental em resposta a um trem de 5 estímulos com frequência de 10 Hz.....87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>1/CV<sup>2</sup></b>	Inverso do coeficiente de variação ao quadrado
<b>A<sub>1</sub></b>	Receptor da adenosina do subtipo A <sub>1</sub>
<b>A<sub>2A</sub></b>	Receptor da adenosina do subtipo A <sub>2A</sub>
<b>A<sub>2B</sub></b>	Receptor da adenosina do subtipo A <sub>2B</sub>
<b>A<sub>3</sub></b>	Receptor da adenosina do subtipo A <sub>3</sub>
<b>A<sub>2A</sub>KO</b>	Camundongo <i>knockout</i> para o receptor da adenosina do subtipo A <sub>2A</sub>
<b>AC</b>	Adenilato ciclase
<b>aCSF</b>	Flúido cérebro-espinhal artificial
<b>ANOVA</b>	Análise da variância
<b>AP</b>	Área Postrema
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>C<sup>-</sup></b>	Controle negativo
<b>CA</b>	Califórnia
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cálcio
<b>cAMP</b>	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
<b>CB</b>	Corpúsculo carotídeo
<b>CCCE</b>	Centro de Criação de Camundongos Especiais
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais na Experimentação
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico

<b>DNQX</b>	6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
<b>DPCPX</b>	<i>8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine</i>
<b>EGTA</b>	ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid
<b>ENTs</b>	<i>Equilibrative nucleoside transporters</i>
<b>EPSCs</b>	Correntes pós-sinápticas excitatórias
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>FiO<sub>2</sub></b>	Fração inspirada de oxigênio
<b>FMRP</b>	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
<b>f<sub>R</sub></b>	Frequência respiratória
<b>GABA<sub>A</sub></b>	Receptores do Ácido Gama-Aminobutírico do tipo A
<b>GGF</b>	Fator de crescimento glial
<b>G<sub>i</sub></b>	Proteína G inibitória
<b>GLT-1</b>	Transportadores de glutamato astrocíticos-1
<b>G<sub>s</sub></b>	Proteína G estimulatória
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteína G
<b>HCM</b>	Hipóxia crônica mantida
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Bicarbonato
<b>HEPES</b>	5; N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid
<b>HGR</b>	Heregulina
<b>HM</b>	Hipóxia Mantida
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>IK<sub>A</sub></b>	Corrente de saída de potássio
<b>I.M</b>	Intramuscular

<b>K<sub>ATP</sub></b>	Canais de potássio sensíveis ao ATP
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KCN</b>	Cianeto de potássio
<b>KO</b>	<i>knockout</i>
<b>KOH</b>	Hidróxido de potássio
<b>MO</b>	Missouri
<b>n</b>	número de sinapses ativas
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogênio
<b>NA</b>	Núcleo Ambíguo
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sódio
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>Na-GTP</b>	Sal de sódio de guanosina trifosfata
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sódio
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato Monossódico
<b>NDF</b>	Fator de diferenciação Neu
<b>NGF</b>	Fator de crescimento neural
<b>NKA</b>	Bomba de sódio-potássio ATPase
<b>MgATP</b>	Sal de magnésio de adenosina trifosfato
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NMDA</b>	N-metil D-aspartato
<b>NTS</b>	Núcleo do Trato Solitário
<b>NSW</b>	New South Wales
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio

<b>PA's</b>	Potenciais de ação
<b>P1</b>	Receptores purinérgicos do tipo 1
<b>P1°</b>	Corrente evocada pelo primeiro estímulo do TS
<b>P2</b>	Receptores purinérgicos do tipo 2
<b>P2°</b>	Corrente evocada pelo segundo estímulo do TS
<b>pCO<sub>2</sub></b>	Pressão parcial de dióxido de carbono
<b>PKA</b>	Proteína kinase A
<b>PKC</b>	Proteína kinase C
<b>pO<sub>2</sub></b>	Pressão parcial de oxigênio
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
<b>PAD</b>	Pressão arterial diastólica
<b>PAM</b>	Pressão arterial média
<b>PAS</b>	Pressão arterial sistólica
<b>PAP</b>	Pressão arterial pulsátil
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PKA</b>	Proteína quinase A
<b>PPR</b>	Razão de pulso pareado
<b>Pr</b>	Probabilidade de liberação de neurotransmissores
<b>PSVD</b>	Pressão sistólica ventricular direita
<b>QX-314</b>	Quartenário da lidocaína
<b>RCR</b>	Receptores cardiopulmonares
<b>R<sub>input</sub></b>	Resistência de entrada da membrana
<b>RMP</b>	Potencial de membrana em repouso
<b>Rs</b>	Resistência em série



<b>RVLM</b>	Região rostral ventro-lateral do bulbo
<b>SD</b>	Sprague Dawley
<b>sEPSCs</b>	Correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas
<b>SNARE</b>	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SP</b>	São Paulo
<b>sO<sub>2</sub></b>	Saturação de oxigênio
<b>TS</b>	Trato Solitário
<b>TTX</b>	Tetrodoxina
<b>TS-eEPSCs</b>	Correntes pós-sinápticas excitatórias induzidas pela estimulação do Trato Solitário
<b>UK</b>	United Kingdom
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>VD</b>	Ventrículo direito
<b>V<sub>E</sub></b>	Ventilação pulmonar
<b>VLM</b>	Região ventro-lateral do bulbo
<b>V<sub>T</sub></b>	Volume corrente
<b>VRG</b>	Grupos respiratórios ventrais
<b>WH</b>	Wistar Hannover
<b>WRP</b>	Wistar Ribeirão Preto
<b>WT</b>	<i>Wild-type</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

#	Diferente do respectivo controle genético
*	Diferente do respectivo controle normóxia
%	Porcentagem
μm	Micrômetro
°C	Graus Célsius
±	Mais ou menos
μL	Microlitros
μM	Micromolar
Δ	Varição
<	Menor
>	Maior
=	Igual
bp	Pares de bases
bpm	Batimentos por minuto
cm	Centímetros
F	Faraday
g	Gramas
GΩ	Gigaohm
h	Horas
Hz	Hertz
kb	Kilobase
Kg	Kilogramas

Kg <sup>-1</sup>	Por kilograma
L	Litros
mg	Miligramma
min <sup>-1</sup>	Por minuto
MΩ	Megaohm
mL	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
mOsm	Miliosmóis
ms	Milisegundos
mV	Milivolts
pA	Picoamper
pH	Potencial hidrogênico
rpm	Respirações por minuto
s	Segundos
V	Volts
vs	versus

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	31
2. HIPÓTESE DO TRABALHO.....	40
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Animais.....	42
4.2 Genotipagem para o camundongo C;129S-Adora2a <sup>tm1jfc/J</sup> .....	42
4.3 Protocolo Hipóxia Mantida (HM).....	44
4.4 Registro da pressão sistólica ventricular direita (PSVD) em camundongos A <sub>2A</sub> KO e WT anestesiados.....	45
4.5 Experimentos em camundongos A <sub>2A</sub> KO e WT não-anestesiados e com livre movimentação.....	45
4.5.1 Cirurgia para a cateterização da artéria femoral e veia jugular.....	45
4.5.2 Registros da pressão arterial e frequência cardíaca em camundongos A <sub>2A</sub> KO e WT não-anestesiados.....	46
4.5.3 Ativação do quimiorreflexo periférico.....	47
4.5.4 Registros dos parâmetros respiratórios, gasometria arterial e análise de parâmetros bioquímicos e eletrólitos no sangue arterial de camundongos A <sub>2A</sub> KO e WT não-anestesiados.....	47
4.6 Registros da atividade eletrofisiológica de neurônios do NTS em fatias do tronco encefálico de camundongos A <sub>2A</sub> KO e WT por meio da técnica de <i>Whole cell patch-clamp</i> .....	48
4.6.1 Registro da atividade sináptica em neurônios do NTS.....	48
4.6.2 Estímulo elétrico das fibras aferentes do Trato Solitário (TS).....	50
4.7 Protocolos experimentais para os registros eletrofisiológicos em neurônios do NTS.....	50
4.7.1 Efeitos da HM sobre as propriedades intrínsecas de neurônios do NTS de camundongos WT e A <sub>2A</sub> KO.....	50

4.7.2 Efeitos da HM sobre a neurotransmissão glutamatérgica em neurônios do NTS de camundongos WT e A <sub>2A</sub> KO .....	51
4.7.2 Efeitos da HM sobre a atividade sináptica evocada pela estimulação do TS em neurônios do NTS de camundongos WT e A <sub>2A</sub> KO.....	54
<b>4.8 Análise dos dados.....</b>	<b>55</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Genotipagem para o camundongo C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc</sup>/J .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2 Pressão sistólica ventricular direita (PSVD) de camundongos C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc</sup>/J (A<sub>2A</sub>KO) mantidos em normóxia ou submetidos à HM .....</b>	<b>57</b>
<b>5.3 Efeitos da HM sobre os parâmetros cardiovasculares basais de camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT .....</b>	<b>58</b>
<b>5.4 Efeitos da HM sobre as respostas cardiovasculares à ativação dos quimiorreceptores periféricos com KCN em camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT .....</b>	<b>61</b>
<b>5.5 Efeitos da HM sobre os parâmetros respiratórios basais, gasometria, parâmetros bioquímicos e eletrólitos no sangue arterial de camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT .</b>	<b>63</b>
5.5.1 Parâmetros respiratórios basais .....	63
5.5.2 Gasometria e parâmetros bioquímicos no sangue arterial .....	64
<b>5.6 Efeitos da HM sobre a atividade sináptica de neurônios do NTS de camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT .....</b>	<b>68</b>
5.6.1 Efeitos da HM sobre as propriedades passivas de neurônios do NTS de camundongos A <sub>2A</sub> KO e Balb/c WT .....	68
5.6.2 Efeitos da HM sobre as propriedades ativas de neurônios do NTS de camundongos A <sub>2A</sub> KO e Balb/c WT .....	72
5.6.3 Efeitos da HM sobre as correntes pós-sinápticas espontâneas excitatórias (eEPSCs) de neurônios do NTS de camundongos A <sub>2A</sub> KO e Balb/c WT .....	77
5.6.4 Efeitos da HM sobre as correntes pós-sinápticas excitatórias de neurônios do NTS de camundongos A <sub>2A</sub> KO e Balb/c WT evocadas pela estimulação do Trato Solitário (TS-EPSCs).....	79
5.6.5 Efeitos da HM sobre a atividade sináptica evocada de neurônios do NTS de camundongos A <sub>2A</sub> KO e Balb/c WT .....	87
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>

6.1	Considerações sobre a utilização de camundongos <i>knockout</i> para a avaliação indireta dos receptores da adenosina do subtipo A <sub>2A</sub> no NTS .....	89
6.2	Efeitos da HM sobre os parâmetros cardiovasculares e respiratórios de camundongos A <sub>2A</sub> <i>knockouts</i> e dos seus respectivos controles Balb/c <i>Wild-type</i> ...	93
6.3	Efeitos da HM sobre as características eletrofisiológicas de neurônios do NTS de camundongos A <sub>2A</sub> <i>knockouts</i> e seus respectivos controles Balb/c <i>Wild-type</i> .....	100
6.4	Possíveis relações entre as alterações funcionais observadas nos camundongos <i>knockouts</i> para os receptores A <sub>2A</sub> e as alterações eletrofisiológicas observadas nos neurônios do NTS desses animais .....	111
7.	CONCLUSÕES.....	112
8.	REFERÊNCIAS .....	113

*Apêndice I*

*Artigo publicado relacionado ao período de realização do mestrado*

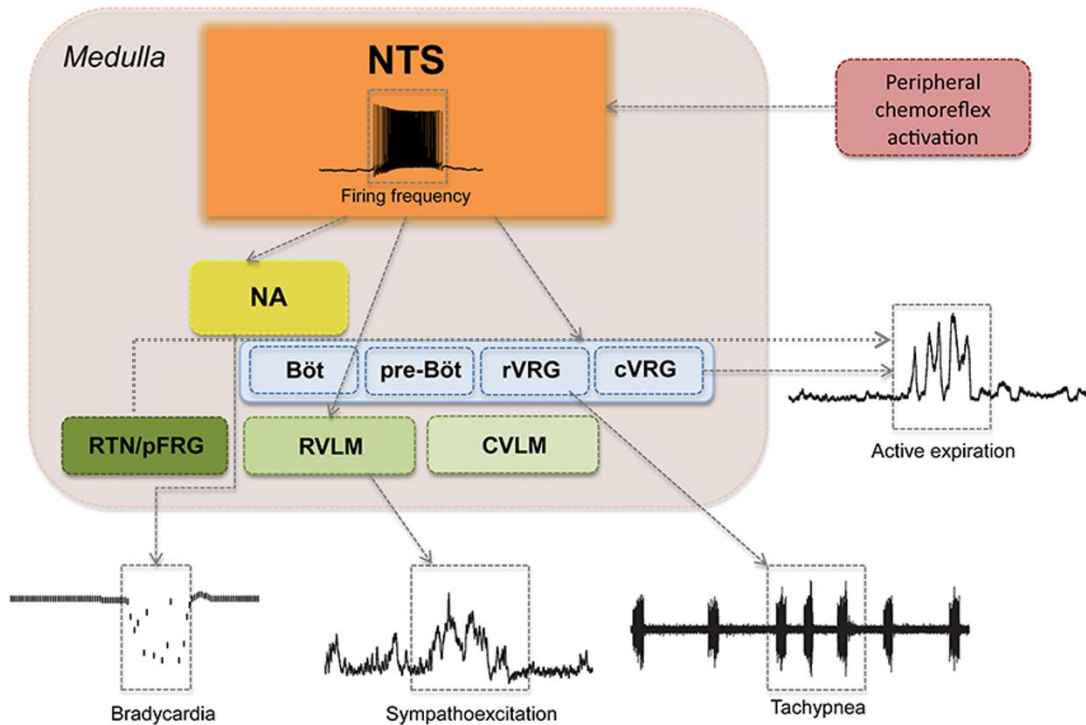
## 1. INTRODUÇÃO

Do ponto de vista evolutivo, a diversidade e a complexidade da vida animal no planeta Terra acompanharam o aumento dos níveis de oxigênio atmosférico que ocorreu há cerca de 500 milhões de anos, sendo este processo relacionado ao surgimento da capacidade de utilizar o oxigênio para gerar energia por meio do metabolismo celular (Berner et al., 2007; Costa et al., 2014). Nesse sentido, a redução (hipóxia) ou privação (anóxia) de oxigênio são desafios fisiológicos que colocam em risco a vida dos seres aeróbicos. A hipóxia decorrente da redução da fração inspirada de oxigênio ( $FiO_2$ ), e conseqüentemente da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial ( $PaO_2$ ), é uma condição adversa para todos os organismos, e especialmente para os mamíferos. Os quimiorreceptores periféricos constituem um sofisticado sistema sensorial que quando ativado permite por meio do quimiorreflexo os ajustes neurovegetativos indispensáveis à sobrevivência diante de uma situação de desafio hipóxico. Este importante reflexo é ativado a partir das situações de baixa pressão de oxigênio no sangue arterial detectadas pelas células glomus e que estão localizadas principalmente nos corpúsculos carotídeos (CB), nas regiões das bifurcações das artérias carótidas comuns (Biscoe & Ducher, 1990). As células do tipo I (glomus) presentes no CB são especializadas em detectar as reduções na  $PaO_2$  e ao serem estimuladas em situações de hipóxia liberam transmissores das suas vesículas, os quais geram potenciais de ação que se propagam, por meio de axônios de neurônios bipolares, os quais constituem as fibras aferentes do Trato Solitário (TS) para o sistema nervoso central (SNC). No SNC, essa informação é processada na superfície dorsal do bulbo, onde os axônios aferentes estabelecem contato sináptico com neurônios do Núcleo do Trato Solitário (NTS), um centro integrador de múltiplos sistemas sensoriais, incluindo o quimiorreflexo periférico. A partir do NTS as vias neurais do quimiorreflexo apresentam projeções para diversas outras áreas do SNC responsáveis por modular eferências autonômicas para vários órgãos e sistemas (Berger, 1979; Seiders & Stuesse, 1984; Claps & Torrealba, 1988; Barraco e cols., 1992; Finley & Katz, 1992; Mifflin e cols., 1993; Donoghue e cols., 1984).

Em resposta à estimulação das fibras aferentes que compõe o TS, o principal neurotransmissor excitatório liberado pelos terminais pré-sinápticos é o glutamato (Andresen & Yang, 1990; Kline et al., 2002; Jin et al., 2004; Accorsi-Mendonça et al.,

2007 e 2009; Kline et al., 2007), que ao se ligar em seus receptores presentes na membrana pós-sináptica promove a despolarização de neurônios de segunda ordem e de ordens superiores no NTS, os quais enviam projeções para regiões ventrais do tronco encefálico envolvidas com a geração das atividades autonômicas e respiratórias (Figura 1). A ativação e integração desses circuitos neuronais em uma situação de hipóxia permite o acoplamento das respostas cardiovasculares e respiratórias necessárias para compensar a queda da  $PaO_2$  (Machado, 2001; Accorsi-Mendonça & Machado, 2013). A respeito da ativação do sistema sensorial do quimiorreflexo, a via eferente parassimpática compreende projeções do NTS para o Núcleo Ambíguo (NA), um conjunto de subnúcleos contendo neurônios pré-ganglionares parassimpáticos, desencadeando quando ativada uma resposta de bradicardia, i.e., redução da frequência cardíaca. Por outro lado, a via eferente simpática envolve projeções do NTS para a região rostral ventro-lateral do bulbo (RVLM), onde estão localizados neurônios geradores da atividade simpática para os vasos e o coração, desencadeando quando ativada no aumento da resistência vascular, aumento da contratilidade cardíaca e consequente aumento da pressão arterial (Ross e cols., 1985; Urbanski e Sapru, 1988; Granata, 1994; Aicher e cols., 1996; Braga et al., 2007). As respostas ventilatórias desencadeadas pela ativação do quimiorreflexo envolvem a participação de grupamentos de neurônios respiratórios localizados na região ventral do tronco encefálico, os quais são os responsáveis pela geração do ritmo e do padrão respiratório (Dampney, 1994; Bianchi et al., 1995; Magalhães et al., 2021).





**Figura 1: Representação esquemática das principais regiões do tronco encefálico envolvidas nas respostas eferentes autonômicas e respiratórias frente à ativação do quimiorreflexo periférico.** A ativação dos quimiorreceptores periféricos frente à uma redução na pressão parcial de oxigênio no sangue arterial ( $\text{PaO}_2$ ) promove a despolarização de fibras neurais aferentes que levam essa informação da periferia até o SNC via Trato Solitário (TS). No SNC as fibras aferentes do TS realizam contato sináptico com neurônios do Núcleo do Trato Solitário (NTS), região localizada na superfície dorsal do bulbo. Os neurônios do NTS, por sua vez, enviam projeções para a região ventral e lateral do bulbo (RVLM), onde estão localizados neurônios geradores da atividade simpática para os vasos, para um conjunto de subnúcleos contendo neurônios pré-ganglionares parassimpáticos, o Núcleo Ambíguo (NA), e para neurônios dos grupos respiratórios ventrais (VRG). Em conjunto, esses núcleos do tronco encefálico produzem uma resposta cardiorrespiratória integrada caracterizada por intensa bradicardia, simpatóexcitação (a qual promove vasoconstrição), taquipneia e um aumento da atividade dos músculos abdominais (expiração ativa) (modificado de Costa et al, 2014).

A hipóxia decorrente da redução da PaO<sub>2</sub> pode implicar em um quadro de hipóxia tecidual no SNC (Russell et al., 2012). Nesse sentido, situações de hipóxia arterial e tecidual podem comprometer o funcionamento celular, especialmente dos neurônios, afetando a função neuronal e a transmissão sináptica (Lipton & Whittingham, 1979; Donnelly et al., 1992; Haddad & Jiang, 1993; Hammarström & Gage, 2002; Peña et al., 2004). Episódios de hipóxia tecidual induzem o aumento da liberação local de diversos neurotransmissores e neuromoduladores, dentre eles a adenosina, noradrenalina, glutamato e glicina (Benveniste et al., 1984; Hagberg et al., 1985; Globus et al., 1989; Kono et al., 2007; Martin et al., 2007). Vale ressaltar que o significado fisiológico para a liberação de cada um desses transmissores continua sendo objeto de investigação. Além disso, a exposição à hipóxia tecidual pode afetar a atividade sináptica por meio de alterações na comunicação glia-neurônio no contexto das sinapses tripartites, as quais são constituídas por neurônios pré- e pós-sinápticos e envolvidas por processos gliais periféricos, presentes em diversas regiões do SNC (Araque et al., 1999) incluindo o NTS (Lachamp et al., 2006; Pecchi et al., 2007; Tashiro & Kawai, 2007; Chounlamounry & Kessler, 2011).

Os astrócitos, também conhecidos como astroglia, influenciam diversos processos relacionados à manutenção da atividade neuronal por meio do controle da homeostase dos íons e do volume extracelular, do fornecimento de substratos energéticos e moléculas antioxidantes aos neurônios, além de promoverem o “turnover” dos neurotransmissores, exercendo assim um papel importante sobre a neurotransmissão (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Estudos mostraram que os astrócitos são mais resistentes à hipóxia tecidual, contribuindo na preservação funcional dos neurônios e da integridade da atividade sináptica. Essa contribuição dos astrócitos pode ser feita por meio da liberação de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), as neuregulinas [como o fator de crescimento glial (GGF), a heregulina (HGR) e o fator de diferenciação Neu (NDF)] e o fator de crescimento neural (NGF) (Kinoshita et al., 1990; Tokita et al., 2001; Swanson et al., 2004; Barreto et al., 2011). Além disso, os astrócitos desempenham importante função na redução dos efeitos deletérios da liberação excessiva de glutamato durante situações de hipóxia tecidual aguda (Rossi et al., 2000). Os astrócitos modulam a transmissão glutamatérgica por meio dos transportadores de

glutamato presentes na membrana astrocítica, os quais exercem controle sobre a concentração desse neurotransmissor disponível na fenda sináptica (Rothstein et al., 1994; Levy et al., 1998; Anderson & Swanson, 2000; Danbolt, 2001; Beart & O'Shea, 2007; Armbruster et al., 2016; Pinky et al., 2018).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório presente no SNC, sendo no contexto do NTS um neurotransmissor determinante para a ativação das vias eferentes autonômicas e respiratórias frente a desafios hipóxicos. Estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que a exposição à hipóxia mantida (HM - FiO<sub>2</sub> 0,1) por 24h facilita a transmissão glutamatérgica presente no NTS de ratos, e que o aumento da excitabilidade neuronal observado após exposição à HM ocorre devido a uma redução na modulação astrocítica inibitória sobre as correntes excitatórias glutamatérgicas do tipo NMDA (Accorsi-Mendonça et al., 2013, 2015 e 2018). A HM parece diminuir a função neuroprotetora dos astrócitos, os quais, como descrito acima, contribuem para a redução da ação excitatória do glutamato liberado em excesso em situações de hipóxia (Accorsi-Mendonça et al., 2013, 2015 e 2018). Além disso, trabalhos anteriores do nosso laboratório investigaram a participação da transmissão purinérgica via ATP na modulação da neurotransmissão excitatória evocada pela estimulação do TS presente no NTS de ratos em condições de normóxia. Foi observado que a liberação de glutamato pelas fibras aferentes do TS promove liberação de ATP pelos astrócitos, que agindo em seus receptores purinérgicos do tipo 2 (P2), presentes nos terminais pré-sinápticos, exerce modulação positiva sobre as correntes pós-sinápticas excitatórias (Accorsi-Mendonça et al., 2013). Nesse contexto, vale ressaltar que a participação da adenosina atuando sobre os seus receptores purinérgicos do tipo 1 (P1) na modulação da transmissão glutamatérgica no NTS de animais controle (normóxia) ou submetidos à HM ainda não foi avaliada.

A adenosina é um nucleosídeo endógeno presente no organismo e capaz de afetar diversos aspectos da fisiologia celular, incluindo atividade neuronal, função vascular, agregação plaquetária e regulação das células sanguíneas. No SNC, a adenosina é amplamente distribuída e pode ser considerada um dos principais neuromoduladores da atividade sináptica. Sob condições fisiológicas, os níveis de adenosina extracelular estão entre 20 e 300 nM, podendo aumentar para uma faixa de até poucos micromolares sob condições de desafio, como no exercício físico

intenso ou em situações de hipóxia, e chegando até 30  $\mu\text{M}$  em condições patológicas como a isquemia (Snyder, 1985; Cunha, 2001; Borea et al., 2018; Liu et al., 2019). No NTS, região de interesse do presente estudo, a exposição à hipóxia por alguns minutos promoveu aumento da concentração extracelular de adenosina em ratos anestesiados e esses níveis elevados de adenosina permaneceram até 2-3h depois do episódio de hipóxia (Barraco et al., 1991; Gourine et al., 2002). A adenosina pode ser liberada tanto pelos astrócitos quanto pelos neurônios por meio dos seus transportadores (denominados ENTs – “Equilibrative nucleoside transporters”), ou ser gerada no meio extracelular a partir da ação das enzimas ecto-nucleotidases sobre o ATP (desfosforilação do ATP em adenosina) (Zimmermann et al., 2012; Chu et al., 2014; Jackson et al., 2017). Foi também descrito um mecanismo de liberação de adenosina pelos astrócitos durante exposição à hipóxia, independente de transportador e mediado por mecanismos não-vesiculares, uma vez que a sua liberação continua a ocorrer nas seguintes situações: 1) em condições experimentais livres de cálcio, 2) após o bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem, e 3) em camundongos transgênicos nos quais foi abolida a liberação de transmissores dependente de SNARE, uma família de proteínas que desempenham um papel central na catálise do processo de fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática (Martin et al., 2007).

Uma vez liberada ou gerada no meio extracelular, a adenosina exerce seus efeitos modulatórios sobre a transmissão sináptica principalmente por meio da interação com seus receptores metabotrópicos (GPCR) divididos em 4 subtipos, sendo eles os receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ . Os receptores dos subtipos  $A_1$  e  $A_3$  são acoplados a proteína G inibitória ( $G_i$ ) de forma que a sua ativação promove redução da atividade da enzima adenilato ciclase (AC), diminuindo os níveis de cAMP e inibindo a atividade da proteína kinase A (PKA). Também já é bem descrito que a ativação dos receptores  $A_1$  promove abertura de canais para potássio na membrana celular. De forma oposta, os receptores do subtipo  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  são acoplados a proteína G estimulatória ( $G_s$ ), sendo que a ativação desses receptores promove um aumento na atividade da AC, elevando a concentração de cAMP e ativando a PKA (Fredholm et al., 2001; Sebastião & Ribeiro., 2009). Como nucleosídeo sinalizador, a adenosina agindo nos seus receptores desempenha uma função neuroprotetora quando sua

concentração extracelular é aumentada (Liu et al., 2019). Foi demonstrado que a adenosina previne a captação de cálcio pelas mitocôndrias neuronais induzida pela hipóxia, sugerindo um efeito neuroprotetor da adenosina por meio da manutenção da homeostase do cálcio intracelular (Dux et al., 1992).

Entre os receptores de adenosina, os subtipos  $A_1$  e  $A_{2A}$  recebem destaque nos estudos da área de neurociências por serem amplamente expressos em diversas regiões do SNC, como hipocampo, hipotálamo, amígdala, tálamo, NTS, córtex cerebral e cerebelo (Liu et al., 2019). A adenosina apresenta maior afinidade pelos receptores  $A_1$  seguido pelos  $A_{2A}$ , enquanto a sua afinidade pelos receptores  $A_{2B}$  e  $A_3$  é relativamente baixa (Fredholm et al., 2001; Borea et al., 2018; Ijzerman et al., 2022). Com relação a possível modulação da neurotransmissão excitatória pela adenosina foi demonstrado que a ativação dos receptores do subtipo  $A_1$  localizados nos terminais pré-sinápticos promove redução na amplitude das correntes pós-sinápticas excitatórias (EPSCs) glutamatérgicas por meio da ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e redução da atividade de canais para cálcio, reduzindo assim a excitabilidade neuronal e inibindo a liberação das vesículas contendo glutamato, respectivamente (Rudolphi et al., 1992; Martín et al., 2007; Rossi et al., 2007; Sebastião & Ribeiro., 2009; Borea et al., 2018). No entanto, os receptores do subtipo  $A_1$  não parecem participar da transmissão das vias neurais do quimiorreflexo presentes no NTS, visto que um trabalho publicado pelo nosso laboratório mostrou que o bloqueio desses receptores com DPCPX (antagonista seletivo dos receptores  $A_1$ ) no NTS de ratos acordados não altera as respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo com KCN (de Paula & Machado, 2001).

Os efeitos modulatórios da adenosina em situações de hipóxia também são mediados por meio da ativação dos seus receptores do subtipo  $A_{2A}$ , expressos nos terminais pré e pós-sinápticos, em astrócitos, microglia e oligodendrócitos (Sebastião & Ribeiro, 2009; Borea et al., 2018). Foi observado que a exposição à hipóxia promove aumento da expressão e atividade dos receptores  $A_{2A}$  (Kobayashi et al., 1998; Kobayash & Millhorn, 1999; Castillo et al., 2008). Recentemente, esses receptores têm sido apontados como um importante alvo terapêutico com vistas à diminuição dos efeitos deletérios da isquemia sobre neurônios (Pedata et al., 2014). No NTS de ratos anestesiados a microinjeção de agonista seletivo dos receptores  $A_{2A}$  promoveu

respostas autonômicas de redução da pressão arterial e frequência cardíaca, e inibição da atividade do nervo simpático renal (Barraco et al., 1991; Phillis et al., 1997; Scislo et al., 2001). Vários estudos sugerem que a adenosina ao ativar os receptores  $A_{2A}$  presentes no NTS desempenha uma importante função neuromoduladora no controle cardiovascular (Thomas et al., 2000; Scislo & O'Leary, 2005, 2006; Minic et al., 2015, 2018). Vale também ressaltar que foi demonstrado por meio de autorradiografia que o NTS contém a maior densidade de transportadores de adenosina no SNC, sugerindo fortemente um papel fisiológico dos mecanismos purinérgicos nas vias neurais do NTS (Bisserbe et al., 1985).

Estudos recentes do nosso laboratório mostraram que camundongos C57BL/6 submetidos à HM por 24h apresentam alterações autonômicas e respiratórias diferentes daquelas observadas anteriormente em ratos submetidos ao mesmo protocolo experimental de HM. Diferente dos ratos, os camundongos C57BL/6 não apresentam aumento da pressão arterial após a HM, mas sim alterações no padrão respiratório associadas a um aumento do componente parassimpático tanto em condições basais quanto em resposta à ativação do quimiorreflexo com KCN (Rodrigues, Souza et al., 2021; Souza et al., 2022). Os efeitos da HM sobre a neurotransmissão no NTS são importantes, pois nesses neurônios ocorrem os primeiros contatos sinápticos das aferências dos quimiorreceptores periféricos. Além disso, alterações na transmissão sináptica nas diferentes subpopulações de neurônios do NTS podem influenciar diretamente as atividades das redes neurais autonômicas (simpática e parassimpática) e respiratórias localizadas na superfície ventral do bulbo, as quais são responsáveis pela geração das respostas cardiovasculares e respiratórias à ativação do quimiorreflexo (Machado, 2001; Machado et al., 2017). No entanto, as alterações no processamento sináptico que ocorrem no NTS de camundongos após exposição à HM e que podem ser responsáveis pelas alterações autonômicas e respiratórias observadas nesse modelo experimental ainda não foram investigadas.

Tendo em vista a importância do tema, no presente estudo investigamos a participação dos receptores do subtipo  $A_{2A}$  da adenosina nas alterações no processamento sináptico nos neurônios do NTS de camundongos submetidos à HM. Para isso camundongos *knockout* homocigotos para os receptores  $A_{2A}$  da adenosina

(A<sub>2A</sub>KO) e seus respectivos controles wild-type (Balb/c) foram submetidos à HM. Nas últimas décadas, o crescente uso de camundongos geneticamente modificados vem se apresentando como uma das abordagens mais importantes para o estudo dos elementos que compõe e influenciam a transmissão sináptica. É evidente que os avanços na capacidade da comunidade científica de modificar o genoma do camundongo permitiram aumentar a nossa compreensão sobre os mecanismos genéticos e neurobiológicos envolvidos com os processos fisiológicos e fisiopatológicos (Picciotto et al, 1998; Leung et al., 2016; Navabpour et al., 2020). Nesse cenário, a partir da tecnologia dos camundongos *knockouts* se tornou possível alterar o fenótipo da neurotransmissão por meio do bloqueio de genes que permitem a expressão de neurotransmissores e receptores específicos e assim investigar as suas possíveis implicações sobre diversos fenômenos neurofisiológicos. Uma vez que o nosso laboratório tem se dedicado em avaliar os diferentes elementos que compõe a neurotransmissão das vias neurais do quimiorreflexo ao nível do NTS, tanto em condições normais quanto de desafio hipóxico, o uso dos camundongos A<sub>2A</sub>KO representa uma ferramenta valiosa no estudo de uma possível participação da adenosina e dos seus receptores do subtipo A<sub>2A</sub> nas alterações observadas no processamento sináptico dos neurônios do NTS de camundongos submetidos a HM.

## 2. HIPÓTESE DO TRABALHO

A adenosina liberada no NTS de camundongos submetidos à HM e atuando nos seus receptores do subtipo  $A_{2A}$  exerce uma modulação inibitória sobre a transmissão glutamatérgica. Em camundongos *knockout* para os receptores do subtipo  $A_{2A}$  essa possível modulação inibitória da adenosina deixaria de se expressar.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar se a adenosina liberada no NTS e atuando nos seus receptores do subtipo  $A_{2A}$  influencia as alterações no processamento sináptico no NTS e consequentemente na modulação das vias neurais envolvidas no processamento das funções cardiovasculares e respiratórias de camundongos submetidos à HM.

#### 3.2 Objetivos específicos

✓ Caracterizar as funções cardiovasculares e respiratórias basais de camundongos *knockout* para o subtipo de receptores  $A_{2A}$  de adenosina ( $A_{2A}KO$ ) não-anestesiados e com livre movimentação submetidos previamente aos protocolos de HM ou mantidos em normóxia;

✓ Caracterizar as respostas cardiovasculares e respiratórias à ativação do quimiorreflexo em camundongos  $A_{2A}KO$  não-anestesiados e com livre movimentação submetidos previamente aos protocolos de HM ou mantidos em normóxia;

✓ Verificar por meio de registros eletrofisiológicos a possível participação da adenosina liberada no NTS e atuando nos seus receptores do subtipo  $A_{2A}$  sobre a transmissão excitatória glutamatérgica em neurônios do NTS de camundongos submetidos previamente aos protocolos de HM ou mantidos em normóxia;

✓ Comparar os resultados obtidos em camundongos  $A_{2A}KO$  controle ou HM com aqueles obtidos em camundongos Balb/c *wild-type* (controle genético) controle ou HM.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Para o desenvolvimento desta Dissertação foram utilizados um total de 90 camundongos machos adultos (6-8 semanas, ~20g) *knockouts* homocigotos para os receptores de adenosina do subtipo  $A_{2A}$  (linhagem C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc</sup>/J –  $A_{2A}KO$ ) adquiridos da empresa Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EUA). Esses animais tiveram reprodução controlada e foram mantidos no Centro de Criação de Camundongos Especiais (CCCE) do Campus da USP de Ribeirão Preto. Uma vez que os camundongos  $A_{2A}$  *knockout* apresentam como background genético a linhagem de camundongos Balb/c (<https://www.jax.org/strain/010685>) e seguindo as recomendações de Silva et al., 1997, utilizamos, como controles, um total de 68 camundongos machos adultos (6-8 semanas, ~20g) *wild-type* da linhagem Balb/c provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais permaneceram em caixas coletivas (máximo de 5 animais por caixa) no Biotério de Manutenção e Experimentação de camundongos da FMRP, localizado no Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, em condições ambientais padrão ( $23 \pm 1^\circ C$ , ciclo claro-escuro de 12h - 12h) com água e ração *ad libitum*. O projeto de pesquisa vinculado ao presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais na Experimentação (CEUA) da FMRP-USP (Protocolo #029/2021).

### 4.2 Genotipagem para o camundongo C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc</sup>/J

A genotipagem para o camundongo C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc</sup>/J foi realizada por meio da técnica de PCR a partir do DNA genômico dos animais. Foram coletadas amostras de tecido das caudas dos camundongos *wild-type* (WT - Balb/c) e C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc</sup>/J ( $A_{2A}KO$ ) e a extração do DNA genômico foi realizada a partir da incubação das amostras em um mix contendo 50  $\mu L$  de tampão de extração + 12,5  $\mu L$  de tampão de preparação (Redextract-N-AMP for tissue - XNAT-1KT – Sigma, Saint Louis, MO, EUA) a  $59^\circ C$  por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 50  $\mu L$  de tampão de neutralização em cada amostra.

Os primers utilizados na etapa de amplificação do DNA dos A<sub>2</sub>KO e WT estavam de acordo com as sequências descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Sequências de *primers* que foram utilizados na amplificação do DNA dos camundongos WT e C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc/J</sup>

Primer	Sequência 5'-3'	Tipo primer
9055	GGG CTC CTC GGT GTA CAT	Comum
9056	CCC ACA GAT CTA GCC TTA	WT reverso
oIMR6393	CAT TTG TCA CGT CCT GCA CGA C	Mutante reverso

Para cada reação foi realizado um mix contendo 0,6 µL de cada primer (10 µM) + 1,2 µL de água Mili-Q autoclavada + 5 µL de Redextract-N-AMP PCR mix (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), totalizando 8 µL. Em seguida, foram adicionados 2 µL da solução contendo o respectivo DNA em cada uma das reações. No controle negativo foram adicionados 2 µL de água Mili-Q autoclavada.

A reação de PCR seguiu o seguinte protocolo:

- 1) Desnaturação inicial: 94°C – 3 min - 1X
- 2) Desnaturação: 94°C – 20-30 s
- 3) Pareamento: 55°C – 30 s
- 4) 72°C – 30 s

As etapas 1-4 foram repetidas 40 vezes

- 5) 72°C – 5 min

Após a corrida das reações no termociclador, os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com Sybr Safe (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA), em tampão TAE-50X. Foi utilizado o marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA). Os resultados esperados são bandas de gel em 550 bp para os camundongos C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc/J</sup> e 364 bp para os animais *wild-type*.

A retirada das amostras dos camundongos para posterior genotipagem foi realizada no Laboratório de Controle Autonômico e Respiratório e todos os procedimentos descritos anteriormente com vistas à genotipagem dos camundongos A<sub>2A</sub>KO foram realizados pela Dra. Milene Mantovani nos laboratórios dos Professores José Antunes Rodrigues e Lucila Leico Kagohara Elias do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP.

### **4.3 Protocolo Hipóxia Mantida (HM)**

Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais: 1) grupo controle Balb/c *Wild-type* (WT): animais WT mantidos em condições de normóxia; 2) grupo controle A<sub>2A</sub>KO: animais A<sub>2A</sub>KO mantidos em condições de normóxia; 3) grupo HM Balb/c *Wild-type* (WT): animais WT submetidos ao protocolo de HM e 4) grupo HM A<sub>2A</sub>KO: animais A<sub>2A</sub>KO submetidos ao protocolo de HM.

Os camundongos do grupo experimental HM foram acondicionados individualmente em caixas contendo ração e água *ad libitum* dentro de câmaras de acrílico (volume de 210 L) equipadas com injetores de gases e sensores de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, temperatura e umidade. O protocolo de hipóxia mantida consiste na injeção controlada do gás nitrogênio (N<sub>2</sub> - Maxiair, Ribeirão Preto, SP, Brasil) ao longo de 24 horas com o objetivo de reduzir a fração inspirada de O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub>) de 0,208 para 0,10, permanecendo neste nível durante todo o período. A injeção do gás N<sub>2</sub> dentro das câmaras foi regulada por um conjunto de válvulas solenóides [Oxycycler (Modelo A84XOV) Biospherix, Parish, Nova York, EUA], operadas por software (AnaWin 2, versão 2.4.17, Biospherix, EUA). Os camundongos do grupo controle foram mantidos em câmaras similares, porém em condições de normóxia (FiO<sub>2</sub> = 0,208) ao longo de 24 horas.

#### **4.4 Registro da pressão sistólica ventricular direita (PSVD) em camundongos A<sub>2A</sub>KO e WT anestesiados**

A partir de um estudo mostrando o desenvolvimento de hipertensão pulmonar em camundongos C57BL/6 adultos *knockouts* para o receptor do subtipo A<sub>2A</sub> da adenosina (Xu et al., 2010) e com o objetivo de também verificar se os camundongos da linhagem C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc</sup>/J fornecidos pelo CCCE apresentavam hipertensão pulmonar, foram realizados registros da pressão ventricular sistólica direita (PVSD) em camundongos anestesiados.

Sob anestesia mantida com Isoflurano (Isoforine®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) a uma taxa de 5% para indução e 1-2% para manutenção, foi realizada a dissecação da veia jugular direita. Um cateter de pressão Millar Mikro-Tip 1,4F (Millar Instruments, Bella Vista, NSW, Australia) foi inserido no interior da veia e a sua extremidade foi posicionada no ventrículo direito (VD). O cateter foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de sinais (PowerLab 4/25 ML845; ADInstruments, Sydney, Austrália) e a pressão no VD foi registrada por meio do software de aquisição (LabChart 7, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). Após a estabilização da fase inicial dos registros as variações de pressão no VD foram registradas por cerca de 20-30 minutos. A pressão sistólica ventricular direita (PSVD) foi calculada a partir do valor médio da diferença entre a pressão ventricular máxima e mínima para cada curva ( $\Delta P$ ) (Chen et al., 2013). Esses registros foram realizados com a colaboração técnica do Sr. Carlos Alberto Aguiar Silva no laboratório do Professor Rubens Fazan Jr., do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP.

#### **4.5 Experimentos em camundongos A<sub>2A</sub>KO e WT não-anestesiados e com livre movimentação**

##### 4.5.1 Cirurgia para a cateterização da artéria femoral e veia jugular

Os animais foram inicialmente anestesiados com Isoflurano (Isoforine®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil), a uma taxa de 5% para indução e 1-2% para manutenção, e um cateter [(MRE-025) Braintree

Scientific, Braintree, Massachusetts, EUA] preenchido com salina foi introduzido na artéria femoral para o posterior registro da pressão arterial pulsátil (PAP). Um segundo cateter [(LDPE-PE/05) Scientific Commodities, Lake Havasu, Arizona, EUA], foi introduzido na veia jugular para posterior administração sistêmica de drogas. Ambos os cateteres foram ancorados nos seus respectivos vasos e exteriorizados no dorso dos animais, os quais após a recuperação da anestesia e da cirurgia permaneceram em condições plenas de livre movimentação. Após a cirurgia, um antibiótico (Pentabiótico; Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) foi administrado (0.2 ml de 1.2 milhões UI, I.M). Quatro dias após a cirurgia de canulação da artéria femoral e veia jugular, os camundongos, mantidos em pequenas caixas de acrílico individuais (dimensões da caixa: 30 x 20 x 13 cm), foram submetidos ao protocolo experimental de normóxia ou HM.

#### 4.5.2 Registros da pressão arterial e frequência cardíaca em camundongos $A_{2A}KO$ e WT não-anestesiados

Ao final do protocolo de normóxia ou HM os camundongos foram transferidos para o local onde se encontra o sistema de registro de parâmetros cardiovasculares. Nessas condições o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT0380; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) cujos sinais elétricos foram enviados para um amplificador (Bridge Amp, ML221; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). Os sinais da PAP, da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) foram adquiridos em um sistema computadorizado (PowerLab 4/25 ML845; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). Os parâmetros cardiovasculares basais foram registrados por 60 minutos, sendo que os valores obtidos nos primeiros 30 minutos não foram considerados devido ao estresse dos animais que normalmente ocorre após a manipulação dos mesmos.

#### 4.5.3 Ativação do quimiorreflexo periférico

A estimulação do quimiorreflexo periférico foi realizada conforme descrito por Franchini & Krieger (1993), por meio da administração de cianeto de potássio (KCN-0,16 mg/Kg; Merck, Darmstadt, Alemanha) via cateter previamente implantado na veia jugular. Em resposta à ativação do quimiorreflexo periférico foram avaliadas as alterações na frequência cardíaca e na pressão arterial média. As respostas pressoras e bradicárdicas à ativação do quimiorreflexo periférico com KCN foram calculadas a partir da diferença entre o pico das respostas e os valores basais anteriores às injeções.

#### 4.5.4 Registros dos parâmetros respiratórios, gasometria arterial e análise de parâmetros bioquímicos e eletrólitos no sangue arterial de camundongos A<sub>2A</sub>KO e WT não-anestesiados

Em camundongos com a artéria femoral previamente canulada, os parâmetros respiratórios foram registrados por meio de pletismografia de corpo inteiro (Malan, 1973). Nessas condições, cada camundongo foi acondicionado dentro de uma câmara pletismográfica de acrílico (1 L), e as oscilações na pressão do ar dentro da câmara devido as alterações de temperatura causadas pela respiração do animal foram detectadas por um transdutor de pressão diferencial de alta sensibilidade (espirômetro ML141; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). Os sinais foram adquiridos por meio de um sistema de aquisição (PowerLab 4/25 ML845; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) o mesmo utilizado na aquisição dos sinais da PAPJ via software LabChart (v.5; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). Para a calibração dos volumes respiratórios, uma seringa foi utilizada para injetar 1 mL de ar no interior da câmara. As temperaturas dentro e fora da câmara foram monitoradas continuamente. Após 30 minutos de adaptação ao ambiente, a câmara foi fechada e as variáveis respiratórias registradas em duas séries de 10 minutos cada uma e intercaladas por um período de 10 minutos em que a câmara foi aberta para evitar o acúmulo de CO<sub>2</sub> em seu interior. O volume corrente ( $V_T$ ) e a frequência respiratória ( $f_R$ ) foram calculados conforme descrito por Malan (1973), e a ventilação ( $V_E$ ) foi obtida como o produto do  $V_T$  e  $f_R$ . Os parâmetros foram calculados a partir de períodos de registros

respiratórios em camundongos acordados quando eles estavam quietos e não apresentavam movimentos corporais

Ao final dos registros respiratórios uma pequena amostra de sangue arterial (~90  $\mu\text{L}$ ) foi coletada via cateter previamente implantado na artéria femoral, e utilizando o cartucho de gasometria i-STAT CG4<sup>+</sup> (REF 03P85-25) e o seu analisador i-STAT (Abbott Park, Chicago, Illinois, USA) foram realizadas as medições de pH, pressão parcial de oxigênio ( $p\text{O}_2$ ) e pressão parcial de dióxido de carbono ( $p\text{CO}_2$ ) no sangue arterial. O sistema também fornece o índice de saturação de oxigênio no sangue arterial ( $s\text{O}_2$ ), e concentração de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) presente no sangue arterial.

Após a realização da gasometria arterial inicial (controle), os animais foram submetidos ao protocolo de HM e em seguida os parâmetros respiratórios foram novamente registrados, e uma nova coleta para gasometria arterial foi realizada conforme descrito anteriormente.

#### **4.6 Registros da atividade eletrofisiológica de neurônios do NTS em fatias do tronco encefálico de camundongos $A_2A\text{KO}$ e WT por meio da técnica de *Whole cell patch-clamp***

##### 4.6.1 Registro da atividade sináptica em neurônios do NTS

Ao final do protocolo de normóxia ou HM, os camundongos foram profundamente anestesiados com Isoflurano (Isoforine®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil), em seguida sacrificados por meio de decapitação e o tronco cerebral foi rapidamente exposto, removido e imerso em solução gelada (~0°C) de fluido cérebro-espinhal artificial (aCSF) contendo (em mM): NaCl, 125; KCl, 2,5;  $\text{MgCl}_2$ , 1;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,25;  $\text{NaHCO}_3$ , 25; glicose, 10 e  $\text{CaCl}_2$ , 2. A solução foi continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ ), para oxigenação e manutenção do pH em 7,4, e osmolalidade entre 300 e 320 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O. Foi adicionada na solução de aCSF a picrotoxina (100 $\mu\text{M}$ ), um antagonista dos receptores ionotrópicos do Ácido Gama-Aminobutírico ( $\text{GABA}_A$ ) com a finalidade de abolir as correntes pós-sinápticas inibitórias. Fatias coronais (250  $\mu\text{m}$  de espessura) do tronco cerebral contendo o NTS foram obtidas por meio de um



vibrátomo (Leica VT 1200S, Wetzlar, Hessen, Alemanha). As fatias foram incubadas em aCSF à temperatura de 31°C durante 30 minutos e após esse período permaneceram em temperatura ambiente (~25°C).

Durante os experimentos as fatias foram imobilizadas em uma câmara de registro por meio de uma rede de fios de nylon montada sobre uma armação de platina, sendo continuamente perfundidas com aCSF borbulhado com mistura carbogênica (2-3 mL/minuto) e mantidas à temperatura controlada de 34°C (TC-324B/344B, Warner Instruments, New Haven, Connecticut, EUA). Os neurônios foram visualizados por meio de um microscópio equipado com óptica de contraste de interferência diferencial e infravermelho (DIC-IR BX-51, Olympus, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera sensível aos comprimentos de onda próximos ao infravermelho (C10600 Orca R2, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japão), a qual estava conectada a um monitor de vídeo.

A atividade sináptica foi registrada por meio da técnica de *Whole cell patch-clamp* (Sakmann & Neher, 1984) em neurônios do NTS de camundongos WT e A<sub>2A</sub>KO submetidos previamente à HM ou normóxia. Microeletrodos de borosilicato de vidro (Sutter Instruments, San Francisco, CA, EUA) confeccionados por meio de um estirador horizontal (P-97 puller, Sutter Instruments, San Francisco, CA, EUA) foram preenchidos com solução contendo (mM): gluconato de potássio, 130; KCl, 20; MgATP, 2; Na-GTP, 0,3; ethylene glycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid (EGTA), 5; N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES), 10; fosfocreatina dissódica, 10; pH 7,3 ajustado com KOH, com osmolalidade final entre 310 e 320 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O e resistência de ponta entre 3 e 7 MΩ.

No modo voltage-clamp os neurônios foram mantidos em um potencial de repouso de -70mV e os registros realizados somente após um período de estabilização de 5 minutos depois da obtenção da configuração *whole-cell*. O potencial de junção líquida (que ocorre quando duas soluções de eletrólitos de diferentes concentrações estão em contato uma com a outra (Cadwell et al., 1968) entre a solução da pipeta e a solução de aCSF foi calculado utilizando o programa Clampex (software pClamp 8, Molecular Devices, San José, CA, EUA) e o valor (-14 mV) foi ajustado offline durante a análise dos dados, de maneira que todos os valores de potencial de membrana mencionados neste trabalho já estão corrigidos de acordo

com esse protocolo. Os sinais foram adquiridos por meio de um amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, San José, CA, EUA) conectado a um computador via a interface analógico/digital-digital/analógico (Digidata 1440, Molecular Devices, San José, CA, EUA). O software pClamp 10 (Molecular Devices, San José, CA, EUA) foi utilizado para a aquisição dos sinais e análise dos resultados. A resistência em série ( $R_s$ ) foi verificada regularmente durante os experimentos, e as células que apresentaram resistência em série superior a 30 M $\Omega$  ou aumentos superiores a 20% foram descartadas.

#### 4.6.2 Estímulo elétrico das fibras aferentes do Trato Solitário (TS)

Um eletrodo bipolar concêntrico de aço inoxidável (Frederick Haer Company, Bowdoin, Maine, EUA) foi posicionado sobre o TS ipsilateral ao neurônio registrado. O eletrodo foi conectado a um estimulador com isolador de pulso (D2A, Digitimer, Hertfordshire, UK) o qual produziu os potenciais de estímulo (intensidade: 0 – 100 V, duração: 0,2 ms) aplicados ao TS. O estimulador foi comandado pelo software de registro por meio da placa conversora analógico/digital-digital/analógico Digidata 1440 (Molecular Devices, San José, CA, EUA).

### **4.7 Protocolos experimentais para os registros eletrofisiológicos em neurônios do NTS**

#### 4.7.1 Efeitos da HM sobre as propriedades intrínsecas de neurônios do NTS de camundongos WT e $A_{2A}KO$

O objetivo deste protocolo foi avaliar se a exposição à HM altera as propriedades passivas e ativas da membrana dos neurônios NTS de animais WT e  $A_{2A}KO$ . Após a obtenção da configuração *whole-cell* e os 5 minutos de estabilização, o potencial de membrana em repouso (resting membrane potential - RMP) de neurônios do NTS foi registrado no modo current-clamp sem que houvesse qualquer injeção de corrente (modo gap-free) por 2 minutos. Em seguida, a resistência de entrada da membrana ( $R_{input}$ ) foi avaliada utilizando um protocolo de injeção de

correntes negativas (-12,5; -25; -37,5 e -50 pA) durante 2 segundos. Por meio de uma regressão linear a relação entre corrente injetada e valores de potencial de membrana foi determinada e a  $R_{input}$  calculada como o valor do coeficiente angular da curva. As propriedades ativas da membrana dos neurônios do NTS de animais WT e  $A_2A$ KO foram avaliadas utilizando um protocolo de injeção de correntes positivas (+12,5; +25; +37,5; +50 e +62,5 pA) durante 2 segundos, no qual foi avaliada a relação entre a injeção de corrente positiva e o número de potenciais de ação evocados pela injeção das correntes.

#### 4.7.2 Efeitos da HM sobre a neurotransmissão glutamatérgica em neurônios do NTS de camundongos WT e $A_2A$ KO

O objetivo deste protocolo foi avaliar se a exposição à HM altera a transmissão glutamatérgica espontânea e evocada pela estimulação das fibras aferentes do TS no NTS de animais WT e  $A_2A$ KO. As correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas (sEPSCs) foram registradas por 2 minutos após a obtenção da configuração *whole-cell* em neurônios do NTS no modo voltage-clamp, e foram avaliadas a amplitude e a frequência das sEPSCs.

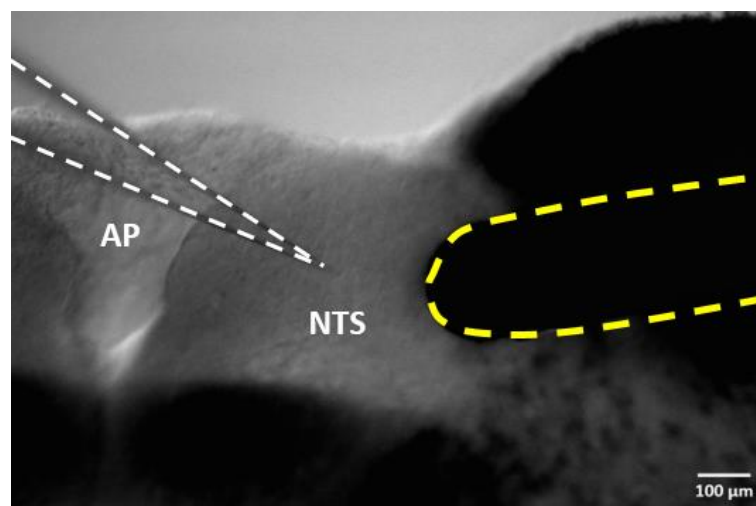
As correntes pós-sinápticas excitatórias induzidas pela estimulação do Trato Solitário (TS-eEPSCs) foram evocadas por meio do posicionamento de um eletrodo bipolar concêntrico de aço inoxidável (Frederick Haer Company Bowdoin, Maine, EUA) sobre o TS ipsilateral ao neurônio registrado (Figura 2) conforme descrito na seção de Materiais e Métodos. Após a obtenção da configuração *whole-cell*, e no modo voltage-clamp, foram realizados estímulos de intensidades crescentes (1 estímulo a cada 10 segundos) de 10 a 100 V com o objetivo de determinar para cada neurônio a intensidade de estímulo que desencadeia a amplitude máxima das TS-eEPSCs, sendo essa a intensidade de estímulo utilizada no protocolo subsequente (Accorsi-Mendonça et al. 2011).

Uma vez determinada a intensidade de estímulo que desencadeia a amplitude máxima das TS-eEPSCs para cada neurônio registrado, foram realizadas 60 séries de cinco estímulos cada uma do TS na frequência de 10 Hz, a qual corresponde à frequência de despolarização gerada pelas células do corpúsculo carotídeo de

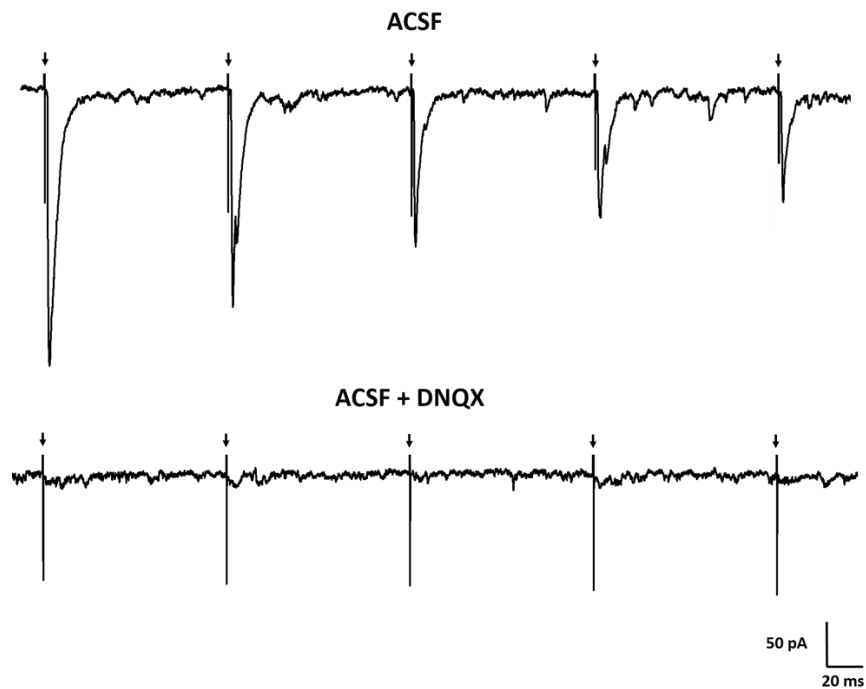
animais adultos em condições hipóxicas (Pawar et al. 2008). A partir deste protocolo foram avaliadas: 1) a amplitude das TS-eEPSCs, calculada como a média da amplitude das correntes evocadas pelo primeiro estímulo do TS, 2) a depressão (ou o decaimento) na amplitude das correntes em resposta aos 5 estímulos consecutivos, 3) a razão de pulso pareado (PPR), calculada como a razão entre a amplitude das duas primeiras TS-eEPSCs ( $P2^0/P1^0$ ). A média dessas variáveis foi obtida para cada neurônio utilizando apenas as 10 últimas séries de cinco estímulos cada uma. Além disso, também foi avaliado o inverso do coeficiente de variação ao quadrado ( $1/CV^2$ ) da amplitude das correntes evocadas pelo primeiro estímulo do TS ( $P1^0$ ). Para cada neurônio, a média da amplitude das correntes evocadas pelo primeiro estímulo foi obtida utilizando todas as 60 séries de cinco estímulos. As análises de depressão das TS-eEPSCs, PPR e  $1/CV^2$  fornecem informações sobre alterações pré-sinápticas em resposta a um tratamento, agonistas, antagonistas ou condição experimental (Miles 1986; Bekkers & Stevens, 1990; Chen et al., 1999; Kline et al. 2002; Sekizawa et al. 2003). O objetivo dessas análises foi avaliar se possíveis alterações na amplitude das TS-eEPSCs em resposta à HM ou no nosso modelo de animal *knockout* para os receptores  $A_{2A}$  são decorrentes de alterações em mecanismos pré-sinápticos.

Nos experimentos de registro das TS-eEPSCs, realizados no modo voltage-clamp, conforme o aumento da intensidade de estímulo das fibras do TS produzia aumento na amplitude das correntes, problemas de *space-clamp* começaram a ser observados. O *space-clamp* ocorre quando a pipeta de registro, utilizada para medir as correntes pós-sinápticas e posicionada no corpo celular do neurônio, não consegue fixar o potencial da membrana de todas as ramificações dendríticas daquele neurônio (Spruston et al., 1993; Bar-Yehuda & Korngreen, 2008). Em células não esféricas, como os neurônios, que apresentam diversas ramificações, um estímulo elétrico pode despolarizar ramificações não “clampeadas”, desencadeando uma corrente gerada por disparo de potencial de ação que impede a análise das TS-eEPSCs. Portanto, com o objetivo de abolir problemas de *space-clamp*, exclusivamente nos experimentos de análise das correntes evocadas foi adicionado na solução intracelular o derivado quaternário da lidocaína QX-314 (5 mM), um bloqueador de canais de  $Na^+$  voltagem-dependentes impermeável à membrana que abole o disparo de potenciais de ação no neurônio pós-sináptico registrado (Narahashi & Frazier, 1971; Yeh, 1978). Mesmo

estando bem estabelecido que o principal neurotransmissor liberado pelas fibras aferentes do TS é o glutamato e que as correntes pós-sinápticas evocadas pelo TS em um potencial de membrana de -70 mV são mediadas pelos seus receptores do tipo não-NMDA, em alguns experimentos nós adicionamos 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX, antagonista do receptor não-NMDA - 10  $\mu$ M) na solução de aCSF para confirmar se as TS-eEPSCs foram efetivamente induzidas por glutamato via ativação de receptores não-NMDA (Accorsi-Mendonça et al., 2011). A Figura 3 apresenta um traçado representativo de um neurônio do NTS no qual as TS-eEPSCs foram registradas por um período de 10 minutos com perfusão contendo apenas aCSF, seguida por 5 minutos de perfusão com aCSF + DNQX. Após 5 minutos da perfusão contendo o antagonista do receptor não-NMDA é possível verificar que as TS-eEPSCs foram completamente abolidas.



**Figura 2: Fotomicrografia de um corte coronal do tronco encefálico contendo o NTS.** A linha tracejada branca destaca a pipeta de patch e a linha tracejada amarela destaca o eletrodo de estímulo posicionado sobre as fibras aferentes do TS. AP: Área Postrema, NTS: Núcleo do Trato Solitário.



**Figura 3:** Traçados representativos das TS-eEPSCs resultantes dos 5 estímulos na frequência de 10 Hz de um neurônio do NTS perfundido por 10 minutos em solução aCSF (traçado superior) e após 5 minutos de perfusão com aCSF contendo DNQX (antagonista do receptor não NMDA - 10  $\mu\text{M}$ ; (traçado inferior). A figura mostra que as TS-eEPSCs foram completamente abolidas após a perfusão com aCSF contendo DNQX.

#### 4.7.2 Efeitos da HM sobre a atividade sináptica evocada pela estimulação do TS em neurônios do NTS de camundongos WT e $A_2A$ KO

O objetivo deste protocolo foi avaliar se a exposição à HM altera o disparo de potenciais de ação evocados pela estimulação das fibras do TS (Accorsi-Mendonça et al., 2015). Após a obtenção da configuração *whole-cell*, e no modo current-clamp, foram realizadas 15 séries de cinco estímulos do TS cada uma na frequência de 10 Hz e com intensidade de estímulo máxima. Utilizando este protocolo foi calculada a média do número de potenciais de ação evocados pela estimulação do TS.

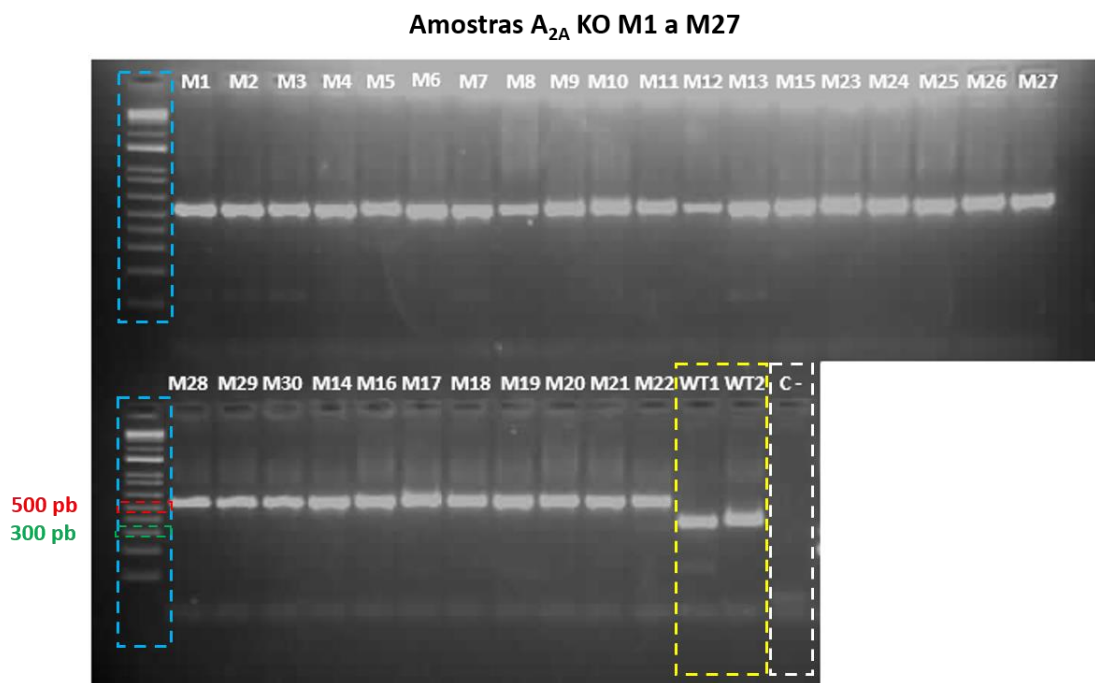
#### **4.8 Análise dos dados**

Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e apresentados em gráficos de dispersão de valores individuais. Os dados foram analisados utilizando a análise da variância de duas vias (two-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. One-way ANOVA foi utilizado apenas para a análise da PSVD. O teste qui-quadrado foi utilizado para comparar a proporção de neurônios silentes e neurônios com disparo espontâneo de potenciais de ação entre os grupos controle e HM. O nível de significância foi fixado em  $P < 0,05$ . Os gráficos e a análise estatística foram realizados por meio do programa GraphPad Prism (versão 8, GraphPad, La Jolla, CA, USA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Genotipagem para o camundongo C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc/J</sup>

A Figura 4 mostra os resultados referentes à genotipagem de 30 camundongos A<sub>2A</sub> KO (camundongos identificados de M1 a M30) fornecidos pelo CCCE, nos quais foram observadas bandas de géis de cerca de 550 bp para todos os camundongos knockouts, bandas de géis de cerca de 364 bp para os camundongos *wild-type*, e nenhuma marcação no controle negativo (C-; sem amostra), confirmando assim que os animais são mutantes homozigotos para o receptor do subtipo A<sub>2A</sub> da adenosina.

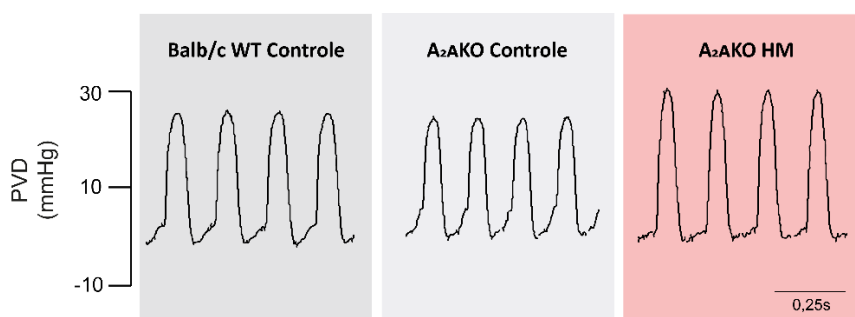


**Figura 4: Bandas de géis referentes à genotipagem das amostras de camundongos A<sub>2A</sub> KO M1 a M30.** A linha tracejada amarela destaca os resultados da genotipagem de 2 camundongos wild-types (WT1 e WT2). A linha tracejada branca destaca o controle negativo (C-). A linha tracejada azul destaca o marcador de peso molecular 1 kb plus. A linha tracejada vermelha destaca a banda de gel correspondente ao peso molecular de 500 pb e a linha tracejada verde destaca a banda de gel correspondente ao peso molecular de 300 pb.

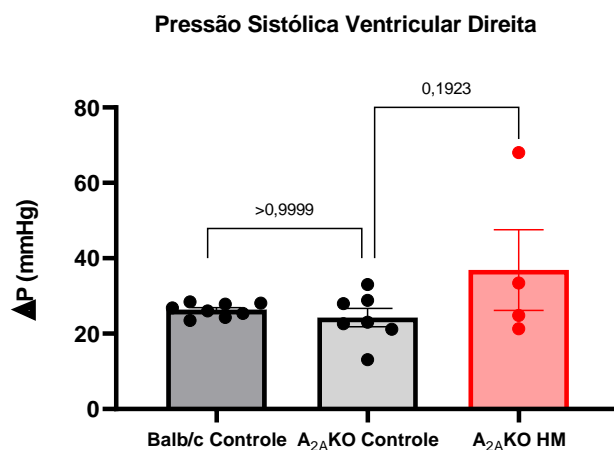


## 5.2 Pressão sistólica ventricular direita (PSVD) de camundongos C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc</sup>/J (A<sub>2A</sub>KO) mantidos em normóxia ou submetidos à HM

A Figura 5 mostra os traçados representativos dos sinais de pressão ventricular direita de um camundongo Balb/c WT controle (mantido em normóxia), um camundongo A<sub>2A</sub>KO controle (mantido em normóxia) e um camundongo A<sub>2A</sub>KO submetido à HM. Os camundongos dos grupos Balb/c WT controle (n=8), A<sub>2A</sub>KO controle (n=7) e A<sub>2A</sub>KO HM (n=4) apresentaram níveis similares de pressão sistólica ventricular direita ( $26 \pm 1$  vs  $24 \pm 2$ ,  $P > 0,9999$ ;  $36 \pm 10$  vs  $24 \pm 2$ ,  $P = 0,1923$ ; Figura 6).



**Figura 5: Traçados representativos dos registros da pressão ventricular direita.** Registros realizados em um camundongo Balb/c controle (mantido em normóxia; traçado marcado em cinza mais escuro), camundongo A<sub>2A</sub>KO controle (mantido em normóxia; traçado marcado em cinza mais claro) e camundongo A<sub>2A</sub>KO submetido à HM (traçado marcado em vermelho).



**Figura 6: Pressão sistólica ventricular direita ( $\Delta P$ ) de camundongos anestesiados.** Nos gráficos de barras são apresentados os valores individuais e médios de PSVD calculados a partir da diferença entre a pressão ventricular máxima e mínima para cada curva ( $\Delta P$ ) de camundongos Balb/c WT mantidos em normóxia (Balb/c controle; n = 8), camundongos A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia (A<sub>2A</sub>KO controle; n = 7) e camundongos A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (A<sub>2A</sub>KO HM; n = 4). Foi utilizado o teste one-way ANOVA para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.

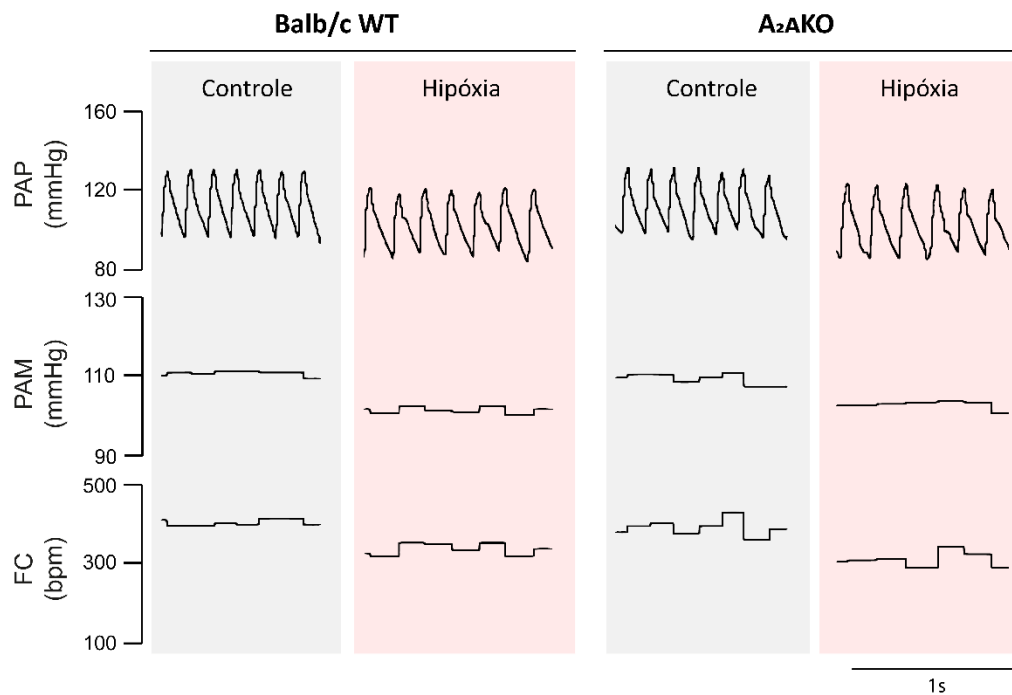
### **5.3 Efeitos da HM sobre os parâmetros cardiovasculares basais de camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT**

A Figura 7 mostra os traçados representativos dos parâmetros cardiovasculares de um camundongo Balb/c WT do grupo controle (mantido em normóxia), camundongo Balb/c WT submetido à HM, camundongo A<sub>2A</sub>KO do grupo controle (mantido em normóxia) e de um camundongo A<sub>2A</sub>KO submetido à HM. Os camundongos WT submetidos à HM [Balb/c WT HM (n=11)] apresentaram redução significativa na pressão arterial média (PAM;  $102 \pm 1$  vs  $109 \pm 2$  mmHg, P = 0,0172), pressão arterial diastólica (PAD;  $89 \pm 1$  vs  $95 \pm 2$  mmHg, P = 0,0101) e na frequência cardíaca (FC) basal ( $329 \pm 9$  vs  $441 \pm 17$  bpm, P < 0,0001) em comparação com seu grupo controle mantido em normóxia [Balb/c WT controle (n=11)]. No entanto, não houve alteração significativa na pressão arterial sistólica [(PAS;  $121 \pm 2$  vs  $125 \pm 2$  mmHg, P = 0,3650), Figura 8, Painéis A-D].

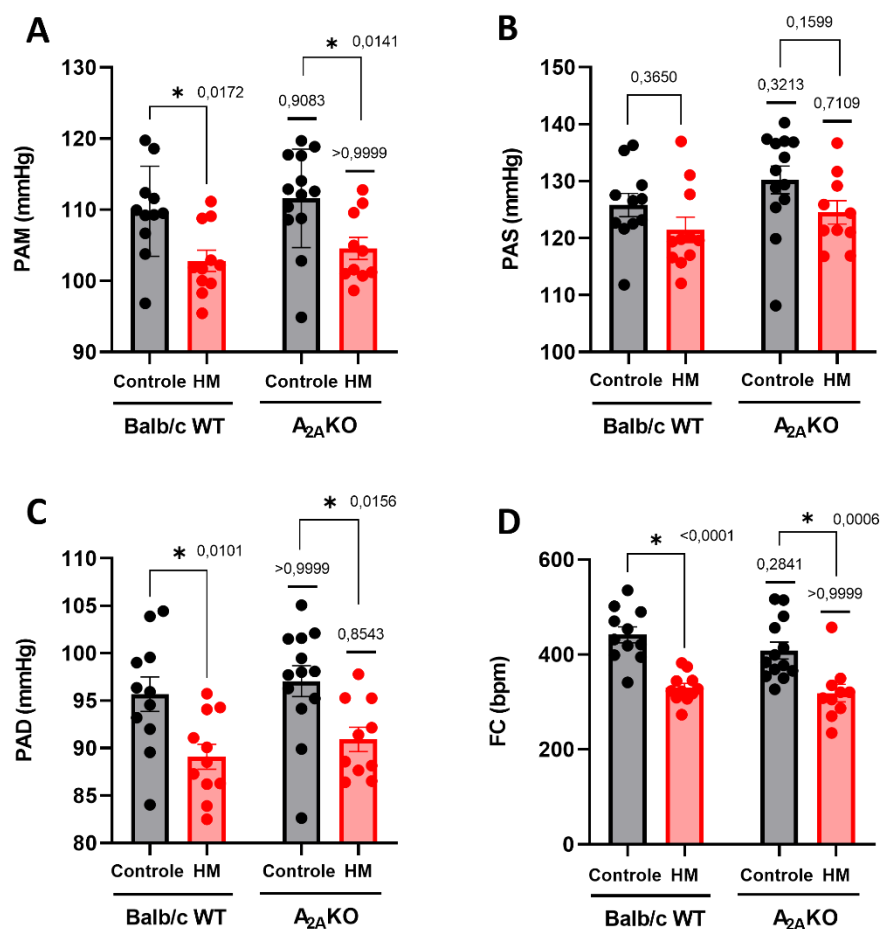
Os camundongos A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM [A<sub>2A</sub>KO HM (n=10)] apresentaram redução significativa na PAM ( $104 \pm 1$  vs  $111 \pm 2$  mmHg; P = 0,0141), PAD ( $90 \pm 1$  vs  $97 \pm 2$  mmHg; P = 0,0156) e FC [( $318 \pm 18$  vs  $408 \pm 17$  bpm; P = 0,0006) Figura 8, painéis A-D] quando comparados com os camundongos A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia [A<sub>2A</sub>KO controle (n=13)]. No entanto, não houve alteração significativa na pressão arterial sistólica [(PAS;  $124 \pm 2$  vs  $130 \pm 2$  mmHg, P = 0,1599), Figura 8, Painéis A-D].

Sob condições de normóxia, os camundongos A<sub>2A</sub>KO não apresentaram diferenças nos níveis de PAM ( $111 \pm 2$  vs  $109 \pm 2$  mmHg, P = 0,9083), PAS ( $130 \pm 2$  vs  $125 \pm 2$  mmHg, P = 0,3213), PAD ( $97 \pm 2$  vs  $95 \pm 2$  mmHg, P > 0,9999), e FC ( $408 \pm 17$  vs  $441 \pm 17$  bpm, P = 0,2841), quando comparados com seu controle genético (camundongos Balb/c WT). Nos grupos expostos à HM, os camundongos A<sub>2A</sub>KO não

apresentaram diferenças nos níveis de PAM ( $104 \pm 1$  vs  $102 \pm 1$  mmHg,  $P > 0,9999$ ), PAS ( $124 \pm 2$  vs  $121 \pm 2$  mmHg,  $P = 0,7109$ ), PAD ( $90 \pm 1$  vs  $89 \pm 1$  mmHg,  $P = 0,8543$ ), e FC ( $318 \pm 18$  vs  $329 \pm 9$  bpm,  $P > 0,9999$ ), quando comparados com seu controle genético [(camundongos Balb/c WT HM), Figura 8, Painéis A-D].



**Figura 7: Traçados representativos dos registros dos parâmetros cardiovasculares basais de um camundongo Balb/c WT mantido em normóxia (traçados à esquerda marcados em cinza), um camundongo Balb/c WT submetido à HM (traçados à esquerda marcados em vermelho), um camundongo A<sub>2A</sub>KO mantido em normóxia (traçados à direita marcados em cinza) e de um camundongo A<sub>2A</sub>KO submetido à HM (traçados à direita marcados em vermelho).** Na figura são mostrados os registros da pressão arterial pulsátil (PAP), adquiridos diretamente a partir da deformação do pulso na circulação arterial composto pela pressão arterial sistólica (PAS) e pela pressão arterial diastólica (PAD). Logo abaixo estão representados os traçados correspondentes aos registros da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), ambos derivados a partir dos registros da PAP.



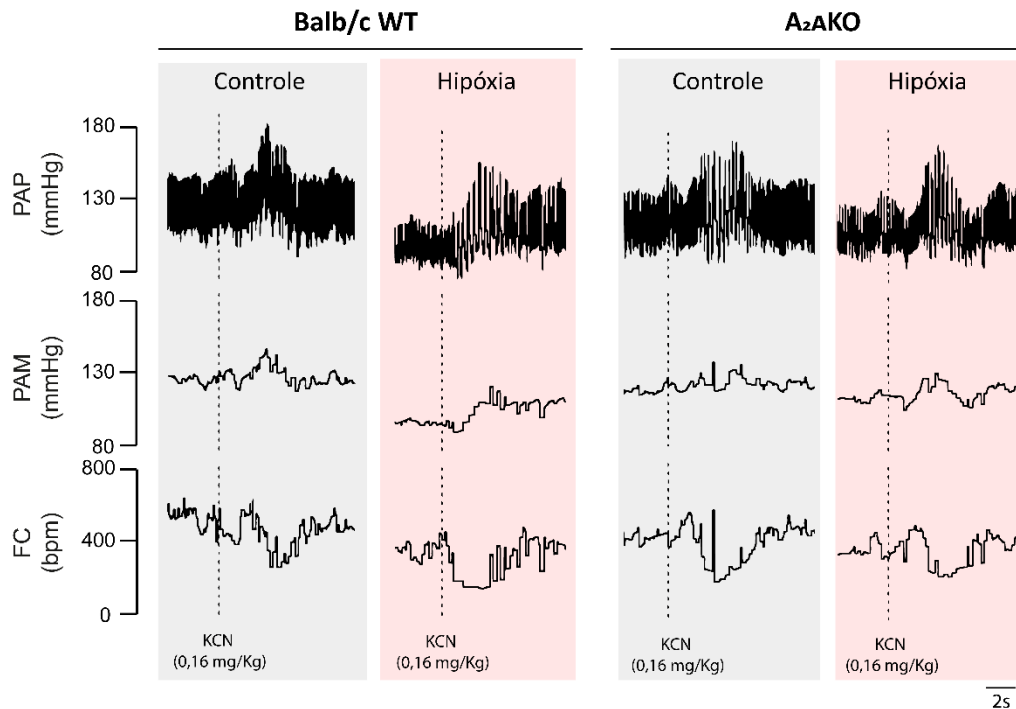
**Figura 8: Parâmetros cardiovasculares basais de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO não-anestesiados mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** Os gráficos de barras apresentam os valores individuais e médios da pressão arterial média (PAM, Painel A), pressão arterial sistólica (PAS, Painel B), pressão arterial diastólica (PAD, Painel C) e frequência cardíaca (FC, Painel D) de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 11), Balb/c WT submetidos à HM (n = 11), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 13) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 10). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados. \* Diferente do respectivo controle normóxia (P<0,05).

#### **5.4 Efeitos da HM sobre as respostas cardiovasculares à ativação dos quimiorreceptores periféricos com KCN em camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT**

A ativação dos quimiorreceptores periféricos foi realizada por meio da administração intravenosa de KCN (0,16 mg/Kg) e foram avaliadas as repostas de aumento da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e bradicardia ( $\Delta$ FC). A Figura 9 mostra os traçados representativos das repostas de elevação da PAM e bradicardia frente à injeção de KCN de um camundongo Balb/c WT do grupo controle (mantido em normóxia), camundongo Balb/c WT submetido à HM, camundongo A<sub>2A</sub>KO do grupo controle (mantido em normóxia) e de um camundongo A<sub>2A</sub>KO submetido à HM.

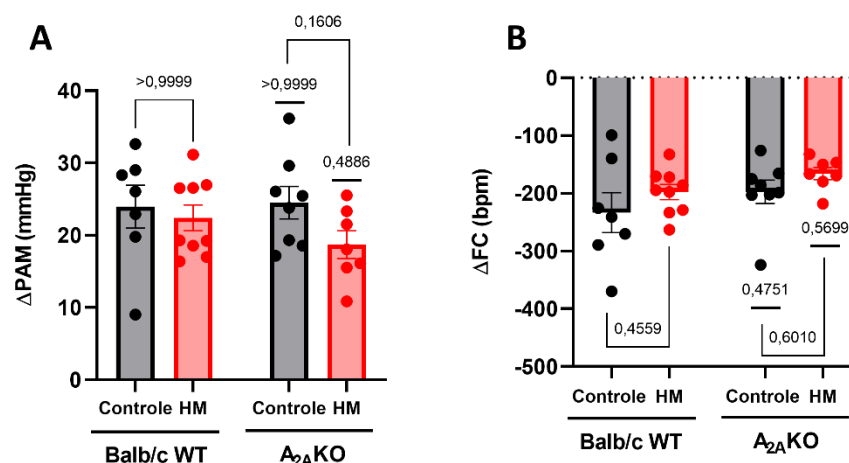
Os camundongos WT mantidos em normóxia [Balb/c WT controle (n=7)] e os camundongos WT submetidos à HM [Balb/c WT HM (n=9)] apresentaram repostas pressoras ( $22 \pm 2$  vs  $23 \pm 3$  mmHg,  $P > 0,9999$ ) e de bradicardia ( $-197 \pm 13$  vs  $-233 \pm 34$  bpm,  $P = 0,4559$ ) similares frente à ativação dos quimiorreceptores com KCN (Figura 10, painéis A e B). Os camundongos A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM [A<sub>2A</sub>KO HM (n=7)] apresentaram repostas pressoras ( $18 \pm 2$  vs  $24 \pm 2$  mmHg,  $P = 0,1606$ ) e de bradicardia ( $-166 \pm 10$  vs  $-197 \pm 20$  bpm,  $P = 0,6010$ ) similares aos camundongos A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia (n=8) frente à ativação quimiorreflexa com KCN (Figura 10, Painéis A e B).

Sob condições de normóxia, não houve diferenças nas repostas pressoras ( $24 \pm 2$  vs  $23 \pm 3$  mmHg,  $P > 0,9999$ ) e de bradicardia ( $-197 \pm 20$  vs  $-233 \pm 34$  bpm,  $P = 0,4751$ ) frente à ativação quimiorreflexa entre os camundongos A<sub>2A</sub>KO e seu controle genético Balb/c WT. Nos grupos expostos à HM, não houve diferenças nas repostas pressoras ( $18 \pm 2$  vs  $22 \pm 2$  mmHg,  $P = 0,4886$ ) e de bradicardia ( $-166 \pm 10$  vs  $-197 \pm 20$  bpm,  $P = 0,5699$ ) frente à ativação quimiorreflexa entre os camundongos A<sub>2A</sub>KO e seu controle genético [(camundongos Balb/c WT HM (Figura 10, Painéis A e B)].



25

**Figura 9:** Traçados representativos das respostas de elevação da pressão arterial e de bradicardia frente à ativação do quimiorreflexo com KCN (0,16 mg/Kg) de um camundongo Balb/c WT mantido em normóxia (traçados à esquerda marcados em cinza), um camundongo Balb/c WT submetido à HM (traçados à esquerda marcados em vermelho), um camundongo A<sub>2A</sub>KO mantido em normóxia (traçados à direita marcados em cinza) e de um camundongo A<sub>2A</sub>KO submetido à HM (traçados à direita marcados em vermelho). A porção superior da figura ilustra os traçados referentes aos registros da pressão arterial pulsátil (PAP), medida direta a partir da deformação do pulso na circulação arterial composto pela pressão arterial sistólica (PAS) e pela pressão arterial diastólica (PAD). Logo abaixo estão representados os traçados correspondentes aos registros da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), ambos derivados a partir dos registros da PAP. A linha pontilhada indica o momento da administração do KCN via cateter da jugular. Os traçados logo após a administração do KCN correspondem às respostas cardiovasculares frente à ativação dos quimiorreceptores periféricos.



**Figura 10: Respostas cardiovasculares à ativação dos quimiorreceptores periféricos com KCN (0,16 mg/Kg; iv) em camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO não-anestesiados mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** Os gráficos de barras apresentam os valores individuais e médios das respostas de elevação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, Painel A) e redução da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, Painel B) frente à ativação dos quimiorreceptores de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 7), Balb/c WT submetidos à HM (n = 9), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 8) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 7). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.

## 5.5 Efeitos da HM sobre os parâmetros respiratórios basais, gasometria, parâmetros bioquímicos e eletrólitos no sangue arterial de camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT

### 5.5.1 Parâmetros respiratórios basais

A Figura 11 mostra os traçados representativos da ventilação basal de um camundongo Balb/c WT do grupo controle (sob condição de normóxia), camundongo Balb/c WT após exposição à HM, camundongo A<sub>2A</sub>KO do grupo controle (sob condição de normóxia) e de um camundongo A<sub>2A</sub>KO após exposição à HM. Após a HM, os camundongos WT [Balb/c WT HM (n=8)] apresentaram aumento significativo na frequência respiratória [ $f_R$  ( $244 \pm 12$  vs  $184 \pm 4$  rpm;  $P < 0,0001$ )] e na ventilação pulmonar [ $V_E$  ( $5546 \pm 596$  vs  $3446 \pm 245$  ml kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>;  $P = 0,0289$ )] em comparação com seu controle normóxia [Balb/c WT controle (n=8)]. No entanto, não foram observadas alterações no volume corrente [ $V_T$  ( $23 \pm 2$  vs  $18 \pm 1$  ml kg<sup>-1</sup>,  $P = 0,4612$ )],

Figura 12, painéis A-C]. Após a HM, os camundongos A<sub>2</sub>A KO [A<sub>2</sub>A KO HM (n=10)] apresentaram aumento significativo no volume corrente [ $V_T$  ( $27 \pm 3$  vs  $19 \pm 1$  ml kg<sup>-1</sup>,  $P = 0,0287$ )] em comparação com seu controle normóxia [A<sub>2</sub>A KO controle (n=11)]. No entanto, não foram observadas alterações significativas na frequência respiratória [ $f_R$  ( $230 \pm 7$  vs  $241 \pm 8$  rpm;  $P = 0,6458$ )] e na ventilação pulmonar [ $V_E$  ( $6144 \pm 770$  vs  $4532 \pm 312$  ml kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>;  $P = 0,06$ )], Figura 12, Painéis A-C].

Antes da exposição à HM (controle normóxia), o volume corrente ( $19 \pm 1$  vs  $18 \pm 1$  ml kg<sup>-1</sup>,  $P > 0,9999$ ) e a ventilação pulmonar ( $4532 \pm 312$  vs  $3446 \pm 245$  ml kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>;  $P = 0,3199$ ) foram semelhantes entre os camundongos A<sub>2</sub>A KO e os seus respectivos controles genéticos (camundongos Balb/c WT). No entanto, os camundongos A<sub>2</sub>A KO apresentaram frequência respiratória ( $241 \pm 8$  vs  $184 \pm 4$  rpm;  $P < 0,0001$ ) significativamente maior em comparação com seu controle genético. Após a HM, não foram observadas diferenças na frequência respiratória ( $230 \pm 7$  vs  $244 \pm 12$  rpm;  $P = 0,4883$ ), no volume corrente ( $27 \pm 3$  vs  $23 \pm 2$  ml kg<sup>-1</sup>,  $P = 0,5342$ ) e na ventilação pulmonar ( $6144 \pm 770$  vs  $5546 \pm 596$  ml kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>;  $P = 0,8870$ ) entre os camundongos A<sub>2</sub>A KO e os seus respectivos controles genéticos Balb/c WT (Figura 12, Painéis A-C).

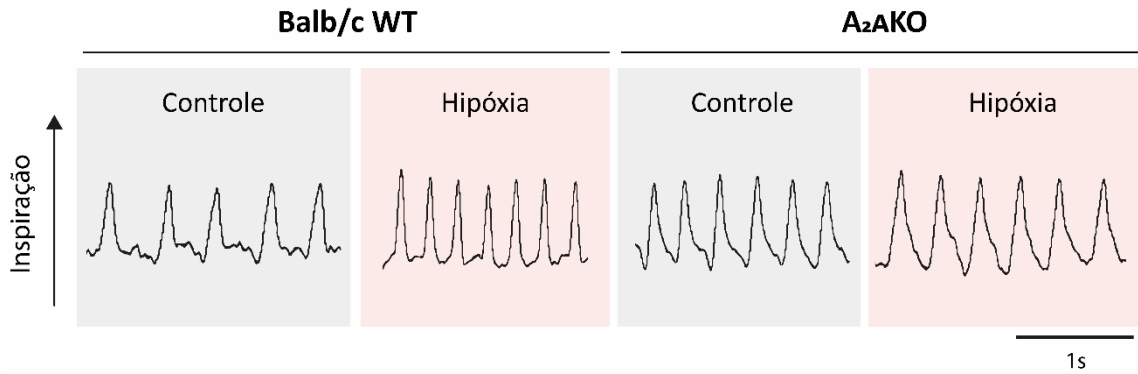
### 5.5.2 Gasometria e parâmetros bioquímicos no sangue arterial

Com relação aos resultados das análises de gasometria e parâmetros bioquímicos do sangue arterial, após a HM os camundongos WT [Balb/c WT HM (n=8)] apresentaram redução significativa na pressão parcial de CO<sub>2</sub> [pCO<sub>2</sub>, ( $23 \pm 1$  vs  $32 \pm 1$  mmHg;  $P < 0,0001$ )] e na concentração de bicarbonato plasmático [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ( $14 \pm 1$  vs  $20 \pm 0,6$  mmol/L;  $P < 0,0001$ )] em comparação com seu controle normóxia [Balb/c WT controle (n=8)]. Além disso, foi observado aumento significativo na pressão parcial de oxigênio (pO<sub>2</sub>;  $100 \pm 3$  vs  $88 \pm 3$  mmHg,  $P = 0,0034$ ) e na saturação de oxigênio (sO<sub>2</sub>;  $97 \pm 0,36$  vs  $96 \pm 0,32$  %,  $P = 0,0091$ ). O pH sanguíneo ( $7,4 \pm 0,02$  vs  $7,4 \pm 0,01$ ,  $P > 0,9999$ ) e a concentração de lactato ( $1,23 \pm 0,31$  vs  $0,86 \pm 0,08$  mmol/L,  $P > 0,9999$ ) no sangue arterial foram semelhantes nos camundongos WT antes e após a HM (Figura 13, Painéis A-F).

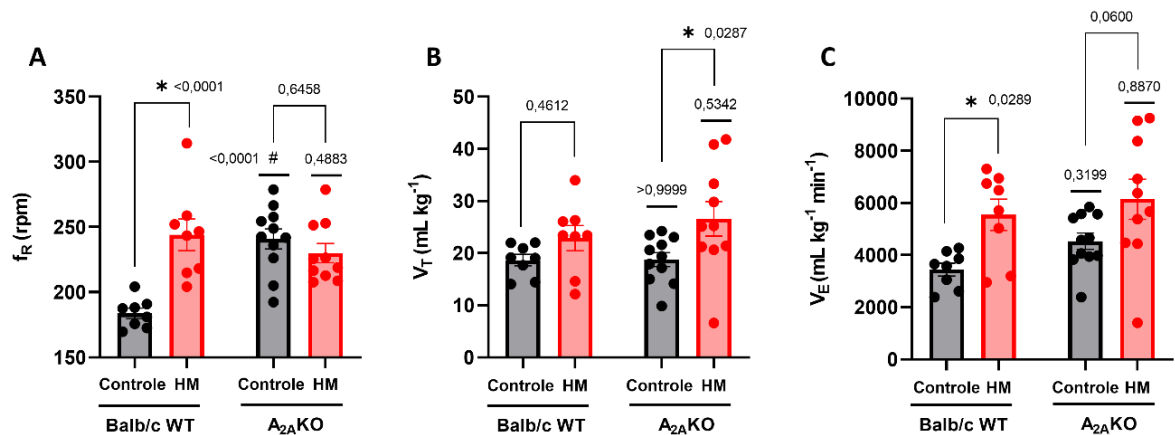


Após a HM, os camundongos A<sub>2A</sub>KO [A<sub>2A</sub>KO HM (n=10)] apresentaram redução significativa na pressão parcial de CO<sub>2</sub> [pCO<sub>2</sub>, (24 ± 0,8 vs 32 ± 0,5 mmHg; P < 0,0001)] e na concentração de bicarbonato plasmático [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (16 ± 1 vs 21 ± 0,4 mmol/L; P < 0,0001)] em comparação com seu controle normóxia [A<sub>2A</sub>KO controle (n=11)]. Além disso, foi observado aumento significativo na pressão parcial de oxigênio (pO<sub>2</sub>; 105 ± 2 vs 90 ± 1 mmHg, P = 0,0002) e na saturação de oxigênio (sO<sub>2</sub>; 98 ± 0,1 vs 97 ± 0,1 %, P = 0,0132). O pH sanguíneo (7,43 ± 0,02 vs 7,43 ± 0, P > 0,9999) e a concentração de lactato (1,3 ± 0,1 vs 1 ± 0,09 mmol/L, P = 0,3699) no sangue arterial foram semelhantes nos camundongos A<sub>2A</sub>KO antes e após a HM (Figura 13, Painéis A-F).

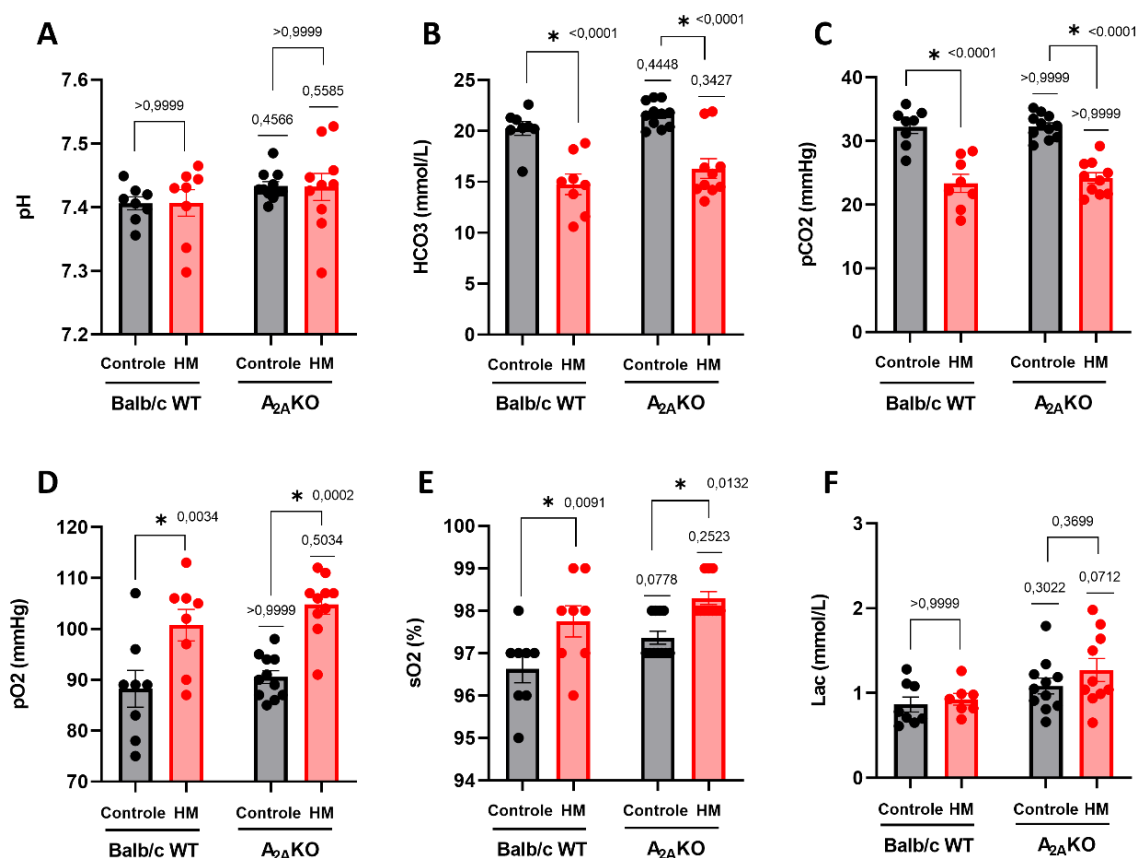
Antes da exposição à HM (controle normóxia), os camundongos A<sub>2A</sub>KO não apresentaram diferenças no pH sanguíneo (7,43 ± 0 vs 7,4 ± 0,01, P = 0,4566), pCO<sub>2</sub> (32 ± 0,5 vs 32 ± 1 mmHg; P > 0,9999), concentração de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (21 ± 0,4 vs 20 ± 0,6 mmol/L; P = 0,4448), pO<sub>2</sub> (90 ± 1 vs 88 ± 3 mmHg; P > 0,9999), sO<sub>2</sub> (97 ± 0,1 vs 96 ± 0,32 %, P = 0,0778), e concentração de lactato (1 ± 0,09 vs 0,86 ± 0,08 mmol/L, P = 0,3022) quando comparados com seu controle genético, os camundongos Balb/c WT. De forma semelhante, após a exposição à HM os valores de pH sanguíneo (7,43 ± 0,02 vs 7,4 ± 0,02, P = 0,5585), pCO<sub>2</sub> (24 ± 0,8 vs 23 ± 1 mmHg; P > 0,9999), concentração de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (16 ± 1 vs 14 ± 1 mmol/L, P = 0,3427), pO<sub>2</sub> (105 ± 2 vs 100 ± 3 mmHg; P = 0,5034), sO<sub>2</sub> (98 ± 0,1 vs 97 ± 0,36 %, P = 0,2523), e concentração de lactato (1,3 ± 0,1 vs 1,23 ± 0,31 mmol/L, P = 0,0712) não foram diferentes entre os camundongos A<sub>2A</sub>KO e os camundongos Balb/c WT (Figura 13, Painéis A-F).



**Figura 11: Traçados representativos dos registros da ventilação pulmonar.** Registros realizados em um camundongo Balb/c WT mantido em normóxia (traçado à esquerda marcado em cinza), um camundongo Balb/c WT submetido à HM (traçado à esquerda marcado em rosa), um camundongo  $A_{2A}KO$  mantido em normóxia (traçado à direita marcado em cinza) e de um camundongo  $A_{2A}KO$  submetido à HM (traçado à direita marcado em rosa).



**Figura 12: Parâmetros respiratórios básicos de camundongos Balb/c WT e  $A_{2A}KO$  não-anestesiados antes e após a HM.** Os gráficos de barras apresentam os valores individuais e médios de frequência respiratória ( $f_R$  – Painel A), volume corrente ( $V_T$  – Painel B) e ventilação pulmonar ( $V_E$  – Painel C) de camundongos Balb/c WT antes (grupo controle,  $n = 8$ ) e após a HM (grupo HM,  $n = 8$ ), e camundongos  $A_{2A}KO$  antes (grupo controle,  $n = 11$ ) e após a HM (grupo HM,  $n = 10$ ). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados. \* Diferente do respectivo controle normóxia ( $P < 0,05$ ). # Diferente do respectivo controle genético ( $P < 0,05$ ).



**Figura 13: Gases sanguíneos e parâmetros bioquímicos no sangue arterial de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO não-anestesiados antes e após a HM.** Os gráficos de barras apresentam os valores individuais e médios de pH sanguíneo (Painel A), concentração de bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Painel B), pressão parcial de dióxido de carbono (pCO<sub>2</sub>, Painel C), pressão parcial de oxigênio (pO<sub>2</sub> – Painel D), saturação de oxigênio (sO<sub>2</sub>, Painel E) e concentração de lactato (Lac, Painel F) no sangue arterial de camundongos Balb/c WT antes (grupo controle, n = 8) e após a HM (grupo HM, n = 8), e camundongos A<sub>2A</sub>KO antes (grupo controle, n = 11) e após a HM (grupo HM, n = 10). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados. \* Diferente do respectivo controle normóxia (P<0,05).

## **5.6 Efeitos da HM sobre a atividade sináptica de neurônios do NTS de camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT**

### 5.6.1 Efeitos da HM sobre as propriedades passivas de neurônios do NTS de camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT

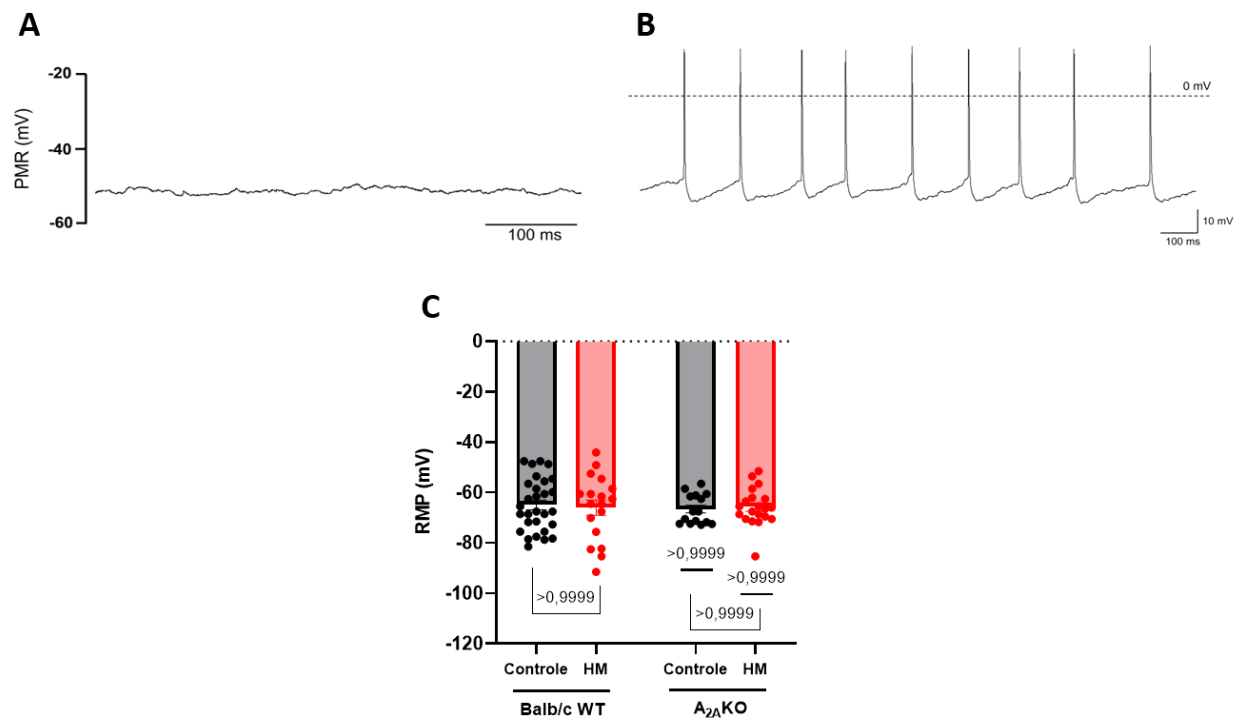
As características da membrana dos neurônios do NTS de camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT mantidos em normóxia ou submetidos à HM foram avaliadas inicialmente por meio do estudo das propriedades passivas da membrana desses neurônios. A Figura 14 mostra os traçados representativos do registro do potencial de membrana em repouso de um neurônio do NTS classificado como silente (Painel A), por não apresentar disparo de potencial de ação em condições basais, e de um neurônio com disparo espontâneo de potenciais de ação (Painel B). Dentro desse conjunto de neurônios silentes e com disparos espontâneos registrados não foram observadas alterações no potencial de membrana em repouso (RMP;  $-65 \pm 3$  vs  $-64 \pm 2$  mV,  $P > 0,9999$ ) dos neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT submetidos à HM [Balb/c WT HM (n = 18)] em comparação com seu grupo controle mantido em normóxia [Balb/c WT controle (n = 29)]. De forma semelhante, os neurônios do NTS de camundongos A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM [A<sub>2A</sub>KO HM (n = 20)] não apresentaram alterações no RPM ( $-65 \pm 1$  vs  $-66 \pm 1$  mV,  $P > 0,9999$ ) quando comparados com os neurônios do NTS de camundongos A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia [A<sub>2A</sub>KO controle (n = 15)]. Tanto na condição de normóxia ( $-66 \pm 1$  vs  $-64 \pm 2$  mV,  $P > 0,9999$ ) quanto de HM ( $-65 \pm 1$  vs  $-65 \pm 3$  mV,  $P > 0,9999$ ) o RPM foi semelhante entre os neurônios do NTS de camundongos A<sub>2A</sub>KO e seus respectivos controles genéticos Balb/c WT (Figura 14, Painel C).

Foram analisadas as proporções de neurônios silentes e com disparo espontâneo de potenciais de ação (Figura 15, Painel A) e o teste qui-quadrado foi utilizado para comparar os grupos experimentais. De maneira geral, este teste permite avaliar se as proporções observadas de determinados eventos (neste caso neurônios silentes ou com disparo espontâneo) presentes em diferentes amostras (neste caso nos grupos de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM) mostram ou não diferenças significativas. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas na proporção de neurônios silentes e com disparo

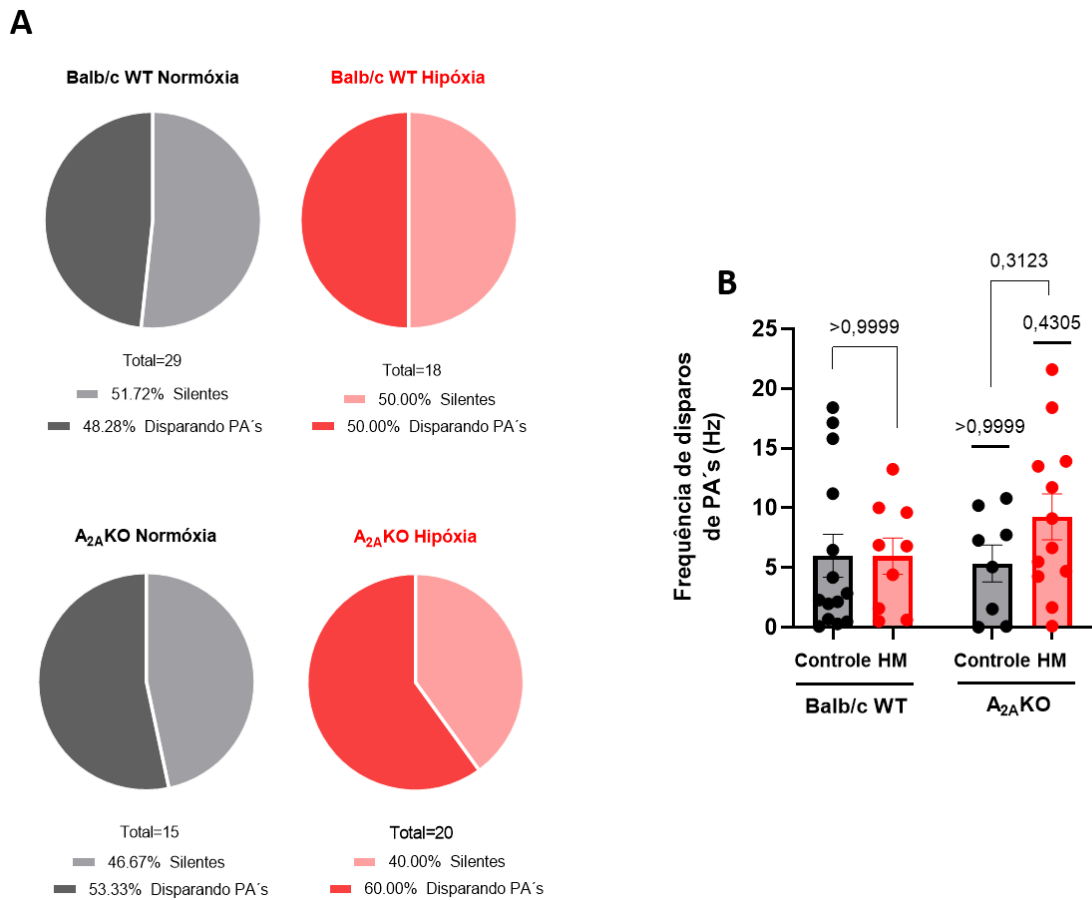
espontâneo entre os grupos Balb/c WT mantidos em normóxia e Balb/c WT expostos à HM ( $P = 0,91$ ). De forma semelhante, a proporção de neurônios silentes e com disparo espontâneo não foi diferente entre os camundongos  $A_{2A}KO$  mantidos em normóxia e aqueles submetidos à HM ( $P = 0,69$ ). Tanto na condição de normóxia ( $P = 0,92$ ) quanto de HM ( $P = 0,54$ ) também não foram observadas diferenças na proporção de neurônios silentes e com disparo espontâneo entre os camundongos  $A_{2A}KO$  e seus respectivos controles genéticos Balb/c WT.

Dentro do grupo de neurônios com disparo espontâneo foi avaliada a frequência de disparos de potenciais de ação (PA's). No entanto, não houve diferença significativa na frequência de disparos de PA's ( $6 \pm 1$  vs  $6 \pm 1$  Hz,  $P > 0,9999$ ) entre os camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia;  $n = 14$ ) e Balb/c HM ( $n = 9$ ). Os camundongos  $A_{2A}KO$  mantidos em normóxia ( $n = 8$ ) e submetidos à HM ( $n = 12$ ) apresentaram frequência de disparo de PA's semelhantes ( $9 \pm 1$  vs  $5 \pm 1$  Hz,  $P = 0,3123$ ). Tanto na condição de normóxia ( $5 \pm 1$  vs  $6 \pm 1$  Hz,  $P > 0,9999$ ) quanto de HM ( $9 \pm 1$  vs  $6 \pm 1$  Hz,  $P = 0,4305$ ) também não foram observadas diferenças na frequência de disparo de PA's entre os camundongos  $A_{2A}KO$  e seus respectivos controles genéticos Balb/c WT (Figura 15, Painel B).

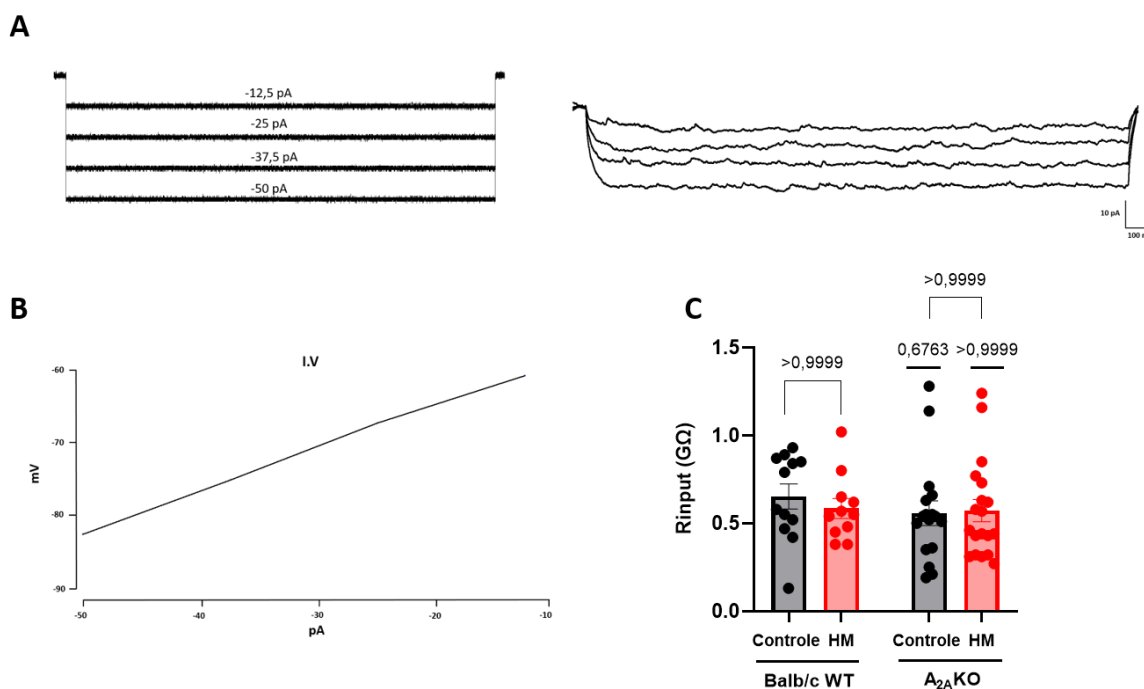
A resistência de entrada da membrana ( $R_{input}$ ;  $0,58 \pm 0,05$  vs  $0,65 \pm 0,07$  G $\Omega$ ,  $P > 0,9999$ ) calculada a partir da relação entre corrente injetada e voltagem da membrana (gráfico V x I; Figura 16, Painéis A e B) foi semelhante entre os neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controles ( $n = 12$ ) e Balb/c WT submetidos à HM ( $n = 11$ ). Os camundongos  $A_{2A}KO$  submetidos à HM ( $n=19$ ) não apresentaram diferenças nos valores de  $R_{input}$  ( $0,57 \pm 0,06$  vs  $0,55 \pm 0,07$  G $\Omega$ ,  $P > 0,9999$ ) quando comparados com seus controles  $A_{2A}KO$  mantidos normóxia ( $n = 17$ ). Tanto na condição de normóxia ( $0,55 \pm 0,07$  vs  $0,65 \pm 0,07$  G $\Omega$ ,  $P = 0,6763$ ) quanto de HM ( $0,57 \pm 0,06$  vs  $0,58 \pm 0,05$  G $\Omega$ ,  $P > 0,9999$ ) também não foram observadas diferenças na  $R_{input}$  entre os camundongos  $A_{2A}KO$  e seus respectivos controles genéticos Balb/c WT (Figura 16, Painel C).



**Figura 14: Potencial de membrana em repouso de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** A figura mostra os traçados representativos do registro do potencial de membrana em repouso de um neurônio silente (Painel A) e de um neurônio com disparo espontâneo de potenciais de ação (Painel B). Na parte inferior são apresentados gráficos de barras com os valores individuais e médios do potencial de membrana em repouso (RMP; Painel C) de neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 29), Balb/c WT submetidos à HM (n = 18), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 15) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 20). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.



**Figura 15: Relação percentual de neurônios do NTS silentes e com disparo espontâneo de potenciais de ação (PA's) nos grupos de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** A figura mostra a proporção de neurônios silentes e de neurônios com disparo espontâneo de potenciais de ação dentro de cada grupo experimental (Painel A). O Painel B apresenta gráficos de barras com os valores individuais e médios da frequência de disparos de PA's em neurônios com disparo espontâneo de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 14), Balb/c WT submetidos à HM (n = 9), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 8) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 12). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.



**Figura 16: Resistência de entrada da membrana de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e  $A_{2A}KO$  mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** A figura mostra um traçado representativo (traçado à direita; Painel A) do protocolo de injeção de correntes negativas (-12,4; -25; -37,5; -50 pA) e um traçado representativo (traçado à esquerda; Painel A) das alterações no potencial de membrana da célula em resposta à injeção das correntes negativas. O Painel B ilustra a relação entre corrente injetada e voltagem da membrana (gráfico V x I), a qual foi utilizada para calcular a resistência de entrada da célula ( $R_{input}$ ). O Painel C apresenta gráficos de barras com os valores individuais e médios de  $R_{input}$  de neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 12), Balb/c WT submetidos à HM (n = 11),  $A_{2A}KO$  controles (mantidos em normóxia; n = 17) e  $A_{2A}KO$  submetidos à HM (n = 19). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.

### 5.6.2 Efeitos da HM sobre as propriedades ativas de neurônios do NTS de camundongos $A_{2A}KO$ e Balb/c WT

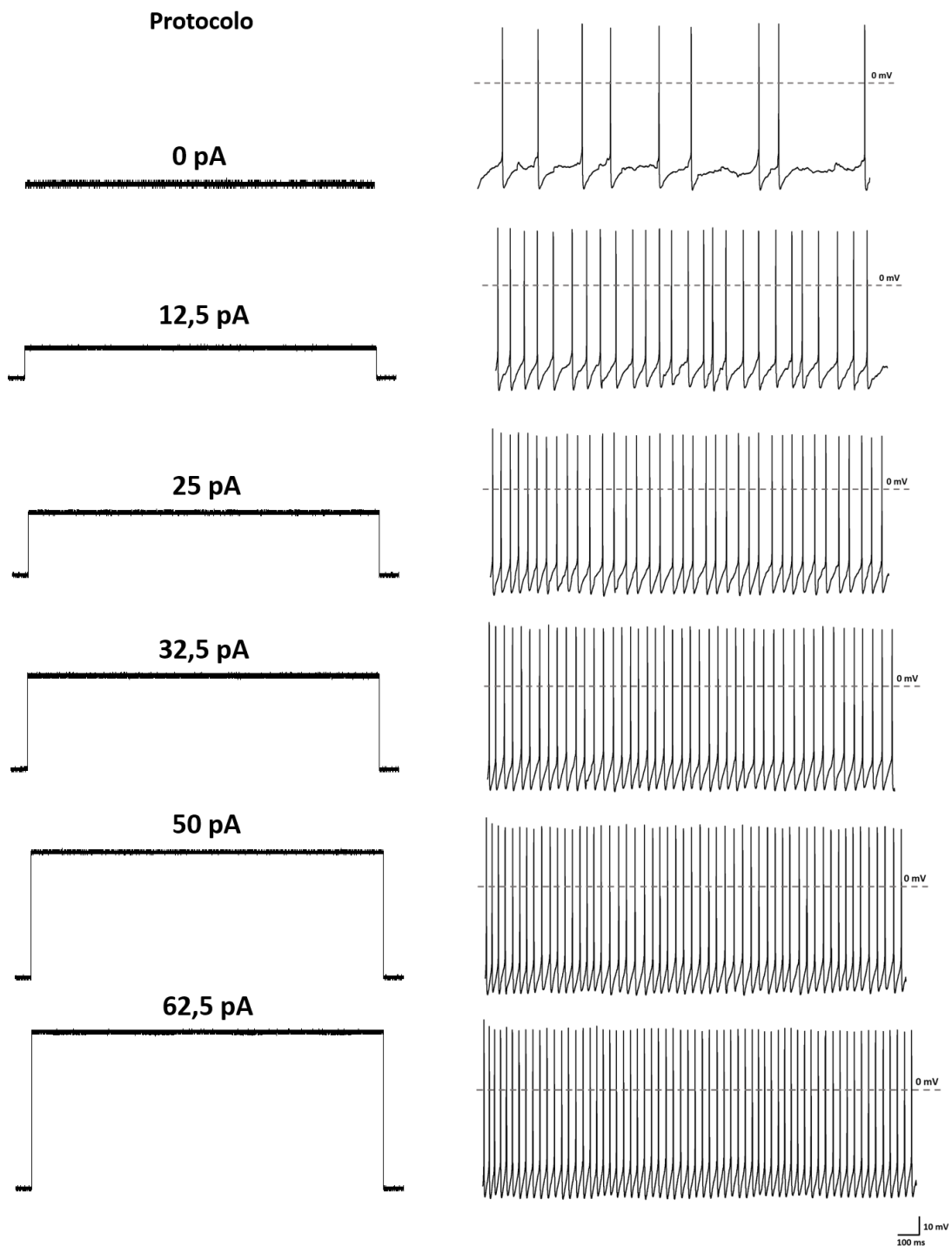
As propriedades ativas da membrana dos neurônios do NTS de camundongos  $A_{2A}KO$  e Balb/c WT mantidos em normóxia ou submetidos à HM foram avaliadas por meio da injeção de correntes despolarizantes de amplitudes crescentes. Nesse protocolo foi avaliado o disparo de potenciais de ação em resposta a cada uma dessas correntes injetadas, conforme protocolo ilustrado na Figura 17. Os neurônios



registrados foram divididos em 1) silentes, sendo aqueles que não apresentaram disparo de potenciais de ação na condição basal (0 pA de corrente injetada), e 2) neurônios com disparo espontâneo de potenciais de ação na condição basal (Figura 18, Painéis A e B). Além disso, para cada neurônio os dados foram normalizados pelo número máximo de potenciais de ação disparados, de forma que os valores apresentados nas Tabelas 2 e 3 representam a porcentagem média de potenciais de ação disparados de cada grupo experimental.

No grupo de neurônios silentes a exposição à HM não alterou o disparo de potenciais de ação em resposta ao aumento na amplitude das correntes injetadas tanto nos animais Balb/c WT (Balb/c WT controle; n = 7 vs Balb/c WT HM; n = 4) quanto nos animais A<sub>2A</sub>KO (A<sub>2A</sub>KO controle; n = 9 vs A<sub>2A</sub>KO HM; n = 9). De forma semelhante, tanto na condição de normóxia quanto na de HM o disparo de potenciais de ação em resposta ao aumento na amplitude das correntes injetadas não foi diferente entre os animais A<sub>2A</sub>KO e seus respectivos controles genéticos Balb/c WT (A<sub>2A</sub>KO controle vs Balb/c WT controle e A<sub>2A</sub>KO HM vs Balb/c WT HM; Figura 18, Painel A).

Com relação ao grupo de neurônios com disparo espontâneo, em condições basais, nas quais nenhuma amplitude de corrente foi injetada (0 pA), os camundongos A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 4) apresentaram porcentagem média de disparo de potenciais de ação significativamente maiores (P = 0,0001) quando comparados com seus controles normóxia, os camundongos do grupo A<sub>2A</sub>KO controle (n = 4), e quando comparados com seus controles genéticos, os camundongos do grupo Balb/c WT HM (n = 5; P = 0,006). No entanto, em resposta ao aumento na amplitude das correntes injetadas não houve alterações significativas no disparo de potenciais de ação nos grupos expostos à HM quando comparados com seus controles normóxia (Balb/c WT controle; n = 6 vs Balb/c WT HM e A<sub>2A</sub>KO controle vs A<sub>2A</sub>KO HM). Tanto de condição de normóxia quanto na de HM o disparo de potenciais de ação em resposta ao aumento na amplitude das correntes injetadas não foi diferente entre os animais A<sub>2A</sub>KO e seus respectivos controles genéticos Balb/c WT (A<sub>2A</sub>KO controle vs Balb/c WT controle e A<sub>2A</sub>KO HM vs Balb/c WT HM; Figura 18, Painel B).



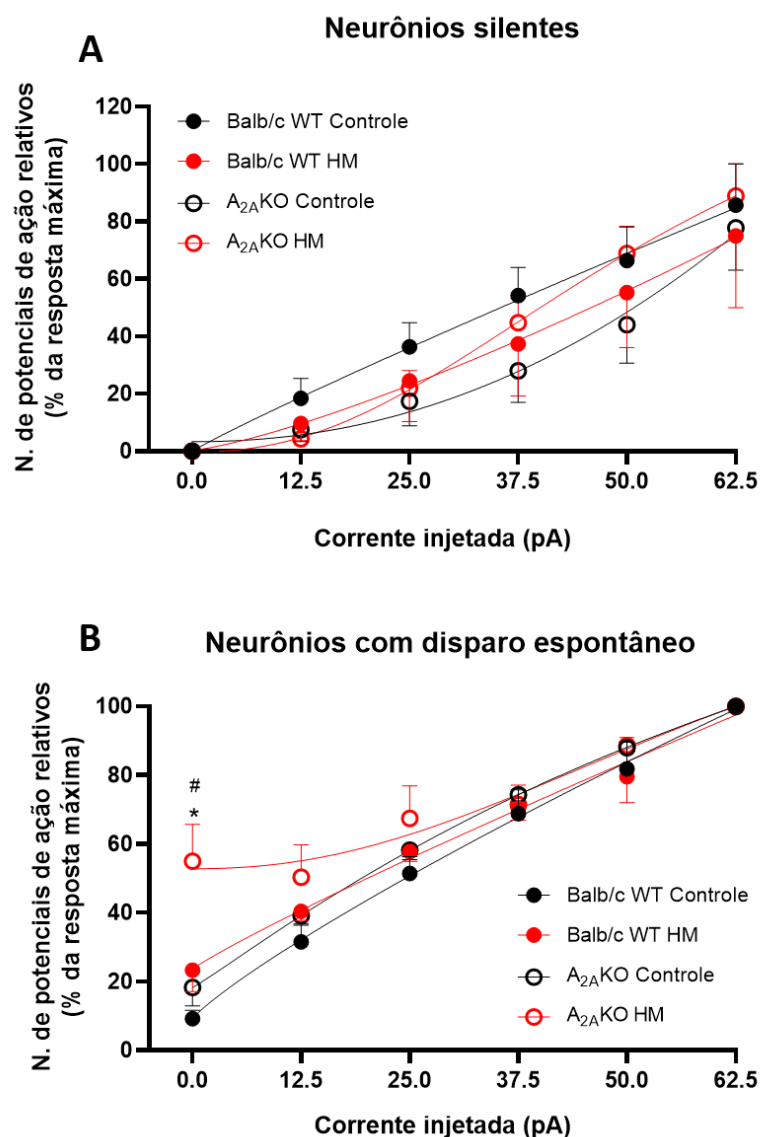
**Figura 17: Traçados representativos do protocolo de análise das propriedades ativas de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e  $A_{2A}$ KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** No lado esquerdo da figura são ilustrados os traçados representativos do disparo de potenciais de ação de um neurônio do NTS em resposta às correntes injetadas. No lado direito, os traçados representativos do protocolo de injeção de correntes despolarizantes (positivas; +12,5; +25; +37,5; +50 e +62,5 pA). No lado esquerdo da figura são ilustrados os traçados representativos do disparo de potenciais de ação de um neurônio do NTS em resposta às correntes injetadas.

**Tabela 2:** Média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de disparos de potenciais de ação de neurônios silentes do NTS de cada grupo experimental em resposta à injeção de correntes despolarizantes.

Grupo experimental	0 pA	12,5 pA	25 pA	32,5 pA	50 pA	62,5 pA
Balb/c WT Controle	0 $\pm$ 0	18 $\pm$ 7	36 $\pm$ 8	54 $\pm$ 9	66 $\pm$ 11	85 $\pm$ 14
Balb/c WT HM	0 $\pm$ 0	9 $\pm$ 6	24 $\pm$ 15	37 $\pm$ 18	55 $\pm$ 19	75 $\pm$ 25
A <sub>2A</sub> KO Controle	0 $\pm$ 0	7 $\pm$ 4	17 $\pm$ 8	28 $\pm$ 11	44 $\pm$ 13	77 $\pm$ 14
A <sub>2A</sub> KO HM	0 $\pm$ 0	4 $\pm$ 2	22 $\pm$ 6	44 $\pm$ 8	68 $\pm$ 9	88 $\pm$ 11

**Tabela 3:** Média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de disparos de potenciais de ação de neurônios com disparo espontâneos no NTS de cada grupo experimental em resposta à injeção de correntes despolarizantes.

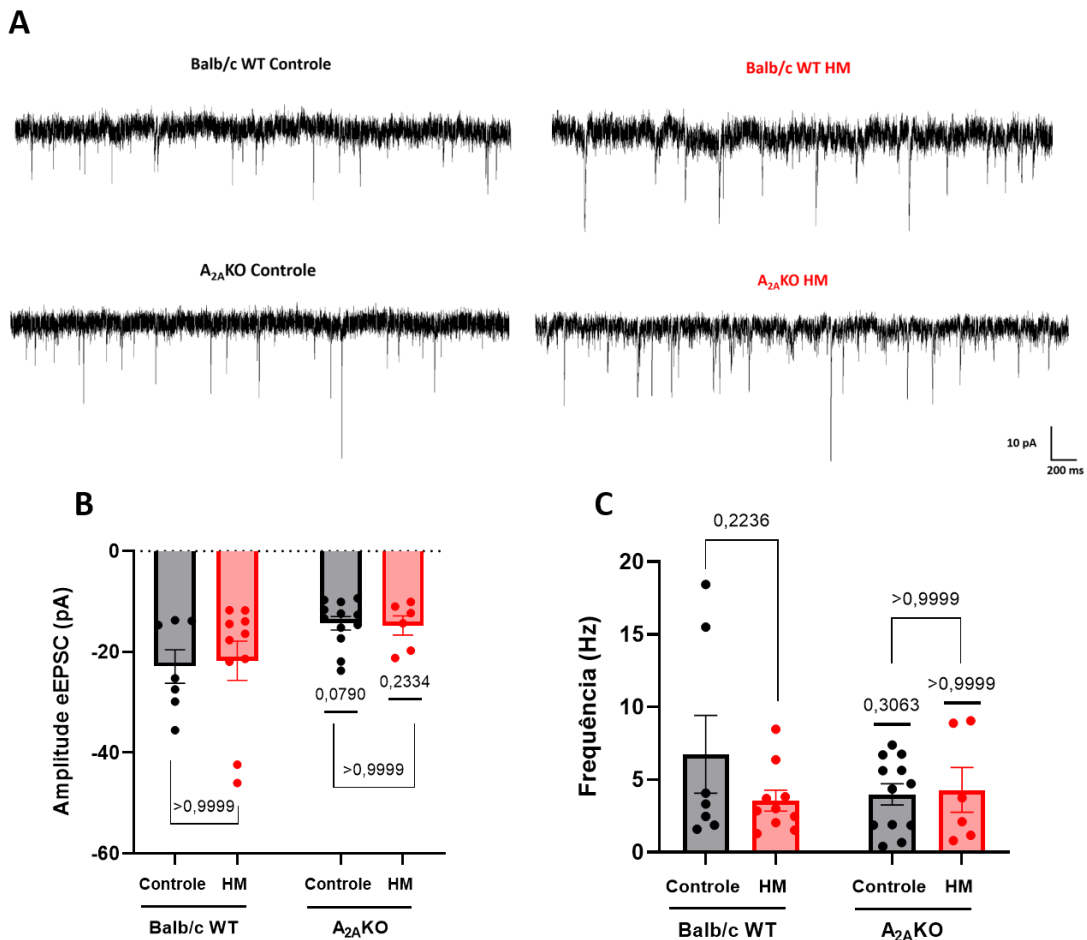
Grupo experimental	0 pA	12,5 pA	25 pA	32,5 pA	50 pA	62,5 pA
Balb/c WT Controle	9 $\pm$ 2	31 $\pm$ 5	51 $\pm$ 5	68 $\pm$ 7	81 $\pm$ 7	100 $\pm$ 0
Balb/c WT HM	23 $\pm$ 6	40 $\pm$ 2	57 $\pm$ 3	70 $\pm$ 3	79 $\pm$ 7	100 $\pm$ 0
A <sub>2A</sub> KO Controle	18 $\pm$ 5	39 $\pm$ 2	58 $\pm$ 2	74 $\pm$ 3	87 $\pm$ 2	100 $\pm$ 0
A <sub>2A</sub> KO HM	54 $\pm$ 10	50 $\pm$ 9	67 $\pm$ 9	71 $\pm$ 5	88 $\pm$ 2	100 $\pm$ 0



**Figura 18: Disparo de potenciais de ação de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM em resposta à injeção de correntes despolarizantes.** O Painel A da figura apresenta os valores médios do número relativo de potenciais de ação disparados (valores expressos em porcentagem da resposta máxima) para cada amplitude de corrente despolarizante injetada em neurônios silentes do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 7), Balb/c WT submetidos à HM (n = 4), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 9) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 9). O Painel B apresenta os valores médios do número relativo de potenciais de ação disparados (valores expressos em porcentagem da resposta máxima) para cada amplitude de corrente despolarizante injetada em neurônios com disparo espontâneo de PA's do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 6), Balb/c WT submetidos à HM (n = 5), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 4) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 4). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos. \* Diferente do respectivo controle normóxia (P<0,05). # Diferente do respectivo controle genético (P<0,05).

### 5.6.3 Efeitos da HM sobre as correntes pós-sinápticas espontâneas excitatórias (eEPSCs) de neurônios do NTS de camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT

O estudo das eEPSCs foi realizado na presença do antagonista de receptores GABAérgicos Picrotoxina, conforme descrito na seção de Materiais e Métodos, com o objetivo de abolir as correntes pós-sinápticas inibitórias, isolando assim somente as excitatórias. O Painel A da Figura 19 mostra os traçados representativos do registro das eEPSCs de um neurônio do NTS de cada grupo experimental. Os neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT submetidos à HM (n = 10) não apresentaram alterações na amplitude ( $-21 \pm 3$  vs  $-22 \pm 3$  pA,  $P > 0,9999$ ) e frequência ( $3 \pm 0,7$  vs  $6 \pm 2$  Hz,  $P = 0,2236$ ) das eEPSCs quando comparados com seus controles normóxia (grupo Balb/c WT controle, n = 7). A exposição à HM também não alterou a amplitude ( $-14 \pm 1$  vs  $-14 \pm 1$  pA,  $P > 0,9999$ ) e frequência ( $4 \pm 1$  vs  $4 \pm 0,7$  Hz,  $P > 0,9999$ ) das eEPSCs nos neurônios do NTS de camundongos A<sub>2A</sub>KO (grupo A<sub>2A</sub>KO Hm, n = 6) quando comparados com seus controles normóxia (grupo A<sub>2A</sub>KO controle, n = 12). Tanto na condição de normóxia quanto na de HM a frequência (Normóxia:  $4 \pm 0,7$  vs  $6 \pm 2$  Hz,  $P = 0,3063$ ; HM:  $4 \pm 1$  vs  $3 \pm 0,7$  Hz,  $P > 0,9999$ ) e a amplitude (Normóxia:  $-14 \pm 1$  vs  $-22 \pm 3$  pA,  $P = 0,079$ ; HM:  $-14 \pm 1$  vs  $-21 \pm 3$  pA,  $P = 0,2334$ ) das eEPSCs foram semelhantes entre os camundongos A<sub>2A</sub>KO e seus respectivos controles genéticos Balb/c WT (Figura 19, Painéis A e B).



**Figura 19: Correntes pós-sinápticas espontâneas excitatórias (sEPSCs) de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** A figura mostra os traçados representativos dos registros das sEPSCs de neurônios do NTS de cada um dos 4 grupos experimentais (Painel A). Na porção inferior da figura são apresentados gráficos de barras com os valores individuais e médios de amplitude (Painel B) e frequência (Painel C) das sEPSCs de neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 7), Balb/c WT submetidos à HM (n = 10), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 12) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 6). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.

#### 5.6.4 Efeitos da HM sobre as correntes pós-sinápticas excitatórias de neurônios do NTS de camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT evocadas pela estimulação do Trato Solitário (TS-EPSCs)

O estudo das correntes pós-sinápticas excitatórias evocadas foi realizado por meio do estímulo das fibras aferentes dos quimiorreceptores periféricos que chegam ao NTS por meio do Trato Solitário (TS) na frequência de 10 Hz, conforme descrito na seção de Materiais e Métodos, com o objetivo de simular a neurotransmissão excitatória que ocorre durante a ativação desse reflexo. Todos os experimentos de análise das TS-EPSCs também foram realizados na presença da Picrotoxina.

Em um primeiro protocolo, ilustrado no Painel A da Figura 20, foram realizados estímulos de intensidades crescentes de 10 a 100 V com o objetivo de determinar a intensidade de estímulo que desencadeia a amplitude máxima das TS-eEPSCs. Para cada neurônio os dados foram normalizados pela amplitude máxima da corrente evocada, de forma que os valores apresentados na Tabela 4 representam a porcentagem média da amplitude da TS-eEPSC de cada grupo experimental. Dessa forma, este protocolo além de determinar a intensidade de estímulo a ser utilizado no protocolo seguinte de avaliação das TS-eEPSC também nos fornece as seguintes informações: 1) Existe diferença na intensidade de estímulo que gera a amplitude máxima das TS-eEPSC entre os grupos experimentais? e 2) Existe algum grupo experimental que responde com amplitude relativa das TS-eEPSC significativamente maior em determinada intensidade de estímulo?

A intensidade de estímulo que gera a amplitude máxima das TS-eEPSC não foi diferente entre os grupos Balb/c WT mantidos em normóxia (controle, n = 13), Balb/c WT submetidos à HM (n = 14), A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia (controle, n = 15) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 13). No entanto, na intensidade de estímulo de 40V, a amplitude média relativa das TS-eEPSC dos camundongos do grupo Balb/c WT submetidos à HM foi significativamente maior quando comparados com seus controles Balb/c WT mantidos em normóxia (P = 0,0052; Figura 20, Painel B).

Uma vez determinada a intensidade de estímulo que desencadeia amplitude máxima das TS-eEPSCs para cada neurônio registrado, o protocolo seguinte consistiu na realização de cinco estímulos do TS na frequência de 10 Hz, conforme descrito na seção de Materiais e Métodos e ilustrado na Figura 20. A partir deste protocolo, foram

analisadas as amplitudes das TS-eEPSCs evocadas pelo primeiro estímulo do TS. O Painel A da Figura 21 mostra os traçados representativos das TS-eEPSCs de um neurônio do NTS de cada grupo experimental. Os neurônios do NTS de camundongos Balb/c submetidos à HM (n = 10) apresentaram aumento significativo na amplitude das TS-eEPSCs ( $-429 \pm 87$  vs  $-210 \pm 32$  pA,  $P = 0,0203$ ) quando comparados com seus controles normóxia (grupo Balb/c WT controle, n = 11). No entanto, a exposição à HM não alterou a amplitude das TS-eEPSCs ( $-268 \pm 61$  vs  $-307 \pm 37$  pA,  $P > 0,9999$ ) nos camundongos  $A_2A$ KO (n = 12) quando comparados com seus controles normóxia (grupo  $A_2A$ KO controle, n = 14). Tanto na condição de normóxia ( $-307 \pm -37$  vs  $-210 \pm 32$  pA,  $P = 0,4061$ ) quanto na de HM ( $-268 \pm 61$  vs  $-429 \pm 87$  pA,  $P = 0,1087$ ) a amplitude das TS-EPSCs foi semelhante entre os camundongos  $A_2A$ KO e seus respectivos controles genéticos Balb/c WT (Figura 22, Painel B).

A partir destes resultados, foram realizadas outras análises utilizando este mesmo protocolo de 5 estímulos com o objetivo de investigar os possíveis mecanismos subjacentes relacionados ao aumento na amplitude das TS-eEPSCs nos camundongos Balb/c WT submetidos à HM. O aumento observado na amplitude das TS-eEPSCs pode ser decorrente de alterações em diferentes mecanismos envolvendo a transmissão sináptica, sendo eles 1) mecanismos pré-sinápticos, relacionados a alterações na liberação de neurotransmissores ou no número de sinapses ativas, 2) mecanismos pós-sinápticos, relacionados a modificações nos receptores presentes na membrana pós-sináptica e 3) alterações nos mecanismos de modulação astrocítica sobre a atividade sináptica. Investigamos a primeira possibilidade para o aumento na amplitude das TS-eEPSCs nos camundongos Balb/c WT HM por meio das análises de depressão (ou decaimento) na amplitude das TS-eEPSCs, da razão de pulso pareado (PPR) e do coeficiente de variação da amplitude dessas correntes, conforme descrito na seção de Materiais e Métodos e ilustrado no Painel A da Figura 23.

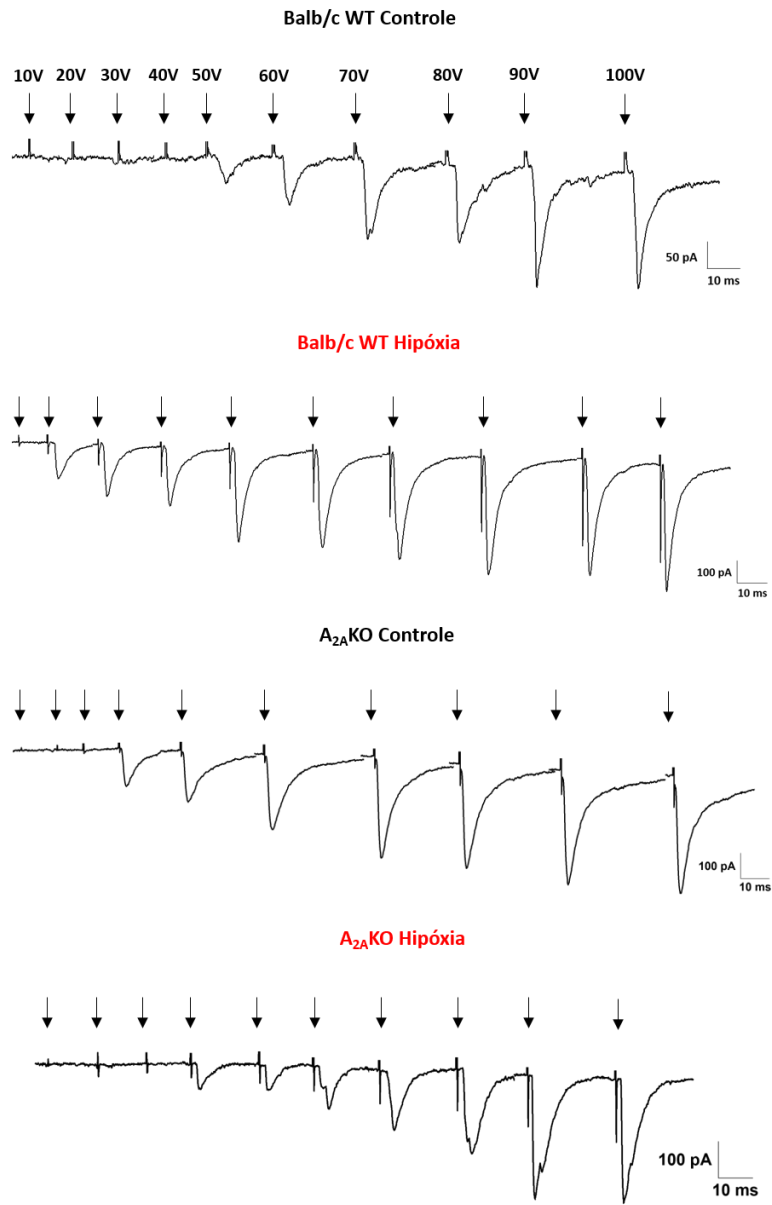
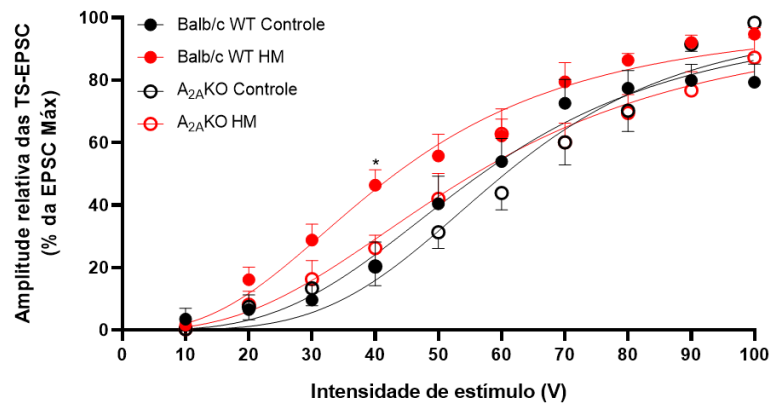
Com relação à análise do decaimento na amplitude das TS-eEPSCs em resposta aos 5 estímulos consecutivos, para cada neurônio os dados foram normalizados pela amplitude da primeira corrente evocada, de forma que os valores apresentados na Tabela 5 representam a porcentagem média de decaimento das TS-eEPSCs de cada grupo experimental. O decaimento da amplitude das TS-eEPSCs foi



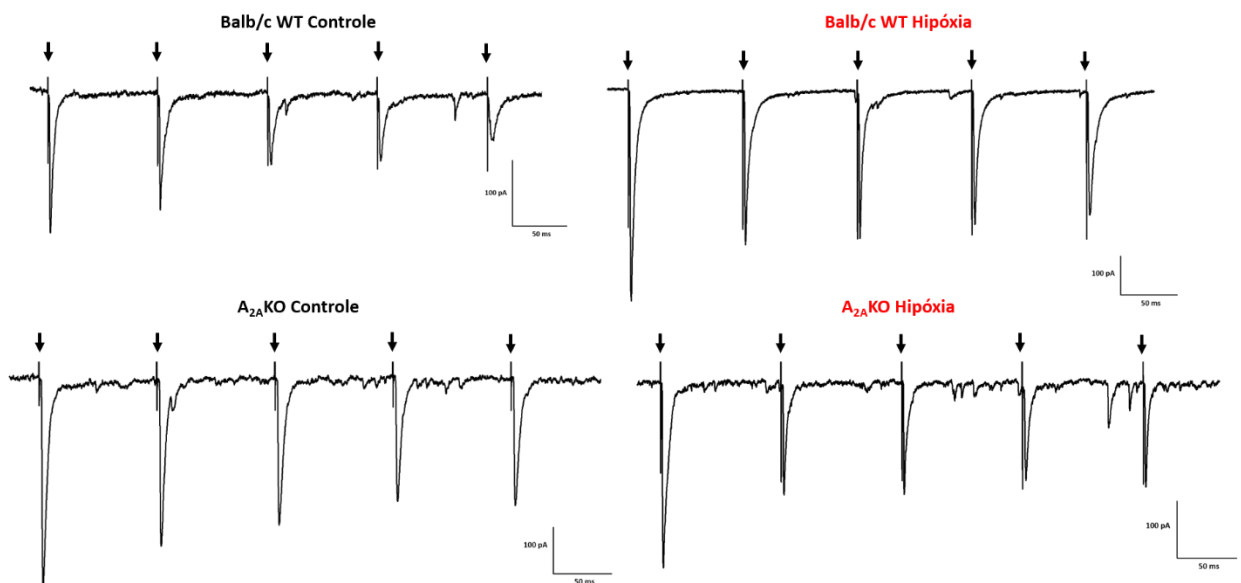
semelhante (Figura 21, Painel B) entre os grupos Balb/c WT mantidos em normóxia (controle, n = 12), Balb/c WT submetidos à HM (n = 10), A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia (controle, n = 14) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 12). Os neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT submetidos à HM não apresentaram alterações nos parâmetros de PPR ( $0,65 \pm 0,04$  vs  $0,62 \pm 0,07$ ,  $P > 0,9999$ ) e  $1/CV^2$  ( $0,007 \pm 0,001$  vs  $0,005 \pm 0,001$ ,  $P > 0,9999$ ) das TS-EPSCs quando comparados com seus controles normóxia (grupo Balb/c WT HM). A exposição à HM também não alterou os parâmetros de PPR ( $0,66 \pm 0,03$  vs  $0,72 \pm 0,03$ ,  $P = 0,7482$ ) e  $1/CV^2$  ( $0,012 \pm 0,004$  vs  $0,007 \pm 0,002$ ,  $P = 0,4138$ ) das TS-EPSCs nos camundongos A<sub>2A</sub>KO (grupo A<sub>2A</sub>KO HM) quando comparados com seus controles normóxia (grupo A<sub>2A</sub>KO controle). Tanto na condição de normóxia quanto nos grupos expostos à HM a PPR (Normóxia:  $0,72 \pm 0,03$  vs  $0,62 \pm 0,07$ ,  $P = 0,2333$ ; HM:  $0,66 \pm 0,03$  vs  $0,65 \pm 0,04$ ,  $P > 0,9999$ ) e o  $1/CV^2$  (Normóxia:  $0,007 \pm 0,002$  vs  $0,005 \pm 0,001$ ,  $P > 0,9999$ ; HM:  $0,012 \pm 0,004$  vs  $0,007 \pm 0,001$ ,  $P = 0,4841$ ) das TS-EPSCs foram semelhantes entre os camundongos A<sub>2A</sub>KO e seus respectivos controles genéticos Balb/c WT (Figura 23, Painéis C e D).

**Tabela 4:** Média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem da amplitude das TS-eEPSC de neurônios do NTS de cada grupo experimental em resposta a intensidades de estímulo crescentes.

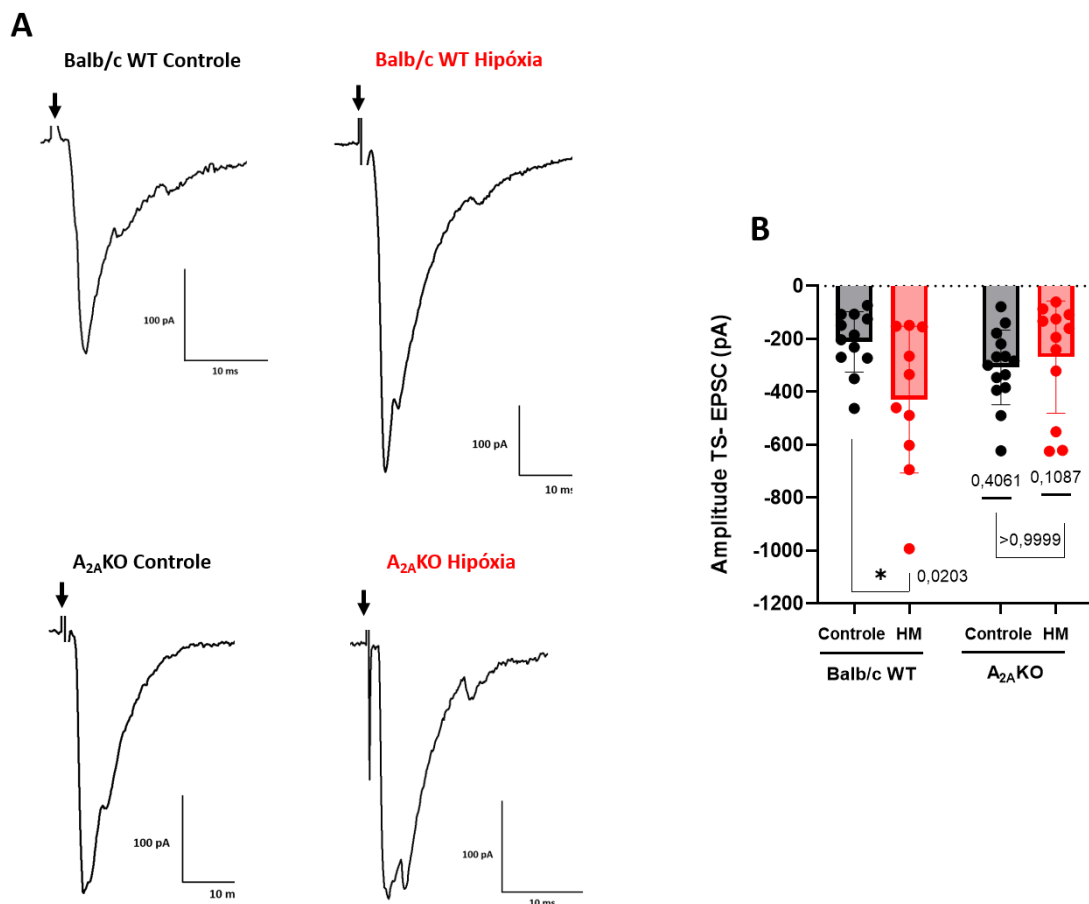
Grupo experimental	10V	20V	30V	40V	50V	60V	70V	80V	90V	100V
Balb/c WT Controle	3 $\pm$ 3	6 $\pm$ 4	9 $\pm$ 4	20 $\pm$ 7	40 $\pm$ 8	53 $\pm$ 7	72 $\pm$ 7	77 $\pm$ 5	79 $\pm$ 5	79 $\pm$ 5
Balb/c WT HM	1 $\pm$ 1	16 $\pm$ 3	28 $\pm$ 5	46 $\pm$ 4	55 $\pm$ 6	62 $\pm$ 5	79 $\pm$ 6	86 $\pm$ 2	92 $\pm$ 2	94 $\pm$ 2
A <sub>2A</sub> KO Controle	0,2 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 4	13 $\pm$ 5	20 $\pm$ 6	31 $\pm$ 5	43 $\pm$ 5	60 $\pm$ 7	70 $\pm$ 6	91 $\pm$ 2	98 $\pm$ 1
A <sub>2A</sub> KO HM	0,3 $\pm$ 0,3	8 $\pm$ 4	16 $\pm$ 6	26 $\pm$ 4	42 $\pm$ 8	62 $\pm$ 8	60 $\pm$ 6	69 $\pm$ 5	76 $\pm$ 6	87 $\pm$ 6

**A****B**

**Figura 20: Relação entre intensidade de estímulo (V) e amplitude (pA) das correntes pós-sinápticas excitatórias de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM evocadas pela estimulação das fibras do Trato Solitário (TS-eEPSC).** A figura mostra os traçados representativos do aumento da amplitude das TS-eEPSC em resposta ao aumento da intensidade de estímulo das fibras do TS (de 10 à 100V) de neurônios do NTS de cada um dos 4 grupos experimentais (Painel A). As setas pretas indicam o momento exato em que foram realizados os estímulos. O Painel B apresenta as médias das amplitudes relativas das TS-eEPSC (valores expressos em porcentagem da amplitude máxima) para cada intensidade de estímulo de neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 13), Balb/c WT submetidos à HM (n = 14), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 15) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 13). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos. \* Diferente do respectivo controle normóxia (P<0,05).



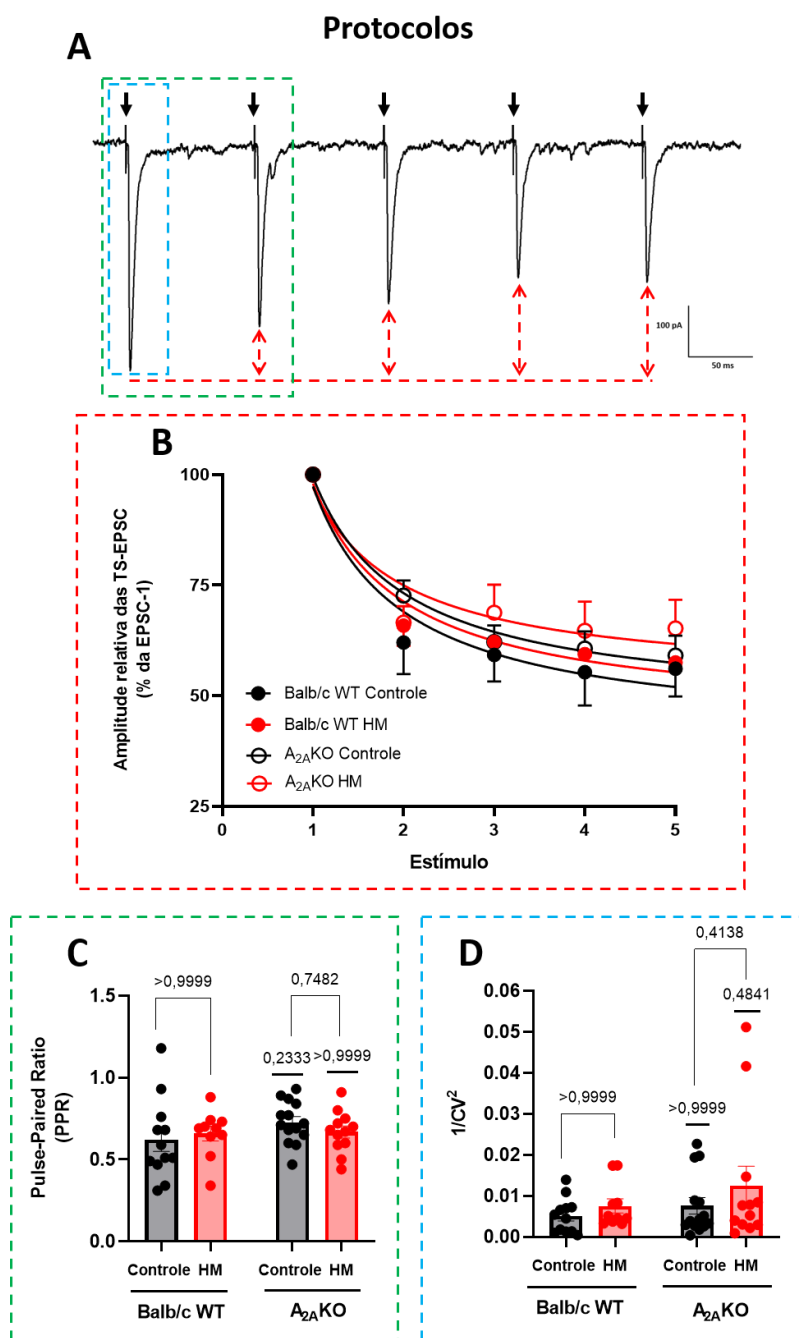
**Figura 21: Traçados representativos das TS-eEPSCs resultantes de um trem de 5 estímulos na frequência de 10 Hz em neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** As setas pretas indicam o momento exato em que foram realizados os 5 estímulos sequenciais.



**Figura 22: Correntes pós-sinápticas excitatórias de neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM evocadas pela estimulação do Trato Solitário (TS-eEPSC).** A figura mostra os traçados representativos das TS-eEPSC de neurônios do NTS de cada um dos 4 grupos experimentais (Painel A). As setas pretas indicam o momento exato em que foram realizados os estímulos. No Painel B são apresentados os gráficos de barras com os valores individuais e médios da amplitude das TS-eEPSC de neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 12), Balb/c WT submetidos à HM (n = 10), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 14) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 12). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados. \* Diferente do respectivo controle normóxia (P<0,05).

**Tabela 5:** Média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de decaimento da amplitude das TS-eEPSC de neurônios do NTS de cada grupo experimental em resposta a um trem de 5 estímulos com frequência de 10 Hz.

<b>Grupo experimental</b>	<b>1º estímulo</b>	<b>2º estímulo</b>	<b>3º estímulo</b>	<b>4º estímulo</b>	<b>5º estímulo</b>
<b>Balb/c WT Controle</b>	100 $\pm$ 0	62 $\pm$ 7	59 $\pm$ 6	55 $\pm$ 7	56 $\pm$ 6
<b>Balb/c WT HM</b>	100 $\pm$ 0	65 $\pm$ 4	62 $\pm$ 2	59 $\pm$ 1	57 $\pm$ 1
<b>A<sub>2A</sub>KO Controle</b>	100 $\pm$ 0	72 $\pm$ 3	62 $\pm$ 3	60 $\pm$ 3	59 $\pm$ 4
<b>A<sub>2A</sub>KO HM</b>	100 $\pm$ 0	66 $\pm$ 3	68 $\pm$ 6	64 $\pm$ 6	65 $\pm$ 6



**Figura 23: Depressão sináptica de curto prazo das TS-eEPSCs em neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e  $A_{2A}KO$  mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** O painel A da figura mostra um traçado representativo das TS-eEPSCs resultantes de um trem de 5 estímulos na frequência de 10 Hz que ilustra os protocolos de análises utilizados para avaliar o processo de depressão sináptica de curto prazo. As linhas tracejadas vermelhas destacam a análise do decaimento na amplitude das correntes evocadas seguindo os 5 estímulos consecutivos. A linha tracejada verde destaca a análise da razão de pulso pareado (PPR) que leva em consideração a amplitude das duas primeiras TS-eEPSCs. A linha tracejada azul destaca a análise do  $1/CV^2$  que leva em consideração a amplitude das correntes evocadas pelo primeiro estímulo do TS. No Painel B são apresentados os valores da porcentagem média

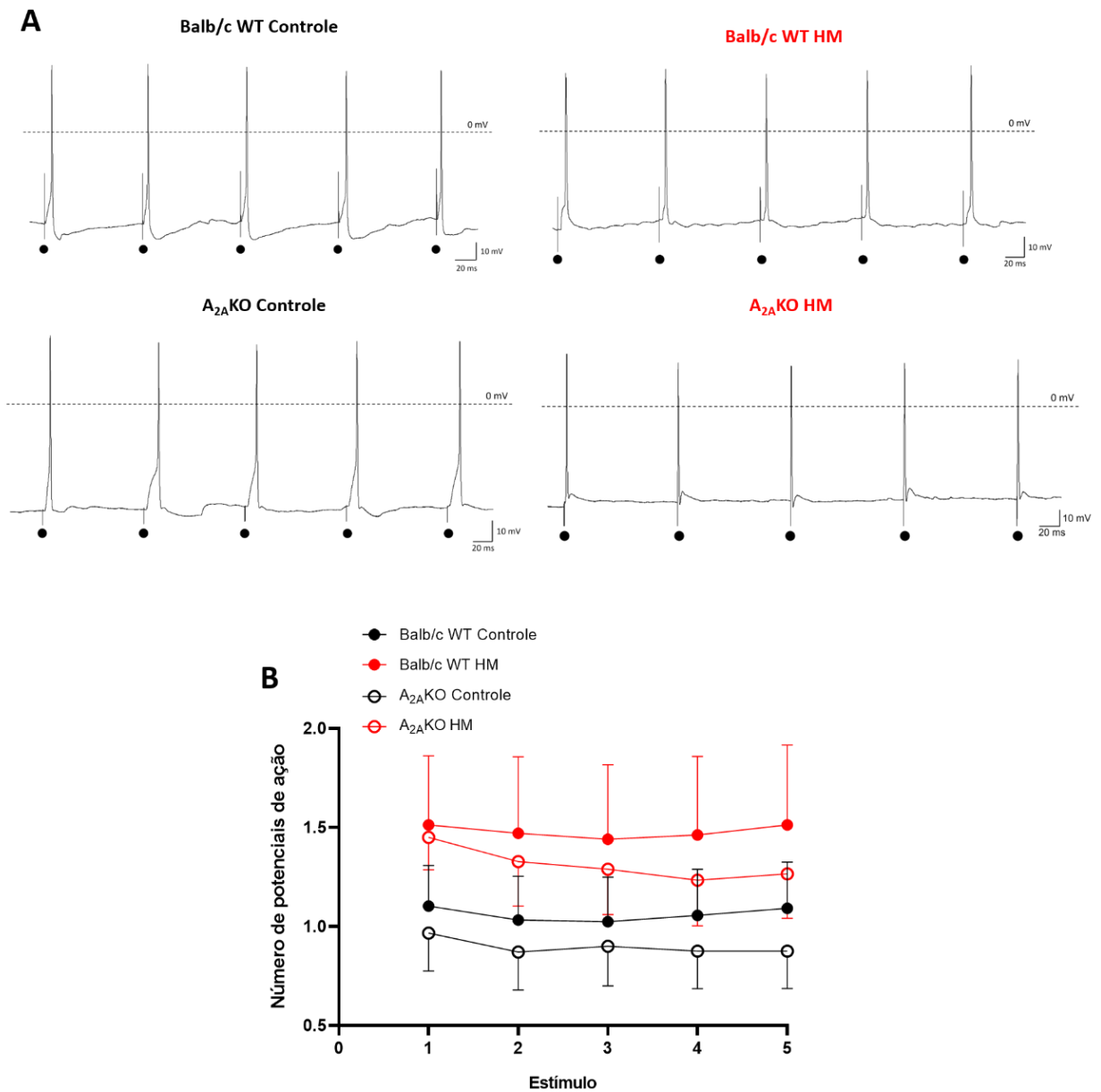
de decaimento das TS-eEPSCs em relação a primeira corrente evocada. Os Painéis C e D mostram os valores individuais e médios de PPR e  $1/CV^2$ , respectivamente, de neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 12), Balb/c WT submetidos à HM (n = 10), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 14) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 12). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos e os valores de P estão indicados.

#### 5.6.5 Efeitos da HM sobre a atividade sináptica evocada de neurônios do NTS de camundongos A<sub>2A</sub>KO e Balb/c WT

O estudo da atividade sináptica evocada foi realizado por meio do protocolo de estímulo das fibras aferentes dos quimiorreceptores periféricos que chegam ao NTS por meio do Trato Solitário (TS) na frequência de 10 Hz e com intensidade de estímulo máxima, conforme descrito na seção de Materiais e Métodos. A Tabela 6 apresenta os valores médios do número de potenciais de ação evocados em resposta aos 5 estímulos consecutivos e o Painel A da Figura 24 ilustra os traçados representativos dos PA's evocados de um neurônio do NTS de cada grupo experimental. Os resultados mostram que os cinco estímulos do TS produziram potenciais de ação de forma semelhantes nos grupos Balb/c WT mantidos em normóxia (controle, n = 16), Balb/c WT submetidos à HM (n = 13), A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia (controle, n = 16) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 12; Figura 24, Painel B).

**Tabela 6:** Média  $\pm$  erro padrão da média do número de potenciais de ação disparados pelos neurônios do NTS de cada grupo experimental em resposta a um trem de 5 estímulos com frequência de 10 Hz.

Grupo experimental	1º estímulo	2º estímulo	3º estímulo	4º estímulo	5º estímulo
Balb/c WT Controle	1,1 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,2
Balb/c WT HM	1,5 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,4
A <sub>2A</sub> KO Controle	1 $\pm$ 0,2	0,87 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2
A <sub>2A</sub> KO HM	1,4 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2



**Figura 24: Atividade sináptica evocada pela estimulação do TS em neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT e A<sub>2A</sub>KO mantidos em normóxia ou submetidos à HM.** O Painel A da figura mostra os traçados representativos dos potenciais de ação resultantes de um trem de 5 estímulos na frequência de 10 Hz de neurônios do NTS de cada um dos 4 grupos experimentais. Os círculos pretos indicam o momento exato em que os estímulos foram realizados. No Painel B são apresentados os valores médios do número de potenciais de ação evocados em resposta a cada um dos 5 estímulos do TS em neurônios do NTS de camundongos dos grupos Balb/c WT controle (mantidos em normóxia; n = 16), Balb/c WT submetidos à HM (n = 13), A<sub>2A</sub>KO controles (mantidos em normóxia; n = 16) e A<sub>2A</sub>KO submetidos à HM (n = 12). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar diferenças entre os grupos.



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Considerações sobre a utilização de camundongos *knockout* para a avaliação indireta dos receptores da adenosina do subtipo A<sub>2A</sub> no NTS

O desenvolvimento de camundongos geneticamente modificados a partir do final do século XX representa um marco importante para a neurociência, pois proporcionou grandes avanços na compreensão dos mecanismos subjacentes a diversos fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos (Picciotto et al., 1998; Leung et al., 2016; Navabpour et al., 2020). A tecnologia de engenharia genética baseada na recombinação homóloga, processo pelo qual sequências de DNA correspondentes se rearranjam durante a divisão celular, foi pioneira na geração das primeiras linhagens de camundongos *knockouts* (KO), nas quais a expressão de um gene específico é bloqueada (Bronson & Smithies, 1994, Mansouri, 2001; Navabpour et al., 2020). No contexto do estudo da adenosina como molécula sinalizadora, envolvida na coordenação da função de diferentes tipos celulares presentes tanto nos tecidos periféricos quanto no sistema nervoso central (SNC), a tecnologia de camundongos transgênicos revelou constituintes e características desse sistema de modulação que as abordagens farmacológicas convencionais utilizadas até o momento não haviam sido capazes de evidenciar (Salmi et al., 2005; Yaar et al., 2005; Wei et al., 2011; Lopes et al., 2020; Rumney et al., 2020). Portanto, no presente estudo optamos por utilizar um modelo de camundongo *knockout* global para os receptores da adenosina do subtipo A<sub>2A</sub> com o objetivo de elucidar uma possível participação desses receptores nas alterações cardiovasculares e respiratórias, e no processamento sináptico que ocorre no Núcleo do Trato Solitário (NTS) após a exposição ao protocolo de 24h de hipóxia mantida (HM).

É evidente que apesar da sua relevância, o uso de camundongos *knockouts* para o estudo do papel da adenosina e de seus receptores pode apresentar algumas limitações que devem ser consideradas e examinadas com a devida atenção. Em primeiro lugar merece destaque a possibilidade de que a falta da expressão de determinada proteína, nesse caso dos receptores A<sub>2A</sub>, pode levar ao desenvolvimento de fenótipos não desejáveis para o estudo em questão, de modo a revelar o resultado de um desenvolvimento alterado ao invés do papel exclusivo da proteína removida na

região de interesse ou nas respostas a um determinado estímulo. Considerando que num estudo anterior foi reportado que a ausência dos receptores da adenosina do subtipo A<sub>2A</sub> confere hipertensão pulmonar em camundongos *knockouts* oriundos da linhagem C57BL/6 adultos maduros (Xu et al., 2010), nós investigamos se o nosso modelo de camundongo *knockout* da linhagem Balb/c jovem adulto (C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc</sup>/J; 6-8 semanas de idade) também apresenta o desenvolvimento de um quadro de hipertensão pulmonar. Caso essa alteração também se fizesse presente nos animais *knockout* oriundos da linhagem Balb/c, o uso deste animal transgênico no presente trabalho seria inviável, pois significaria que as alterações que observamos poderiam não ser necessariamente decorrentes da exposição à HM, mas sim resultado das implicações funcionais da hipertensão pulmonar sobre o sistema respiratório. Assim como os autores do trabalho mencionado, nós utilizamos a medida da pressão sistólica ventricular direita (PSVD) em animais anestesiados como um indicativo da pressão sanguínea na artéria pulmonar, parâmetro este que indiretamente nos permite avaliar se houve ou não o desenvolvimento de um quadro de hipertensão pulmonar. Além de avaliarmos se a falta da expressão dos receptores A<sub>2A</sub> acarretaria o desenvolvimento de hipertensão pulmonar no nosso modelo de animal transgênico, também submetemos alguns animais *knockouts* ao protocolo de 24h de HM, uma vez que no trabalho de Xu e colaboradores (2010) foi demonstrado que a exposição crônica de duas semanas à hipóxia levou ao desenvolvimento de um quadro mais grave de hipertensão pulmonar nos animais *knockouts*. No entanto, tanto os camundongos C;129S-Adora2a<sup>tm1jfc</sup>/J mantidos em normóxia quanto aqueles que foram submetidos à HM não apresentaram aumento da PSVD. Tais resultados foram fundamentais para assegurar que o uso destes animais transgênicos no contexto do presente estudo era viável.

Importante ressaltar que no trabalho mencionado anteriormente, os autores destacam que o desenvolvimento de hipertensão pulmonar na ausência do receptor A<sub>2A</sub> da adenosina pode ser dependente do estágio de desenvolvimento, i.e, da idade dos animais (Xu e cols., 2010). Como mencionado, utilizamos camundongos jovens adultos de 6-8 semanas de idade, diferente dos camundongos adultos maduros de 14-16 semanas de idade utilizados no trabalho de Xu e colaboradores (2010). Além disso, o *knockout* utilizado pelos autores do trabalho possui como *background*

genético a linhagem de camundongos C57BL/6, enquanto o *knockout* utilizado no presente trabalho possui como *background* a linhagem Balb/c. Mutações em uma mesma proteína podem gerar fenótipos distintos em animais com diferentes antecedentes genéticos devido à complexidade e heterogeneidade dos processos celulares de regulação e modificação gênica e proteica (Threadgill et al., 1995; Silva et al., 1995; Frankel, 1998). A relevância do *background* genético também se faz presente na escolha da linhagem de camundongos *wild-type* (WT) a ser utilizada como grupo controle do camundongo *knockout* em análise, uma vez que somente se os grupos experimentais apresentarem o mesmo *background* genético, as diferenças entre os fenótipos observados podem ser atribuídas à mutação e não aos diferentes antecedentes genéticos (Silva et al., 1995). Diante disso, tivemos o cuidado na escolha dos camundongos WT da linhagem Balb/c como controles para os camundongos *A<sub>2A</sub> knockouts*, a qual foi realizada levando em consideração as informações fornecidas pela empresa Jackson Laboratory da qual os transgênicos foram adquiridos pelo Centro de Criação de Camundongos Especiais (CCCE) do Campus da USP de Ribeirão Preto.

Outra limitação importante que merece atenção no uso de camundongos *knockouts* está relacionada aos mecanismos compensatórios que podem ser desencadeados quando da ausência da expressão de determinada proteína. Trazendo para o contexto do sistema de modulação da adenosina, poderíamos considerar a possibilidade na qual a remoção de um subtipo de receptor levaria a super-expressão dos outros subtipos de receptores. O NTS, região de interesse do presente estudo, apresenta expressão de ambos os receptores *A<sub>1</sub>* e *A<sub>2A</sub>*, de modo que a falta da expressão de um desses subtipos poderia levar a alterações compensatórias em outros componentes do sistema purinérgico da adenosina. A partir de um estudo no qual um modelo de camundongo *knockout* para os receptores *A<sub>2A</sub>* apresentou alterações fenotípicas relacionadas à hipertensão, agressividade, ansiedade e hiperalgesia (Ledent et al., 1997), Snell e colaboradores (2000) investigaram possíveis alterações na densidade dos transportadores para adenosina e dos receptores do subtipo *A<sub>1</sub>* nos diferentes áreas do SNC envolvidas com o controle autonômico (NTS, hipotálamo e núcleos pontinos como o Locus Coeruleus, Parabraquial medial e lateral e Núcleos da Rafe) em um modelo de camundongo

*knockout* para os receptores  $A_{2A}$  com o objetivo de avaliar as origens desses fenótipos alterados. Apesar de encontrarem uma redução na densidade de transportadores de adenosina em quase todos os núcleos de regulação autonômica, no NTS a deleção dos receptores  $A_{2A}$  não alterou a densidade dos receptores do subtipo  $A_1$ . Tendo em vista que os receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  desencadeiam vias de sinalização celular distintas e que muitas vezes levam a respostas celulares divergentes (Sebastião & Ribeiro, 2009, Borea et al., 2018; Liu et al., 2019), uma eventual super-expressão de receptores  $A_1$  na falta da expressão dos receptores  $A_{2A}$  representaria uma limitação importante para o estudo das alterações na transmissão sináptica que ocorre no NTS após exposição à HM.

Vale ainda ressaltar que as disfunções autonômicas e cardiovasculares observadas no modelo de camundongo *knockout*  $A_{2A}$  utilizado por Ledent et al., (1997) não foram expressas em outras linhagens de camundongos transgênicos (Chen et al., 1990; Sakata et al., 2005; Sehba et al., 2010; Meriño et al., 2020). Isso chama a atenção para outro ponto relacionado aos obstáculos no uso de camundongos geneticamente modificados, especialmente quando se estuda os diferentes circuitos neuronais presentes no SNC. Nesses casos, uma importante limitação está relacionada às dificuldades em determinar se fenótipos alterados resultam de efeitos diretos da ausência da proteína em questão nos circuitos neurais cerebrais ou nos órgãos e tecidos localizados na periferia. Nesse sentido, Lopes et al. (2021) destacam a falta de estudos que avaliam as alterações fenotípicas relacionadas ao SNC em conjunto com as alterações periféricas em modelos de camundongos *knockouts* que visam compreender a função dos componentes do sistema de modulação da adenosina. Portanto, no presente trabalho realizamos uma completa caracterização *in vivo* dos perfis cardiovascular e respiratório de camundongos  $A_{2A}$  *knockouts* não-anestesiados simultaneamente aos estudos *in situ* das características eletrofisiológicas de neurônios do NTS.

## **6.2 Efeitos da HM sobre os parâmetros cardiovasculares e respiratórios de camundongos A<sub>2A</sub> *knockouts* e dos seus respectivos controles Balb/c *Wild-type***

No contexto do nosso laboratório, nos últimos 4 anos, nos deparamos com questões importantes relacionadas as diferenças nas respostas autonômicas e respiratórias ao protocolo de HM entre diferentes linhagens de ratos, e também diferenças entre as respostas observadas em ratos e camundongos (Bazilio et al., 2021, Rodrigues & Souza et al., 2021). No ano de 2019 introduzimos o camundongo da linhagem C57BL/6 como modelo experimental no nosso laboratório e em uma etapa inicial realizamos uma completa caracterização *in vivo*, por meio de registros cardiovasculares e respiratórios em animais não-anestesiados, e por meio do registro das atividades de nervos autonômicos e respiratórios na preparação coração-tronco encefálico (*in situ*) para a avaliação das respostas autonômicas e respiratórias à HM. Naqueles estudos observamos que a exposição à HM, diferente do observado anteriormente em ratos da linhagem Wistar Ribeirão-Preto (WRP; Moraes et al, 2014; Accorsi-Mendonça et al., 2015), não promove aumento na pressão arterial média (PAM) basal, mas sim uma redução significativa da frequência cardíaca (FC) basal e um aumento significativo do tônus parassimpático cardíaco (Souza & Rodrigues et al., 2021; Souza et al., 2022). Além disso, as alterações observadas no acoplamento simpático-respiratório de camundongos C57BL/6 após a HM são diferentes daquelas observadas previamente em ratos WRP submetidos ao mesmo protocolo de HM. Os ratos WRP expostos à HM apresentam elevada incidência de atividade do nervo abdominal na fase final da expiração (atividade Late-E relacionada à expiração ativa) acompanhada por aumentos simultâneos na atividade simpática. Essa alteração no acoplamento simpático-respiratório resultou numa hiperatividade simpática, a qual seria o fator determinante para a hipertensão neurogênica observada nesse modelo experimental de hipóxia (Moraes et al, 2014; Accorsi-Mendonça et al., 2015; Machado et al., 2017). Por outro lado, os resultados de Rodrigues, Souza et al. (2021) na preparação *in situ* mostraram que em camundongos C57BL/6 expostos à HM a elevada incidência de atividade Late-E do nervo abdominal foi acompanhada por uma redução da atividade simpática e um aumento da atividade do nervo vago cervical. Além dessas diferenças entre espécies, Bazilio e colaboradores (2021) verificaram

que ratos da linhagem Wistar Hannover (WH) não responderam ao protocolo de HM de 24h de forma semelhante aos ratos WRP e aos ratos da linhagem Sprague Dawley (SD). Os ratos WH expostos à HM não apresentam aumento da PAM e da frequência respiratória. Além disso, os registros na preparação *in situ* demonstraram uma baixa incidência de expiração ativa nos ratos WH expostos à HM, sem alterações nos níveis de atividade simpática, sugerindo uma menor sensibilidade dos ratos dessa linhagem ao protocolo de HM. Tais achados evidenciam a importância da padronização do modelo experimental nos estudos sobre os mecanismos de controle das funções neurovegetativas que são desencadeados em resposta a um determinado desafio, como é o caso da hipóxia. No caso do nosso laboratório, que tem avaliado os diferentes elementos que compõem o processamento das vias neurais do quimiorreflexo utilizando um modelo de hipóxia mantida de 24h (FiO<sub>2</sub> 0,1), a caracterização da linhagem a ser utilizada como modelo experimental é primordial. Portanto, no presente estudo em que utilizamos os camundongos *wild-type* da linhagem Balb/c como controles genéticos dos camundongos *knockout* devido ao seu background genético, identificamos também diferenças nas respostas cardiovasculares e respiratórias dessa linhagem de camundongos em comparação com os camundongos C57BL/6, uma linhagem amplamente utilizada como modelo experimental, inclusive no nosso laboratório atualmente (Rodrigues, Souza et al., 2021).

Em situações de desafio hipóxico, os quimiorreceptores periféricos localizados nos corpúsculos carotídeos são ativados e desencadeiam respostas autonômicas e respiratórias, como uma intensa resposta de bradicardia (mediada pela excitação do componente parassimpático), uma resposta pressora de aumento da pressão arterial (mediada pela excitação do componente simpático), e um aumento da atividade respiratória (taquipnéia), com o objetivo de restaurar a pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (Machado, 2001; Barros et al., 2002). Os resultados referentes à caracterização *in vivo* das funções cardiovasculares e respiratórias mostraram que os camundongos *wild-type* da linhagem Balb/c respondem ao protocolo de HM de forma diferente ao observado previamente por Rodrigues & Souza et al. (2021) com a linhagem de camundongos C57BL/6. Assim como os camundongos C57BL/6, os camundongos Balb/c apresentam uma redução significativa da frequência cardíaca

basal acompanhada por um aumento significativo da frequência respiratória e da ventilação pulmonar. A intensa bradicardia observada nos camundongos Balb/c expostos à HM, caracterizada pela redução da FC basal, pode indicar uma alteração importante no componente parassimpático cardíaco. Nos camundongos da linhagem C57BL/c, um estudo recente do nosso laboratório mostrou que o protocolo de HM promove aumento do tônus parassimpático cardíaco (Souza et al., 2022). No entanto, os camundongos Balb/c apresentaram uma redução significativa na pressão arterial média (PAM) após o protocolo de HM. Essa redução na PAM nos camundongos Balb/c após a HM foi resultado de uma redução na pressão arterial diastólica (PAD). A PAD refere-se à pressão que o sangue exerce contra as paredes das artérias enquanto o coração relaxa e os ventrículos podem se encher de sangue, sendo determinada pela resistência periférica, enquanto a pressão arterial sistólica (PAS) reflete a pressão que o sangue exerce contra as paredes das artérias quando os ventrículos se contraem, impulsionando o sangue para as artérias. Dessa forma, quanto maior a força de contração cardíaca maior será a pressão exercida pelo sangue no interior das artérias, i.e, maior será a PAS. Por outro lado, quanto maior a resistência ao fluxo sanguíneo exercida pelas arteríolas (resistência vascular) maior será a PAD (London & Guerin, 1999; Vlachopoulos & O'Rourke, 2000; London & Pannier, 2010). O contrário também é válido, sugerindo dessa forma que a redução da PAM como resultado de uma redução na PAD nos animais submetidos à HM resultam de uma redução na atividade eferente simpática que modula a resistência vascular periférica.

Os camundongos *A<sub>2A</sub> knockouts* controles (mantidos em normóxia) apresentaram níveis de PAM, PAS, PAD e FC semelhantes aos seus controles *wild-type* também mantidos em normóxia, o que por sua vez, corrobora com outros trabalhos que também não observaram alterações nos parâmetros cardiovasculares basais na ausência dos receptores *A<sub>2A</sub>* da adenosina (Chen et al., 1990; Sakata et al., 2005; Sehba et al., 2010; Meriño et al., 2020). Além disso, os camundongos *A<sub>2A</sub> knockouts* apresentaram respostas cardiovasculares (i.e., redução da PAM, PAD e FC) à HM e à ativação dos quimiorreceptores periféricos com KCN de forma semelhante ao seu controle genético (camundongo *wild-type* Balb/c), sugerindo que os receptores do subtipo *A<sub>2A</sub>* da adenosina não exercem um papel importante nas

respostas autonômicas à ativação dos quimiorreceptores periféricos. No entanto, tais achados não descartam a possibilidade de que os receptores A<sub>2A</sub> da adenosina possuam um papel modulatório nos centros autonômicos de controle cardiovascular presentes no SNC. Na realidade, muitos estudos apontam os receptores A<sub>2A</sub> como componentes das vias neurais presentes no tronco encefálico envolvidas com o controle cardiovascular e com vias autonômicas reflexas (Barraco et al., 1991; Phillis et al., 1997; Thomas et al., 2000; Scislo et al., 2001; Scislo & O'Leary, 2005, 2006; Minic et al., 2015, 2018). Microinjeções do agonista seletivo para os receptores A<sub>2A</sub> CGS 21680 no NTS caudal de ratos anestesiados promoveu resposta de redução da pressão arterial, que por sua vez, foi abolida pelo pré-tratamento com o antagonista seletivo dos receptores A<sub>2A</sub> com CGS 15943a (Barraco et al., 1990, 1991). No NTS médio-lateral, microinjeções unilaterais do antagonista de receptores A<sub>2A</sub> não tiveram efeitos nos níveis basais de pressão arterial, mas reduziram a bradicardia induzida pela estimulação do nervo aórtico ipsilateral (Thomas et al., 2000). Em resposta à ativação dos receptores cardiopulmonares (RCR) por meio de injeções no átrio direito de fenilbiguanida, um agonista dos receptores de serotonina 5-HT<sub>3</sub>, a estimulação farmacológica dos receptores A<sub>2A</sub> no NTS de ratos anestesiados inibiu as respostas hemodinâmicas e simpáticas regionais promovidas pela ativação dos RCR por meio de um mecanismo GABAérgico (Minic et al., 2015). Essa diversidade e até mesmo divergência entre alguns estudos farmacológicos que buscaram esclarecer a participação dos receptores A<sub>2A</sub> na modulação da atividade autonômica cardiovascular ressalta um ponto importante que deve ser considerado na discussão dos nossos achados, que diz respeito à diversidade do sistema de modulação exercido pela adenosina. Um mesmo subtipo de receptor da adenosina pode promover respostas celulares opostas dependendo do tipo celular e da região do SNC em que é estudado. Isso porque a cascata intracelular ativada pela ligação da adenosina aos seus receptores metabotrópicos envolve uma série de segundos mensageiros e proteínas fosforilativas que resultam no recrutamento de diferentes sistemas de transdução (Fredholm et al., 2001; Borea et al., 2018).

Além disso, quando olhamos para abordagens *in vivo*, como no caso do presente trabalho, devemos considerar que a ausência de um subtipo de receptor resulta em um efeito global que não necessariamente reflete as funções pontuais que



esse receptor pode desempenhar em diferentes órgãos e tecidos do organismo. Portanto, nossos resultados indicam que a ausência dos receptores  $A_{2A}$  não resultam em alterações nos parâmetros cardiovasculares tanto em condições basais (normóxia) quanto em resposta à HM, mas não excluem uma possível participação desses receptores na geração e modulação das atividades simpática e parassimpática para o sistema cardiovascular.

Com relação aos parâmetros respiratórios, o nosso principal achado foi aquele mostrando que camundongos  $A_{2A}$  *knockouts* controles (mantidos em normóxia) apresentam frequência respiratória basal significativamente maior em comparação com seus controles *wild-type* Balb/c. Nós sugerimos que esse aumento na frequência respiratória observado nos animais *knockouts* resulta, pelo menos em parte, da participação dos receptores  $A_{2A}$  no processamento sináptico de regiões ventrais e dorsais do tronco encefálico envolvidas com a geração e a modulação da atividade inspiratória. Os receptores  $A_{2A}$  são acoplados a proteína G estimulatória (Gs), e em neurônios sua ativação pode promover a liberação de neurotransmissores, dentre eles o GABA, principal neurotransmissão inibitório do SNC, contribuindo assim para o tônus inibitório de redes neuronais (Corsi et al., 1999; Cunha & Ribeiro, 2000; Ochi et al., 2000; Borea et al., 2018). Durante a fase inicial do desenvolvimento de ratos, a adenosina agindo em seus receptores  $A_{2A}$  contribui para a ocorrência de depressão respiratória e episódios de apneias, e estudos apontam para mecanismos GABAérgicos como sendo os responsáveis por mediar essa ação inibitória da adenosina, via seus receptores  $A_{2A}$ . Em ratos nas fases iniciais de desenvolvimento (14-21 dias) e em porcos foi demonstrado que microinjeções do agonista específico dos receptores  $A_{2A}$  CGS-21680 no quarto ventrículo resulta na diminuição da frequência respiratória, sendo que essa resposta foi abolida quando houve a injeção prévia do bloqueador dos receptores GABA<sub>A</sub> bicuculina (Wilson et al., 2004; Mayer et al., 2006). Vale ressaltar que já foi demonstrada a expressão de receptores  $A_{2A}$  em grupamentos respiratórios da superfície ventral do tronco encefálico contendo neurônios GABAérgicos, como o complexo Böttinger, formação reticular, medula ventrolateral caudal e rostral (Zaidi et al., 2006). Além disso, neste mesmo trabalho, foi encontrada uma subpopulação de neurônios GABAérgicos que se projetam para núcleos motores do nervo frênico e possuem a expressão de RNA mensageiro

(mRNA) dos receptores  $A_{2A}$  (Zaidi et al., 2006). Portanto, uma possível explicação para essas alterações respiratórias é de que a adenosina agindo em receptores  $A_{2A}$  exerce uma modulação inibitória sobre a atividade inspiratória basal via mecanismos GABAérgicos em vias neurais no tronco encefálicas envolvidas com o controle da atividade inspiratória, e isso explicaria a razão pela qual na ausência dos receptores  $A_{2A}$  a frequência respiratória dos camundongos aumentou significativamente. No entanto, mais estudos são necessários para explorar a essa possibilidade e esclarecer os mecanismos subjacentes ao aumento na frequência respiratória na ausência dos receptores do subtipo  $A_{2A}$ .

Acoplada aos registros dos parâmetros respiratórios, as medidas fornecidas pela gasometria arterial complementam a caracterização do perfil respiratório dos animais, proporcionando uma análise funcional dos gases sanguíneos e do estado metabólico dos camundongos *wild-types* e  $A_{2A}$  *knockouts* antes e após a exposição à HM. As medições de pH,  $pO_2$ ,  $PCO_2$  e bicarbonato sanguíneos são utilizadas no monitoramento de perturbações respiratórias e do equilíbrio ácido-base. Nós observamos que após a exposição à HM houve uma redução da  $pCO_2$  e um aumento da  $pO_2$  arterial em ambos os grupos de camundongos *wild-type* e  $A_{2A}$  *knockout*. A ativação dos quimiorreceptores periféricos promovida pela exposição à hipóxia desencadeia uma resposta de aumento da atividade respiratória (taquipnéia) com o objetivo de aumentar a captação de oxigênio do ar atmosférico em uma situação de baixa  $FiO_2$  (Machado, 2001; Barros et al., 2002). Vale ressaltar que a medida da gasometria nos animais após a HM foi realizada somente após a retirada dos animais da câmara de hipóxia e finalizados os registros dos parâmetros respiratórios, i.e, alguns minutos após os animais terem retornados a condição de normóxia. Portanto, o aumento na ventilação pulmonar promovido pela ativação continuada dos quimiorreceptores periféricos em resposta a exposição a HM por 24 h pode explicar esse aumento da  $pO_2$  e redução da  $pCO_2$  no sangue arterial dos camundongos quando estes animais retornaram a  $FiO_2$  de 21%. Ainda que a ventilação pulmonar não tenha apresentado aumento significativo nos animais  $A_{2A}$  *knockouts* após a HM, o aumento observado no volume corrente nesses animais pode impactar na ventilação pulmonar de modo a contribuir para o aumento da taxa de eliminação do  $CO_2$  e de captação de  $O_2$ . A redução da  $pCO_2$  como consequência de um aumento na resposta

ventilatória à hipóxia poderia promover um desequilíbrio ácido-base, caracterizando um quadro de alcalose respiratória. No entanto, não foi observado alteração de pH sanguíneo nos camundongos *wild-types* e *A<sub>2A</sub> knockouts* após a HM. A concentração de bicarbonato no sangue arterial dos camundongos *wild-types* e *A<sub>2A</sub> knockouts* após a HM reduziu significativamente, o que por sua vez, poderia indicar uma compensação metabólica em resposta a redução na pCO<sub>2</sub>. Uma maior excreção de bicarbonato pelos rins compensaria a alcalose respiratória desencadeada pela hiperventilação e poderia explicar o pH normal nos camundongos após a HM. Em homens adultos saudáveis a exposição por 26 horas em uma câmara hipobárica que simula a hipóxia de 3100 metros de altitude (Pressão barométrica de 530 mm Hg; P<sub>i</sub>O<sub>2</sub> 95 mmHg e P<sub>i</sub>CO<sub>2</sub> de 30 a 33 mmHg) promoveu aumento na excreção renal de bicarbonato ao longo de todo o período, demonstrando que os mecanismos renais contribuem de forma significativa e relativamente rápida para a compensação do pH plasmático durante a hipocapnia no homem (Gledhill et al., 1975). Em cães, o aumento na excreção de bicarbonato teve início na primeira hora de exposição à hipóxia com 10% de oxigênio e progrediu ao longo do período de 3 horas de exposição (Höhne et al., 2002). No entanto, para confirmar que a redução da concentração de bicarbonato no sangue arterial dos camundongos após a HM representa um mecanismo compensatório dos rins, mais estudos serão necessários para determinar o decurso temporal do aumento da excreção renal de bicarbonato nos camundongos submetidos ao protocolo de 24h de HM. Com relação à concentração de lactato no sangue arterial, essa medida pode ser utilizada para o monitoramento de hipóxia tecidual, uma vez que níveis elevados de lactato podem ser observados em resposta à hipóxia. A hiperlactemia é um indicador para hipoperfusão tecidual em diversas patologias, como sepse, trauma e insuficiência cardíaca (Blow et al., 1999; Paladino et al., 2008; Jones et al., 2009). Após a HM não foi observado um quadro de hiperlactemia nos camundongos *wild-types* e *A<sub>2A</sub> knockouts*, indicando que a HM não alterou a perfusão dos tecidos.

### **6.3 Efeitos da HM sobre as características eletrofisiológicas de neurônios do NTS de camundongos *A<sub>2A</sub> knockouts* e seus respectivos controles Balb/c *Wild-type***

Os registros eletrofisiológicos de neurônios do NTS de camundongos *wild-types* e *A<sub>2A</sub> knockouts*, mantidos em normóxia ou submetidos à HM, por meio da técnica de *Whole cell patch-clamp* mostraram que o potencial de membrana em repouso e a resistência de entrada da membrana foi semelhante entre os grupos experimentais, indicando que a exposição à HM ou a ausência da expressão dos receptores *A<sub>2A</sub>* não alteram as propriedades passivas da membrana dos neurônios do NTS. Estes achados no camundongo da linhagem Balb/c estão de acordo com estudos anteriores do nosso laboratório em ratos WRP, nos quais o protocolo de HM também não promoveu alterações nas propriedades passivas dos neurônios do NTS (Accorsi-Mendonça et al., 2015; Lima-Silveira et al., 2019). De forma semelhante, a exposição a um protocolo crônico de hipóxia mantida (1 semana) também não afetou as propriedades passivas de neurônios do NTS de ratos que estabelecem contato sináptico direto com as aferências dos quimiorreceptores (Zhang et al., 2008, 2009).

As propriedades ativas dos neurônios do NTS foram avaliadas por meio da injeção de correntes despolarizantes de amplitudes crescentes nos neurônios por meio do eletrodo de registro. Foi quantificado o número de potenciais de ação disparados em resposta à injeção dessas correntes, de modo que essa análise nos permite verificar possíveis alterações na excitabilidade dos neurônios. Mudanças na excitabilidade neuronal podem estar relacionadas as alterações em correntes iônicas geradas por canais voltagem-dependentes. Em ratos, a exposição à HM aumentou o número de potenciais de ação disparados pelos neurônios do NTS em resposta à injeção de correntes despolarizantes, e reduziu o *delay* (atraso) de excitação entre o início do estímulo e o primeiro disparo, demonstrando assim um aumento na excitabilidade desses neurônios, que por sua vez, foi causada por uma redução nas correntes de saída de potássio (*I<sub>KA</sub>*; Accorsi-Mendonça et al., 2015). No entanto, em neurônios do NTS que se projetam para a região ventro-lateral do bulbo (NTS-VLM) de ratos expostos ao mesmo protocolo de HM não foram observadas alterações no número de potenciais de ação disparados em resposta à injeção de correntes despolarizantes (Lima-Silveira et al., 2019), sugerindo que a HM pode modular de

forma distinta as diferentes subpopulações neuronais localizadas no NTS. No presente estudo, o disparo de potenciais de ação em resposta ao aumento na amplitude das correntes injetadas foi semelhante entre os grupos experimentais, sugerindo que a exposição à HM ou a ausência dos receptores A<sub>2A</sub> não altera a excitabilidade dos neurônios do NTS de camundongos. Apesar dos camundongos A<sub>2A</sub> *knockouts* submetidos a HM terem apresentado uma frequência de disparo de potenciais de ação significativamente maior na condição basal (0 pA de corrente injetada durante 2s), o que poderia indicar maior atividade espontânea desses neurônios, a frequência de disparo de potenciais de ação nos registros em modo *current-clamp* (1 minuto) não foi diferente entre os grupos experimentais.

Com relação à transmissão sináptica glutamatérgica, as correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas (sEPSCs) foram avaliadas na presença de antagonista de receptores GABA<sub>A</sub> (picrotoxina). A liberação espontânea de neurotransmissores pode ocorrer como resultado de mecanismos dependentes do disparo de potenciais de ação ou por meio de mecanismos independentes de potencial de ação, relacionados ao processo espontâneo de fusão de vesículas presentes na membrana pré-sináptica (Sara et al., 2005; Ramirez & Kavalali, 2011; Smith et al., 2012). Estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que a HM em ratos promove aumento na frequência das sEPSCs por meio de mecanismos dependentes de potencial de ação, uma vez que esse aumento foi abolido após o bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes com TTX (Accorsi-Mendonça et al., 2015; Lima-Silveira et al., 2019). No entanto, no presente estudo não foram observadas alterações na frequência e na amplitude das sEPSCs entre os grupos experimentais, sugerindo que a exposição à HM ou a ausência dos receptores A<sub>2A</sub> não altera a transmissão excitatória espontânea no NTS de camundongos.

Para um melhor entendimento da neurotransmissão glutamatérgica presente no NTS de camundongos submetidos à HM ou na ausência dos receptores A<sub>2A</sub> da adenosina, foram avaliadas as correntes pós-sinápticas excitatórias evocadas pela estimulação das fibras aferentes do Trato Solitário (TS-eEPSCs). Em um primeiro protocolo realizamos estímulos de intensidades crescentes de 10 a 100 V com o objetivo de avaliar para cada neurônio a intensidade de estímulo que evoca a amplitude máxima das correntes a ser utilizada no protocolo seguinte (Accorsi-

Mendonça et al., 2011; Lima-Silveira et al., 2019). Dessa forma, podemos afirmar que as TS-eEPSCs avaliadas correspondem a resposta máxima de cada neurônio registrado. Com este protocolo também observamos que não houve diferença na intensidade de estímulo que gera as amplitudes máximas das TS-eEPSC entre os grupos experimentais. No entanto, na intensidade de estímulo de 40 V os neurônios dos camundongos do grupo Balb/c submetidos à HM responderam com amplitude relativa das TS-eEPSC significativamente maior que os neurônios de camundongos controle mantidos em normóxia. A intensidade de estímulo de 40 V foi capaz de desencadear 46% da resposta máxima dos neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT submetidos à HM, enquanto esta mesma intensidade evocou apenas 20% da resposta máxima dos neurônios do grupo controle normóxia. Esses resultados evidenciam a importância de se determinar e utilizar a intensidade de estímulo que gera a resposta máxima de cada neurônio quando se deseja avaliar a neurotransmissão excitatória evocada em neurônios do NTS. Caso optássemos por fixar uma intensidade de estímulo e utilizá-la em todos os grupos experimentais, como por exemplo, 40 V, estaríamos perdendo informações sobre as TS-eEPSCs justamente porque os neurônios apresentam respostas diferentes. Utilizando a intensidade de estímulo que gera a amplitude máxima das correntes colocamos todos os neurônios no mesmo patamar e a partir dessa análise podemos sugerir que alterações na amplitude das TS-eEPSCs são decorrentes da exposição à HM ou da ausência dos receptores  $A_{2A}$ .

Em condições de normóxia, a amplitude das TS-eEPSCs foi semelhante entre os neurônios dos camundongos dos grupos Balb/c *wild-type* e  $A_{2A}$  *knockout*. No entanto, alterações significativas foram observadas na transmissão sináptica glutamatérgica em resposta à HM nos camundongos Balb/c *wild-types*. A exposição ao protocolo de HM promoveu um aumento significativo na amplitude das TS-eEPSCs dos camundongos Balb/c *wild-types* quando comparados com seu grupo controle normóxia. Esse aumento na amplitude das TS-eEPSCs também foi observado anteriormente nos ratos expostos ao mesmo protocolo de HM, tanto em neurônios não marcados no NTS (Accorsi-Mendonça et al., 2015) quanto em neurônios do NTS que se projetam para a região ventro-lateral do bulbo (NTS-VLM) (Lima-Silveira et al., 2019), e em ratos expostos a hipóxia crônica (1 semana; Zhang et al., 2008, 2009).

Em contrapartida, esse aumento na transmissão glutamatérgica não foi observado nos neurônios dos camundongos *A<sub>2A</sub> knockouts* expostos à HM quando comparados com seu grupo controle normóxia.

Importante ressaltar que apesar do observado aumento da transmissão sináptica excitatória nos neurônios do NTS de camundongos Balb/c WT submetidos à HM, o número de potenciais de ação disparados em resposta à estimulação das fibras aferentes do TS não foi diferente quando comparados com os camundongos controles mantidos em normóxia. Esses achados diferem do observado anteriormente em ratos, nos quais a exposição à HM reduziu o percentual de falhas na indução de potenciais de ação em resposta a estimulação das fibras aferentes do TS, indicando que após a HM os estímulos despolarizantes são mais eficientes para produzir potencial de ação (Accorsi-Mendonça et al., 2015). Ainda que a neurotransmissão excitatória se apresente aumentada no NTS de camundongos após a HM, isso não resulta em um disparo significativamente maior de potenciais de ação pelos neurônios. Mais estudos serão necessários para a nossa melhor compreensão dos mecanismos subjacentes que limitam o disparo de potenciais de ação evocados pelo TS após a HM.

O aumento observado na amplitude das TS-eEPSCs dos neurônios do NTS de camundongos Balb/c *wild-types* submetidos à HM pode ser decorrente de alterações em diferentes mecanismos que determinam a transmissão sináptica, dentre eles: 1) alterações na liberação de neurotransmissores pelos terminais pré-sinápticos, 2) alterações nos mecanismos moduladores astrocíticos sobre a atividade sináptica e 3) modificações na densidade ou condutância dos receptores presentes na membrana pós-sináptica (Del Castillo & Katz, 1954; Zhou et al., 1997). Investigamos a primeira possibilidade para explicar o aumento na amplitude das TS-eEPSCs nos camundongos Balb/c WT após a HM por meio das análises do decaimento na amplitude das TS-eEPSCs em resposta a uma série de 5 estímulos consecutivos (depressão de curto prazo), da razão de pulso pareado (PPR) e do inverso do quadrado do coeficiente de variação ( $1/CV^2$ ) da amplitude dessas correntes.

O protocolo experimental no qual realizamos os 5 estímulos consecutivos do TS na frequência de 10 Hz nos permite avaliar a depressão de curto prazo, um processo de plasticidade sináptica de curta duração que diz respeito a redução da amplitude das correntes evocadas quando são aplicados estímulos sequenciais e que

ocorre exclusivamente por mecanismos pré-sinápticos, não sendo influenciado por alterações nos receptores pós-sinápticos (Chen et al., 1999). A análise do valor de PPR revela possíveis efeitos pré e/ou pós-sinápticos, de forma que se determinado estímulo atua por meio de mecanismos pré-sinápticos para aumentar ou diminuir a probabilidade de liberação do neurotransmissor pelos terminais pré-sinápticos, então a razão entre a amplitude da segunda corrente pós-sináptica excitatória (EPSC) e a amplitude da primeira EPSC ( $EPSC2/EPSC1$ ) será alterada. Por outro lado, se o estímulo age por meio de mecanismos pós-sinápticos, a amplitude da EPSC1 e da EPSC2 aumentará ou diminuirá no mesmo grau e, portanto, sua proporção ( $EPSC2/EPSC1$ ) não será alterada (Kline et al., 2002; Zucker & Regehr, 2002; Sekizawa et al., 2003). O terceiro parâmetro que utilizamos para avaliar possíveis alterações pré-sinápticas em resposta à exposição ao protocolo de HM foi o  $1/CV^2$ . Alterações neste parâmetro podem indicar um aumento ou redução no número de sinapses ativas ( $n$ ) ou na probabilidade de liberação de neurotransmissores pelo terminal pré-sináptico (Pr) (Bekkers & Stevens, 1990; Malinow & Tsien, 1990).

No entanto, não foram observadas alterações no decaimento das TS-eEPSCs e tampouco dos parâmetros de PPR e  $1/CV^2$  entre os diferentes grupos experimentais, sugerindo que a exposição à HM não altera os parâmetros relacionados aos mecanismos pré-sinápticos. Portanto, o aumento na transmissão sináptica glutamatérgica observado nos camundongos Balb/c *wild-types* submetidos à HM não deve ser resultado de um aumento na liberação de glutamato pelas fibras aferentes do TS. Esses resultados estão de acordo com o observado anteriormente em estudos do nosso laboratório nos neurônios do NTS de ratos, nos quais a exposição à HM também não promoveu alteração no decaimento das TS-eEPSCs, e nos parâmetros de PPR o  $1/CV^2$  (Accorsi-Mendonça et al., 2015, Lima-Silveira et al., 2019). Interessante que em ratos expostos a um protocolo de hipóxia crônica o aumento observado na transmissão sináptica excitatória ocorreu devido tanto a mecanismos pré-sinápticos quanto pós-sinápticos (Zhang et al., 2009), evidenciando que diferentes protocolos de hipóxia podem ativar mecanismos distintos de plasticidade sináptica que contribuem para as alterações na neurotransmissão.

Portanto, nossos achados sugerem que: 1) em condições de normóxia os receptores  $A_{2A}$  da adenosina não participam da modulação da transmissão



glutamatérgica do NTS de camundongos da linhagem Balb/c, uma vez que não foram observadas diferenças na amplitude das TS-eEPSCs entre os camundongos Balb/c *wild-types* e *A<sub>2A</sub> knockouts* mantidos em normóxia, 2) a exposição à HM promove aumento da transmissão glutamatérgica evocada no NTS de camundongos Balb/c e esse aumento não parece ser mediado por mecanismos pré-sinápticos, e 3) os receptores *A<sub>2A</sub>* da adenosina são importantes para o aumento da transmissão glutamatérgica que ocorre após exposição à HM, uma vez que na ausência desses receptores o efeito da HM sobre as TS-eEPSCs foi abolido. A partir dessas observações surgem algumas questões importantes que discutiremos em seguida. A primeira delas refere-se às razões pelas quais em condições de normóxia os receptores *A<sub>2A</sub>* não exercem um papel importante na modulação da transmissão excitatória glutamatérgica, mas que após a exposição à HM passam a exercer.

Em condições fisiológicas, a concentração de adenosina presente no meio extracelular é relativamente baixa, na faixa de nanomolar. No entanto, um estímulo bem conhecido por promover um aumento significativo nos níveis de adenosina extracelular, passando para uma faixa de micromolar, é a exposição a desafios hipóxicos (Snyder, 1985; Cunha, 2001; Borea et al., 2018; Liu et al., 2019). Gourine e colaboradores (2002) observaram, utilizando um sensor 'mark-1' baseado em enzimas sensíveis à adenosina, que a exposição à hipóxia aguda induzida pela ventilação do animal com 100% de nitrogênio por 60 segundos promoveu um rápido e significativo aumento dos níveis de adenosina no NTS de ratos anestesiados. Além disso, no contexto do NTS, além dos receptores *A<sub>2A</sub>*, já foi descrita a expressão de outro subtipo de receptor para adenosina, os receptores do subtipo *A<sub>1</sub>* (Scislo et al., 2001; Minic et al., 2018; Tian et al., 2020). Uma vez que adenosina possui maior afinidade pelos receptores do subtipo *A<sub>1</sub>*, seguidos pelos receptores *A<sub>2A</sub>* (Fredholm et al., 2001; Borea et al., 2018), sugerimos que em normóxia, com níveis relativamente baixos de adenosina no meio extracelular, a adenosina disponível se liga preferencialmente em seus receptores *A<sub>1</sub>*, predominando os efeitos celulares desencadeados pela ativação desse subtipo de receptor. No entanto, frente a um desafio hipóxico mantido a concentração de adenosina se eleva significativamente no meio extracelular de modo que a maior disponibilidade dessa purina leva também a uma maior ativação dos receptores *A<sub>2A</sub>*, fazendo com que os efeitos desencadeados pela ativação desse

subtipo de receptor se tornem relevantes na modulação da transmissão sináptica presente no NTS.

Os receptores  $A_1$  são acoplados a proteína G inibitória ( $G_i$ ) de modo que os efeitos modulatórios inibitórios da adenosina são associados à ativação desses receptores localizados nos terminais pré-sinápticos. É bem descrito que a ativação dos receptores  $A_1$  presentes nos terminais pré-sinápticos promove redução na amplitude das correntes pós-sinápticas excitatórias (EPSCs) glutamatérgicas por meio da ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e redução da atividade de canais para cálcio, reduzindo assim a excitabilidade neuronal e inibindo a liberação das vesículas contendo glutamato, respectivamente (Rudolphi et al., 1992; Martín et al., 2007; Rossi et al., 2007; Sebastião & Ribeiro., 2009; Borea et al., 2018). No NTS de ratos, um estudo mostrou por meio da técnica de imuno-histoquímica, que os receptores  $A_1$  não se colocizam com neurônios GABAérgicos, mas sim em neurônios que recebem projeções GABAérgicas, os quais os autores sugerem ser neurônios glutamatérgicos (Minic et al., 2018). Nesse contexto, nós sugerimos que em condições fisiológicas a adenosina se ligando preferencialmente aos seus receptores do subtipo  $A_1$  ela pode exercer um papel no controle da excitabilidade dos neurônios glutamatérgicos presentes no NTS. No entanto, sob desafio hipóxico, a ativação dos receptores  $A_{2A}$  como consequência dos elevados níveis de adenosina extracelular pode contribuir para o aumento da transmissão excitatória glutamatérgica. Uma vez que em uma situação de desafio hipóxico o organismo precisa responder de forma rápida e eficaz com vistas a preservar o aporte de oxigênio para os diversos órgãos e tecidos, mecanismos modulatórios que contribuam para o aumento da transmissão sináptica excitatória do NTS, local onde as aferências dos quimiorreceptores são processadas, podem ser determinantes para desencadear as respostas autonômicas e respiratórias indispensáveis para a sobrevivência.

Em um estudo de Zhang et al. (2018), a exposição aguda à hipóxia tecidual (3 e 5 minutos) promoveu corrente de saída de potássio mediada pelos canais  $K_{ATP}$  em neurônios do NTS de ratos. No entanto, a exposição dos animais a hipóxia crônica mantida (HCM - 1 semana) atenuou a corrente de potássio mediada pelos canais  $K_{ATP}$  devido a uma regulação negativa (*down-regulation*) das subunidades do canal  $K_{ATP}$  neuronal, o que por sua vez poderia contribuir para o aumento da excitabilidade

neuronal e conseqüentemente para as respostas quimiorreflexas aumentadas observadas após a HCM. Um mecanismo proposto pelos autores desse estudo para explicar a regulação negativa induzida dos canais  $K_{ATP}$  neuronais pela hipóxia crônica é o aumento da concentração de adenosina extracelular que ocorre após exposição à hipóxia, uma vez que já foi demonstrado que a adenosina induz *down-regulation* dos canais  $K_{ATP}$  por uma via dependente da ativação da proteína quinase C (PKC) (Hu et al., 2003). Tendo em vista que os receptores do subtipo  $A_1$  são conhecidos por promover abertura dos canais  $K_{ATP}$  e que os receptores  $A_{2A}$  podem levar à ativação da PKC (Auchampach & Gross, 1993; Fresco et al., 2004; Andoh et al., 2006; Borea et al., 2018; Mei et al., 2018), tais achados corroboram com as nossas explicações para a dinâmica de ativação dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ . Em condições fisiológicas e no estágio inicial em que adenosina começa a se elevar no meio extracelular, como no caso da hipóxia tecidual aguda utilizada por Zhang e colaboradores (2018), os efeitos modulatórios exercidos pela adenosina seriam predominantemente mediados pelos receptores  $A_1$ , de modo a exercer papel importante no controle da excitabilidade neuronal. No entanto, à medida que a concentração de adenosina se eleva ainda mais no meio extracelular e se mantém elevada como resultado de uma exposição mais prolongada à hipóxia mantida, os efeitos modulatórios da adenosina via ativação de seus receptores  $A_{2A}$  passariam a ser mais relevantes.

Além dos aspectos mencionados acima, evidências recentes documentaram que os receptores da adenosina podem formar complexos proteicos funcionalmente dependentes com outros receptores, denominados heterodímeros (Navarro et al., 2016). Os heterodímeros  $A_1$ - $A_{2A}$  já foram descritos em algumas regiões e foi proposto que essas entidades representam um sensor de superfície celular de concentração de adenosina, nos quais a baixa concentração de adenosina estimula preferencialmente o protômero  $A_1$  do heterômero, o que inibiria a transmissão sináptica. Por outro lado, a alta concentração de adenosina ativa a unidade dos receptores  $A_{2A}$  e essa ativação promove o bloqueio dos efeitos mediados pela unidade  $A_1$  via cascatas intracelulares envolvendo segundos mensageiros dependentes da sinalização da proteína Gs, e resulta em uma potencialização da transmissão sináptica (Ciurela et al., 2006; Brugarolas et al., 2014; Navarro et al., 2016; Borea et al., 2018; Lanznaster et al., 2019). Se esses complexos estão presentes no NTS e

participam da modulação da transmissão excitatória em condições fisiológicas ou em desafios hipóxicos ainda não temos evidências experimentais, mas o fato é que essas entidades acrescentam ainda mais complexidade no estudo da dinâmica do sistema de modulação da adenosina no SNC.

Outra questão importante que surge a partir dos achados do presente estudo, indicando que os receptores  $A_{2A}$  da adenosina são importantes para o aumento da transmissão glutamatérgica que ocorre após exposição à HM, é aquela relacionada à origem dessa adenosina presente no meio extracelular. A adenosina pode ser liberada diretamente por neurônios e astrócitos presentes no SNC, via transportadores de nucleosídeos (denominados ENTs – “Equilibrative nucleoside transportes”), os quais permitem a passagem livre de adenosina através da membrana celular conforme seu gradiente de concentração (Anderson et al., 1999; Nagai et al., 2005; Peng et al., 2005; Takana et al., 2011; Li et al., 2013; Borea et al., 2018). Além disso, a adenosina também pode ser gerada no meio extracelular a partir da desfosforilação do ATP liberado pela ação das enzimas ecto-nucleotidases (Melani et al., 2012; Zimmermann et al., 2012; Chu et al., 2014; Jackson et al., 2017). No hipocampo pelo menos dois mecanismos distintos são responsáveis pela liberação de adenosina, tendo sido descrito tanto a sua liberação via ENT's quanto via exocitose de ATP e posterior metabolização em adenosina (Wall e Dale, 2013; Diez et al. 2017).

Estudos de Martin e colaboradores (2007) mostraram que a exposição de cultura de astrócitos e fatias do hipocampo de ratos à hipóxia tecidual aguda promove liberação de adenosina por meio de um mecanismo independente da atividade dos ENT's, uma vez que essa liberação não é abolida na presença de bloqueadores para os transportadores, e independente do metabolismo extracelular do ATP, uma vez que o bloqueio das ecto-nucleotidases não produziu alterações nos níveis de adenosina liberados em resposta ao estímulo hipóxico. Além disso, em camundongos geneticamente modificados que expressavam dn-SNARE, uma isoforma dominante não funcional da proteína SNARE responsável pelo processo de fusão das vesículas contendo transmissores com a membrana plasmática, a liberação de adenosina em resposta à hipóxia aguda não foi prejudicada sugerindo um mecanismo não-vesicular para a liberação desse nucleosídeo. Estes trabalhos demonstram a complexidade e

diversidade dos mecanismos responsáveis pelo aumento da concentração de adenosina no meio extracelular em resposta a um estímulo ou condição experimental.

Em um estudo do nosso laboratório foi demonstrado que a estimulação das fibras aferentes do Trato Solitário leva ao aumento da concentração de ATP extracelular no NTS de ratos em condições de normóxia (Accorsi-Mendonça et al., 2013). Ao investigar os mecanismos subjacentes a esse aumento foi observado que o glutamato liberado pelas aferências dos quimiorreceptores promove a liberação de ATP pelos astrócitos do NTS via ativação de receptores glutamatérgicos do tipo não-NMDA presentes na membrana astrocítica (Accorsi-Mendonça et al., 2013). Em resposta à HM, a ativação mantida das vias aferentes que compõe o quimiorreflexo periférico pode levar ao aumento da liberação de ATP pelos astrócitos do NTS. Portanto, nós sugerimos que pelo menos uma das origens da adenosina presente no NTS e que contribui para o observado aumento da transmissão glutamatérgica que ocorre após exposição à HM ocorre por meio do metabolismo extracelular do ATP.

A terceira questão que surge a partir dos achados do presente estudo refere-se ao mecanismo pelo qual os receptores  $A_{2A}$  levam ao aumento da amplitude das TS-eEPSCs nos camundongos Balb/c *wild-types* submetidos à HM. Nós observamos que esse aumento da transmissão sináptica excitatória em resposta à HM não parece ser mediado por alterações pré-sinápticas, apontando assim para possíveis mecanismos pós-sinápticos e alterações envolvendo a modulação astrocítica sobre a atividade sináptica como sendo os responsáveis pelo aumento na amplitude das TS-eEPSCs. Os receptores  $A_{2A}$  já foram descritos em terminais pré-sinápticos (Orru et al., 2011; Rebola et al., 2005; Schiffmann et al., 2007) e em neurônios piramidais do hipocampo um estudo mostrou que a ativação desses receptores presentes na membrana pós-sináptica facilita as correntes mediadas pelos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA (Dias & Sebastião, 2012). Os receptores AMPA são tetrâmeros compostos por quatro subunidades diferentes (GluR1-GluR4), tendo sido demonstrado que essas subunidades podem ser reguladas por mecanismos de fosforilação dependentes da atividade da proteína quinase A (PKA) (Derkach et al., 1999; Lee et al., 2003; Greger et al., 2017; Kamalova & Nakagawa, 2021). No trabalho de Dias & Sebastião (2012) os autores observaram que o aumento das correntes glutamatérgicas do tipo AMPA via ativação dos receptores  $A_{2A}$  ocorre por um

mecanismo dependente da ativação da PKA, que por sua vez se correlacionou com um aumento na expressão das subunidades GluR1 na membrana dos neurônios.

O aumento da transmissão sináptica excitatória via receptores A<sub>2A</sub> também pode se dar via ativação desses receptores presentes na membrana dos astrócitos. Foi demonstrado que em culturas de astrócitos a aplicação de CGS 21680, um agonista dos receptores A<sub>2A</sub>, inibiu a captação de glutamato, efeito este que foi prevenido pelo SCH 58261, um antagonista A<sub>2A</sub>, e abolido em culturas de astrócitos obtidas a partir de camundongo *knockout* para os receptores A<sub>2A</sub> (Matos et al., 2012). Posteriormente, um trabalho deste mesmo grupo de pesquisadores (Matos et al., 2013) mostrou por meio de uma combinação de ensaios neuroquímicos que a ativação dos receptores A<sub>2A</sub> astrocíticos diminui a atividade da bomba de sódio-potássio ATPase (NKA), inibindo a captação de glutamato pelos transportadores de glutamato astrocíticos-1 (GLT-1), uma vez que o transporte de glutamato via GLT-1 é dependente do gradiente eletroquímico de sódio estabelecido pela NKA (Anderson & Swanson, 2000; Danbolt, 2001; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Além disso, em camundongos *knockouts* seletivos para os receptores A<sub>2A</sub> astrocíticos os autores observaram um aumento da captação de glutamato que foi simultâneo a um aumento da atividade da NKA nas regiões do estriado e córtex cerebral (Matos et al., 2013). Em um modelo de esquizofrenia, foi evidenciado que a deleção seletiva dos receptores A<sub>2A</sub> astrocíticos resultou em alterações significativas na homeostase do glutamato do Núcleo Accumbens, contribuindo para os fenótipos psicomotores e cognitivos observados nesse modelo experimental (Matos et al., 2015).

Portanto, os receptores A<sub>2A</sub> astrocíticos têm sido apontados como um importante mecanismo de controle da concentração de glutamato extracelular, de modo a exercerem uma modulação inibitória sobre a captação de glutamato pelos astrócitos, promovendo assim o aumento da disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica. No NTS, região que apresenta uma elevada densidade de sinapses tripartites, as quais são constituídas por neurônios pré- e pós-sinápticos e envolvidas por processos gliais periféricos (Lachamp et al., 2006; Pecchi et al., 2007; Tashiro & Kawai, 2007; Chounlamountry & Kessler, 2011), os receptores A<sub>2A</sub> astrocíticos podem representar um mecanismo relevante no controle da excitabilidade neuronal. A ligação da adenosina nesses receptores pode ser uma das causas do

observado aumento da transmissão glutamatérgica que ocorre no NTS de camundongos expostos à HM e pode explicar a razão pela qual esse aumento não é observado nos camundongos *A<sub>2A</sub> knockouts*. No entanto, mais estudos serão necessários para confirmar a expressão e o significado funcional dos receptores *A<sub>2A</sub>* nos astrócitos do NTS.

#### **6.4 Possíveis relações entre as alterações funcionais observadas nos camundongos *knockouts* para os receptores *A<sub>2A</sub>* e as alterações eletrofisiológicas observadas nos neurônios do NTS desses animais**

Algumas limitações relevantes dificultam o estabelecimento de correlações diretas entre os fenômenos funcionais registrados em animais inteiros e aqueles resultados obtidos a partir de registros eletrofisiológicos em fatias do tronco encefálico. No contexto do presente estudo, o principal resultado obtido durante a caracterização cardiovascular e respiratória dos camundongos *knockouts* para os receptores da adenosina do subtipo *A<sub>2A</sub>* foi aquele relativo ao aumento significativo da frequência respiratória basal em condições de normóxia. Por outro lado, o principal resultado obtido a partir dos registros eletrofisiológicos de neurônios do NTS foi aquele relativo ao aumento da transmissão glutamatérgica que ocorre após exposição à HM, o qual nos camundongos *knockouts A<sub>2A</sub>* é abolido. Ainda que numa análise inicial os resultados destacados acima possam sugerir uma possível participação dos receptores *A<sub>2A</sub>* na modulação das vias neurais envolvidas com o controle da respiração, entendemos que ainda não é possível estabelecer uma relação direta entre esses fenômenos especialmente devido ao fato de que os neurônios registrados no NTS não tiveram as suas projeções identificadas por meio de marcadores retrógrados. Dessa forma, novos estudos deverão ser realizados com vistas a um melhor entendimento sobre a função dos receptores *A<sub>2A</sub>* nos neurônios do NTS integrantes das vias neurais envolvidas com o controle da respiração.

## 7. CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos no presente trabalho a partir do uso dos animais *knockouts* para os receptores  $A_{2A}$ , indica que:

- Os receptores  $A_{2A}$  da adenosina não exercem um papel relevante nas respostas autonômicas à ativação dos quimiorreceptores periféricos em camundongos da linhagem Balb/c;
- Os receptores  $A_{2A}$  da adenosina são relevantes na geração e/ou modulação da atividade respiratória basal em camundongos da linhagem Balb/c;
- A exposição à HM facilita a transmissão glutamatérgica no NTS de camundongos da linhagem Balb/c. Além disso, o aumento da transmissão glutamatérgica que ocorre após exposição à HM não é mediado por mecanismos pré-sinápticos.
- Em condições de normóxia os receptores  $A_{2A}$  da adenosina não participam da modulação da transmissão glutamatérgica do NTS de camundongos da linhagem Balb/c;
- Os receptores  $A_{2A}$  da adenosina possuem importante papel no aumento da transmissão glutamatérgica que ocorre no NTS de camundongos da linhagem Balb/c após exposição à HM.



## 8. REFERÊNCIAS

- Accorsi-Mendonça, D., Almado, C. E., Bonagamba, L. G., Castania, J. A., Moraes, D. J., & Machado, B. H. (2015). Enhanced Firing in NTS Induced by Short-Term Sustained Hypoxia Is Modulated by Glia-Neuron Interaction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(17), 6903–6917. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4598-14.2015>.
- Accorsi-Mendonça, D., Bonagamba, L., & Machado, B. H. (2019). Astrocytic modulation of glutamatergic synaptic transmission is reduced in NTS of rats submitted to short-term sustained hypoxia. *Journal of neurophysiology*, 121(5), 1822–1830. <https://doi.org/10.1152/jn.00279.2018>.
- Accorsi-Mendonça, D., Bonagamba, L. G., Leão, R. M., & Machado, B. H. (2009). Are L-glutamate and ATP cotransmitters of the peripheral chemoreflex in the rat nucleus tractus solitarius?. *Experimental physiology*, 94(1), 38–45. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.043653>.
- Accorsi-Mendonça, D., Castania, J. A., Bonagamba, L. G., Machado, B. H., & Leão, R. M. (2011). Synaptic profile of nucleus tractus solitarius neurons involved with the peripheral chemoreflex pathways. *Neuroscience*, 197, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.054>.
- Accorsi-Mendonça, D., Leão, R. M., Aguiar, J. F., Varanda, W. A., & Machado, B. H. (2007). Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract of rat brain stem slices. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 292(1), R396–R402. <https://doi.org/10.1152/ajprequ.00776.2005>.
- Accorsi-Mendonça, D., & Machado, B. H. (2013). Synaptic transmission of baro- and chemoreceptors afferents in the NTS second order neurons. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, 175(1-2), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2012.12.002>.
- Aicher, S. A., Saravay, R. H., Cravo, S., Jeske, I., Morrison, S. F., Reis, D. J., & Milner, T. A. (1996). Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. *The Journal of comparative neurology*, 373(1), 62–75. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960909\)373:1<62::AID-CNE6>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960909)373:1<62::AID-CNE6>3.0.CO;2-B).
- Anderson, C. M., & Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 32(1), 1–14.
- Anderson, C. M., & Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 32(1), 1–14.
- Anderson, C. M., Xiong, W., Geiger, J. D., Young, J. D., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Parkinson, F. E. (1999). Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain. *Journal of neurochemistry*, 73(2), 867–873. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730867.x>.

- Andoh, T., Ishiwa, D., Kamiya, Y., Echigo, N., Goto, T., & Yamada, Y. (2006). A1 adenosine receptor-mediated modulation of neuronal ATP-sensitive K channels in rat substantia nigra. *Brain research*, 1124(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.085>.
- Andresen, M. C., & Yang, M. Y. (1990). Non-NMDA receptors mediate sensory afferent synaptic transmission in medial nucleus tractus solitarius. *The American journal of physiology*, 259(4 Pt 2), H1307–H1311. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.4.H1307>.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*, 22(5), 208–215. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01349-6).
- Armbruster, M., Hanson, E., & Dulla, C. G. (2016). Glutamate Clearance Is Locally Modulated by Presynaptic Neuronal Activity in the Cerebral Cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(40), 10404–10415. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2066-16.2016>.
- Auchampach, J. A., & Gross, G. J. (1993). Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. *The American journal of physiology*, 264(5 Pt 2), H1327–H1336. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.264.5.H1327>.
- Barraco, R., el-Ridi, M., Ergene, E., Parizon, M., & Bradley, D. (1992). An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. *Brain research bulletin*, 29(6), 703–765. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(92\)90143-l](https://doi.org/10.1016/0361-9230(92)90143-l).
- Barraco, R. A., el-Ridi, M. R., Ergene, E., & Phillis, J. W. (1991). Adenosine receptor subtypes in the brainstem mediate distinct cardiovascular response patterns. *Brain research bulletin*, 26(1), 59–84. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(91\)90192-m](https://doi.org/10.1016/0361-9230(91)90192-m).
- Barraco, R. A., Janusz, C. A., Schoener, E. P., & Simpson, L. L. (1990). Cardiorespiratory function is altered by picomole injections of 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine into the nucleus tractus solitarius of rats. *Brain research*, 507(2), 234–246. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90277-i](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90277-i).
- Barraco, R. A., Walter, G. A., Polasek, P. M., & Phillis, J. W. (1991). Purine concentrations in the cerebrospinal fluid of unanesthetized rats during and after hypoxia. *Neurochemistry international*, 18(2), 243–248. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(91\)90191-f](https://doi.org/10.1016/0197-0186(91)90191-f).
- Barreto, G., White, R. E., Ouyang, Y., Xu, L., & Giffard, R. G. (2011). Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*, 11(2), 164–173. <https://doi.org/10.2174/187152411796011303>.
- Bar-Yehuda, D., & Korngreen, A. (2008). Space-clamp problems when voltage clamping neurons expressing voltage-gated conductances. *Journal of neurophysiology*, 99(3), 1127–1136. <https://doi.org/10.1152/jn.01232.2007>.
- Bazilio, D. S., Rodrigues, K. L., Moraes, D., & Machado, B. H. (2021). Distinct cardiovascular and respiratory responses to short-term sustained hypoxia in juvenile Sprague Dawley and Wistar Hannover rats. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, 230, 102746. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2020.102746>.

- Beart, P. M., & O'Shea, R. D. (2007). Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *British journal of pharmacology*, 150(1), 5–17. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706949>.
- Bekkers, J. M., & Stevens, C. F. (1990). Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 346(6286), 724–729. <https://doi.org/10.1038/346724a0>.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., & Diemer, N. H. (1984). Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *Journal of neurochemistry*, 43(5), 1369–1374. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb05396.x>.
- Berger A. J. (1979). Distribution of carotid sinus nerve afferent fibers to solitary tract nuclei of the cat using transganglionic transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience letters*, 14(2-3), 153–158. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(79\)96140-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(79)96140-8).
- Berner, R. A., Vandenbrooks, J. M., & Ward, P. D. (2007). Evolution. Oxygen and evolution. *Science (New York, N. Y.)*, 316(5824), 557–558. <https://doi.org/10.1126/science.1140273>.
- Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M., & Champagnat, J. (1995). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiological reviews*, 75(1), 1–45. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.1.1>.
- Biscoe, T. J., & Duchon, M. R. (1990). Cellular basis of transduction in carotid chemoreceptors. *The American journal of physiology*, 258(6 Pt 1), L271–L278. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1990.258.6.L271>.
- Bisserbe, J. C., Patel, J., & Marangos, P. J. (1985). Autoradiographic localization of adenosine uptake sites in rat brain using [3H]nitrobenzylthioinosine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 5(2), 544–550. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.05-02-00544.1985>.
- Blow O, Magliore L, Claridge JA, Butler K, Young JS. The golden hour and the silver day: detection and correction of occult hypoperfusion within 24 hours improves outcome from major trauma. *J Trauma*. 1999.
- Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., & Varani, K. (2018). Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiological reviews*, 98(3), 1591–1625. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>.
- Braga, V. A., Zoccal, D. B., Soriano, R. N., Antunes, V. R., Paton, J. F., Machado, B. H., & Nalivaiko, E. (2007). Activation of peripheral chemoreceptors causes positive inotropic effects in a working heart-brainstem preparation of the rat. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 34(11), 1156–1159. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04699.x>.
- Bronson, S. K., & Smithies, O. (1994). Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry*, 269(44), 27155–27158.
- Brugarolas M, Navarro G, Martínez-Pinilla E, Angelats E, Casadó V, Lanciego JL, Franco R. G-protein-coupled receptor heteromers as key players in the molecular architecture of the central nervous system. *CNS Neurosci Ther*. 2014 Aug;20(8):703-9. doi: 10.1111/cns.12277. Epub 2014 May 9. PMID: 24809909; PMCID: PMC6493065.

- Caldwell P. C. (1968). Liquid junction potentials and their effect on potential measurements in biological systems. *International review of cytology*, 24, 345–371. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61402-3](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61402-3).
- Castillo, C. A., León, D., Ruiz, M. A., Albasanz, J. L., & Martín, M. (2008). Modulation of adenosine A1 and A2A receptors in C6 glioma cells during hypoxia: involvement of endogenous adenosine. *Journal of neurochemistry*, 105(6), 2315–2329. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05314.x>.
- Chen, W. C., Park, S. H., Hoffman, C., Philip, C., Robinson, L., West, J., & Grunig, G. (2013). Right ventricular systolic pressure measurements in combination with harvest of lung and immune tissue samples in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (71), e50023. <https://doi.org/10.3791/50023>.
- Chen, C. Y., Horowitz, J. M., & Bonham, A. C. (1999). A presynaptic mechanism contributes to depression of autonomic signal transmission in NTS. *The American journal of physiology*, 277(4), H1350–H1360. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.4.H1350>.
- Chen, J. F., Huang, Z., Ma, J., Zhu, J., Moratalla, R., Standaert, D., Moskowitz, M. A., Fink, J. S., & Schwarzschild, M. A. (1999). A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(21), 9192–9200. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-21-09192.1999>.
- Chounlamounry, K., & Kessler, J. P. (2011). The ultrastructure of perisynaptic glia in the nucleus tractus solitarius of the adult rat: Comparison between single synapses and multisynaptic arrangements. *Glia*, 59(4), 655–663. <https://doi.org/10.1002/glia.21135>.
- Chu, S., Xiong, W., & Parkinson, F. E. (2014). Effect of ecto-5'-nucleotidase (eN) in astrocytes on adenosine and inosine formation. *Purinergic signalling*, 10(4), 603–609. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9421-8>.
- Ciruela F, Casadó V, Rodrigues RJ, Luján R, Burgueño J, Canals M, Borycz J, Rebola N, Goldberg SR, Mallol J, Cortés A, Canela EI, López-Giménez JF, Milligan G, Lluís C, Cunha RA, Ferré S, Franco R. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci*. 2006 Feb 15;26(7):2080-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3574-05.2006. PMID: 16481441; PMCID: PMC6674939.
- Claps, A., & Torrealba, F. (1988). The carotid body connections: a WGA-HRP study in the cat. *Brain research*, 455(1), 123–133. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90121-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90121-7).
- Corsi, C., Melani, A., Bianchi, L., Pepeu, G., & Pedata, F. (1999). Effect of adenosine A2A receptor stimulation on GABA release from the striatum of young and aged rats in vivo. *Neuroreport*, 10(18), 3933–3937. <https://doi.org/10.1097/00001756-199912160-00038>.
- Costa, K. M., Accorsi-Mendonça, D., Moraes, D. J., & Machado, B. H. (2014). Evolution and physiology of neural oxygen sensing. *Frontiers in physiology*, 5, 302. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00302>.
- Cristóvão-Ferreira, S., Navarro, G., Brugarolas, M., Pérez-Capote, K., Vaz, S. H., Fattorini, G., Conti, F., Lluís, C., Ribeiro, J. A., McCormick, P. J., Casadó, V., Franco, R., & Sebastião, A.

M. (2013). A1R-A2AR heteromers coupled to Gs and G i/o proteins modulate GABA transport into astrocytes. *Purinergic signalling*, 9(3), 433–449. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9364-5>

Cunha R. A. (2001). Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry international*, 38(2), 107–125. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(00\)00034-6](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(00)00034-6).

Cunha, R. A., & Ribeiro, J. A. (2000). Purinergic modulation of [(3)H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology*, 39(7), 1156–1167. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(99\)00237-3](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(99)00237-3).

Danbolt N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, 65(1), 1–105. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00067-8).

Dampney R. A. (1994). Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiological reviews*, 74(2), 323–364. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.2.323>.

de Paula, P. M., & Machado, B. H. (2001). Antagonism of adenosine A(1) receptors in the NTS does not affect the chemoreflex in awake rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 281(6), R2072–R2078. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.6.R2072>.

DEL CASTILLO J, KATZ B. Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol*. 1954 Jun 28;124(3):560-73. doi: 10.1113/jphysiol.1954.sp005129. PMID: 13175199; PMCID: PMC1366292.

Derkach, V., Barria, A., & Soderling, T. R. (1999). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), 3269–3274. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3269>.

Dias, R. B., Ribeiro, J. A., & Sebastião, A. M. (2012). Enhancement of AMPA currents and GluR1 membrane expression through PKA-coupled adenosine A(2A) receptors. *Hippocampus*, 22(2), 276–291. <https://doi.org/10.1002/hipo.20894>.

Diez R, Richardson MJE, Wall MJ. Reducing Extracellular Ca<sup>2+</sup> Induces Adenosine Release via Equilibrative Nucleoside Transporters to Provide Negative Feedback Control of Activity in the Hippocampus. *Front Neural Circuits*. 2017 Oct 10;11:75. doi: 10.3389/fncir.2017.00075. PMID: 29066955; PMCID: PMC5641293.

Donnelly, D. F., Jiang, C., & Haddad, G. G. (1992). Comparative responses of brain stem and hippocampal neurons to O<sub>2</sub> deprivation: in vitro intracellular studies. *The American journal of physiology*, 262(5 Pt 1), L549–L554. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1992.262.5.L549>.

Donoghue, S., Felder, R. B., Jordan, D., & Spyer, K. M. (1984). The central projections of carotid baroreceptors and chemoreceptors in the cat: a neurophysiological study. *The Journal of physiology*, 347, 397–409. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015072>.

Dux, E., Schubert, P., & Kreutzberg, G. W. (1992). Ultrastructural localization of calcium in ischemic hippocampal slices: the influence of adenosine and theophylline. *Journal of cerebral*



*blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 12(3), 520–524. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1992.71>.

Finley, J. C., & Katz, D. M. (1992). The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain research*, 572(1-2), 108–116. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90458-l](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90458-l).

Franchini, K. G., & Krieger, E. M. (1993). Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *Journal of the autonomic nervous system*, 42(1), 63–69. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(93\)90342-r](https://doi.org/10.1016/0165-1838(93)90342-r).

Frankel W. N. (1998). Mouse strain backgrounds: more than black and white. *Neuron*, 20(2), 183. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80447-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80447-x).

Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., & Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological reviews*, 53(4), 527–552.

Fresco, P., Diniz, C., & Gonçalves, J. (2004). Facilitation of noradrenaline release by activation of adenosine A(2A) receptors triggers both phospholipase C and adenylate cyclase pathways in rat tail artery. *Cardiovascular research*, 63(4), 739–746. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.05.015>.

Gledhill, N., Beirne, G. J., & Dempsey, J. A. (1975). Renal response to short-term hypocapnia in man. *Kidney international*, 8(6), 376–384. <https://doi.org/10.1038/ki.1975.130>.

Globus, M. Y., Busto, R., Dietrich, W. D., Martinez, E., Valdés, I., & Ginsberg, M. D. (1989). Direct evidence for acute and massive norepinephrine release in the hippocampus during transient ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 9(6), 892–896. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1989.123>.

Gourine, A. V., Llaudet, E., Thomas, T., Dale, N., & Spyer, K. M. (2002). Adenosine release in nucleus tractus solitarii does not appear to mediate hypoxia-induced respiratory depression in rats. *The Journal of physiology*, 544(Pt 1), 161–170. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.024174>.

Granata A. R. (1994). Rostral ventrolateral medulla descending neurons excited by nucleus tractus solitarii inputs. *Brain research*, 648(2), 299–305. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91131-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91131-2).

Greger, I. H., Watson, J. F., & Cull-Candy, S. G. (2017). Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron*, 94(4), 713–730. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.009>.

Haddad, G. G., & Jiang, C. (1993). Mechanisms of anoxia-induced depolarization in brainstem neurons: in vitro current and voltage clamp studies in the adult rat. *Brain research*, 625(2), 261–268. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91067-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91067-3).

Hagberg, H., Lehmann, A., Sandberg, M., Nyström, B., Jacobson, I., & Hamberger, A. (1985). Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular

- compartments. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 5(3), 413–419. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1985.56>.
- Hammarström, A. K., & Gage, P. W. (2002). Hypoxia and persistent sodium current. *European biophysics journal : EBJ*, 31(5), 323–330. <https://doi.org/10.1007/s00249-002-0218-2>.
- Höhne, C., Boemke, W., Schleyer, N., Francis, R. C., Krebs, M. O., & Kaczmarczyk, G. (2002). Low sodium intake does not impair renal compensation of hypoxia-induced respiratory alkalosis. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 92(5), 2097–2104. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00719.2001>.
- Hu, K., Huang, C. S., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2003). ATP-sensitive potassium channel traffic regulation by adenosine and protein kinase C. *Neuron*, 38(3), 417–432. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00256-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00256-3).
- IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Müller, C. E., Cronstein, B. N., & Cunha, R. A. (2022). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CXII: Adenosine Receptors: A Further Update. *Pharmacological reviews*, 74(2), 340–372. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000445>.
- Jackson, E. K., Kotermanski, S. E., Menshikova, E. V., Dubey, R. K., Jackson, T. C., & Kochanek, P. M. (2017). Adenosine production by brain cells. *Journal of neurochemistry*, 141(5), 676–693. <https://doi.org/10.1111/jnc.14018>.
- Jin, Y. H., Bailey, T. W., Li, B. Y., Schild, J. H., & Andresen, M. C. (2004). Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(20), 4709–4717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0753-04.2004>.
- Jones AE, Puskarich MA. Sepsis-induced tissue hypoperfusion. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2011.
- Kamalova A, Nakagawa T. AMPA receptor structure and auxiliary subunits. *J Physiol*. 2021 Jan;599(2):453-469. doi: 10.1113/JP278701. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32004381; PMCID: PMC7392800.
- Kinoshita, A., Yamada, K., Kohmura, E., & Hayakawa, T. (1990). Effect of astrocyte-derived factors on ischemic brain edema induced by rat MCA occlusion. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 98(9), 851–857. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1990.tb05006.x>.
- Kline, D. D., Takacs, K. N., Ficker, E., & Kunze, D. L. (2002). Dopamine modulates synaptic transmission in the nucleus of the solitary tract. *Journal of neurophysiology*, 88(5), 2736–2744. <https://doi.org/10.1152/jn.00224.2002>.
- Kline, D. D., Ramirez-Navarro, A., & Kunze, D. L. (2007). Adaptive depression in synaptic transmission in the nucleus of the solitary tract after in vivo chronic intermittent hypoxia: evidence for homeostatic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(17), 4663–4673. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4946-06.2007>.

- Kobayashi, S., Conforti, L., Pun, R. Y., & Millhorn, D. E. (1998). Adenosine modulates hypoxia-induced responses in rat PC12 cells via the A<sub>2A</sub> receptor. *The Journal of physiology*, 508 ( Pt 1)(Pt 1), 95–107. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.095br.x>.
- Kobayashi, S., & Millhorn, D. E. (1999). Stimulation of expression for the adenosine A<sub>2A</sub> receptor gene by hypoxia in PC12 cells. A potential role in cell protection. *The Journal of biological chemistry*, 274(29), 20358–20365. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20358>.
- Kono, Y., Shigetomi, E., Inoue, K., & Kato, F. (2007). Facilitation of spontaneous glycine release by anoxia potentiates NMDA receptor current in the hypoglossal motor neurons of the rat. *The European journal of neuroscience*, 25(6), 1748–1756. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05426.x>.
- Lachamp, P., Crest, M., & Kessler, J. P. (2006). Vesicular glutamate transporters type 1 and 2 expression in axon terminals of the rat nucleus of the solitary tract. *Neuroscience*, 137(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.048>.
- Lanznaster, D., Massari, C. M., Marková, V., Šimková, T., Duroux, R., Jacobson, K. A., Fernández-Dueñas, V., Tasca, C. I., & Ciruela, F. (2019). Adenosine A<sub>1</sub>-A<sub>2A</sub> Receptor-Receptor Interaction: Contribution to Guanosine-Mediated Effects. *Cells*, 8(12), 1630. <https://doi.org/10.3390/cells8121630>.
- Ledent, C., Vaugeois, J. M., Schiffmann, S. N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J. J., Costentin, J., Heath, J. K., Vassart, G., & Parmentier, M. (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A<sub>2a</sub> receptor. *Nature*, 388(6643), 674–678. <https://doi.org/10.1038/41771>.
- Lee, H. K., Takamiya, K., Han, J. S., Man, H., Kim, C. H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., Gallagher, M., & Huganir, R. L. (2003). Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell*, 112(5), 631–643. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00122-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00122-3).
- Leung, C., & Jia, Z. (2016). Mouse Genetic Models of Human Brain Disorders. *Frontiers in genetics*, 7, 40. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00040>.
- Levy, L. M., Warr, O., & Attwell, D. (1998). Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(23), 9620–9628. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09620.1998>.
- Li, B., Gu, L., Hertz, L., & Peng, L. (2013). Expression of nucleoside transporter in freshly isolated neurons and astrocytes from mouse brain. *Neurochemical research*, 38(11), 2351–2358. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1146-5>.
- Lima-Silveira, L., Accorsi-Mendonça, D., Bonagamba, L., Almado, C., da Silva, M. P., Nedoboy, P. E., Pilowsky, P. M., & Machado, B. H. (2019). Enhancement of excitatory transmission in NTS neurons projecting to ventral medulla of rats exposed to sustained hypoxia is blunted by minocycline. *The Journal of physiology*, 597(11), 2903–2923. <https://doi.org/10.1113/JP277532>.



- Lipton, P., & Whittingham, T. S. (1979). The effect of hypoxia on evoked potentials in the in vitro hippocampus. *The Journal of physiology*, 287, 427–438. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1979.sp012668>.
- Liu, Y. J., Chen, J., Li, X., Zhou, X., Hu, Y. M., Chu, S. F., Peng, Y., & Chen, N. H. (2019). Research progress on adenosine in central nervous system diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*, 25(9), 899–910. <https://doi.org/10.1111/cns.13190>.
- London, G. M., & Guerin, A. P. (1999). Influence of arterial pulse and reflected waves on blood pressure and cardiac function. *American heart journal*, 138(3 Pt 2), 220–224. [https://doi.org/10.1016/s0002-8703\(99\)70313-3](https://doi.org/10.1016/s0002-8703(99)70313-3).
- London, G. M., & Pannier, B. (2010). Arterial functions: how to interpret the complex physiology. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 25(12), 3815–3823. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq614>.
- Lopes, C. R., Lourenço, V. S., Tomé, Â. R., Cunha, R. A., & Canas, P. M. (2021). Use of knockout mice to explore CNS effects of adenosine. *Biochemical pharmacology*, 187, 114367. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114367>.
- Machado B. H. (2001). Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarius of awake rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 940, 179–196. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03676.x>.
- Machado, B. H., Zoccal, D. B., & Moraes, D. (2017). Neurogenic hypertension and the secrets of respiration. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 312(6), R864–R872. <https://doi.org/10.1152/ajprequ.00505.2016>.
- Magalhães, K. S., da Silva, M. P., Mecawi, A. S., Paton, J., Machado, B. H., & Moraes, D. (2021). Intrinsic and synaptic mechanisms controlling the expiratory activity of excitatory lateral parafacial neurones of rats. *The Journal of physiology*, 599(21), 4925–4948. <https://doi.org/10.1113/JP281545>.
- Malan A. (1973). Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respiration physiology*, 17(1), 32–44. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(73\)90108-4](https://doi.org/10.1016/0034-5687(73)90108-4).
- Malinow, R., & Tsien, R. W. (1990). Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature*, 346(6280), 177–180. <https://doi.org/10.1038/346177a0>.
- Mansouri A. (2001). Determination of gene function by homologous recombination using embryonic stem cells and knockout mice. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 175, 397–413. <https://doi.org/10.1385/1-59259-235-X:397>.
- Martín, E. D., Fernández, M., Perea, G., Pascual, O., Haydon, P. G., Araque, A., & Ceña, V. (2007). Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia*, 55(1), 36–45. <https://doi.org/10.1002/glia.20431>.

Matos, M., Augusto, E., Santos-Rodrigues, A. D., Schwarzschild, M. A., Chen, J. F., Cunha, R. A., & Agostinho, P. (2012). Adenosine A<sub>2A</sub> receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes. *Glia*, 60(5), 702–716. <https://doi.org/10.1002/glia.22290>.

Matos M, Augusto E, Agostinho P, Cunha RA, Chen JF. Antagonistic interaction between adenosine A<sub>2A</sub> receptors and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase- $\alpha$ 2 controlling glutamate uptake in astrocytes. *J Neurosci*. 2013 Nov 20;33(47):18492-502. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1828-13.2013. PMID: 24259572; PMCID: PMC3834055.

Matos, M., Shen, H. Y., Augusto, E., Wang, Y., Wei, C. J., Wang, Y. T., Agostinho, P., Boison, D., Cunha, R. A., & Chen, J. F. (2015). Deletion of adenosine A<sub>2A</sub> receptors from astrocytes disrupts glutamate homeostasis leading to psychomotor and cognitive impairment: relevance to schizophrenia. *Biological psychiatry*, 78(11), 763–774. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.02.026>.

Mayer, C. A., Haxhiu, M. A., Martin, R. J., & Wilson, C. G. (2006). Adenosine A<sub>2A</sub> receptors mediate GABAergic inhibition of respiration in immature rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 100(1), 91–97. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00459.2005>.

Mei, H. F., Poonit, N., Zhang, Y. C., Ye, C. Y., Cai, H. L., Yu, C. Y., Zhou, Y. H., Wu, B. B., Cai, J., & Cai, X. H. (2018). Activating adenosine A<sub>1</sub> receptor accelerates PC12 cell injury via ADORA1/PKC/KATP pathway after intermittent hypoxia exposure. *Molecular and cellular biochemistry*, 446(1-2), 161–170. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3283-2>.

Melani, A., Corti, F., Stephan, H., Müller, C. E., Donati, C., Bruni, P., Vannucchi, M. G., & Pedata, F. (2012). Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release under physiological and ischemic in vivo conditions in the rat striatum. *Experimental neurology*, 233(1), 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.036>.

Meriño, M., Martín, S. S., Sandaña, P., Herlitz, K., Aguayo, C., Godoy, A., Torres-Vergara, P., Gonzalez, M., Troncoso, F., Acurio, J., & Escudero, C. (2020). Deletion of the adenosine A<sub>2A</sub> receptor increases the survival rate in a mice model of polymicrobial sepsis. *Purinergic signalling*, 16(3), 427–437. <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09719-w>.

Mifflin S. W. (1993). Absence of respiration modulation of carotid sinus nerve inputs to nucleus tractus solitarius neurons receiving arterial chemoreceptor inputs. *Journal of the autonomic nervous system*, 42(3), 191–199. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(93\)90364-z](https://doi.org/10.1016/0165-1838(93)90364-z).

Miles R. (1986). Frequency dependence of synaptic transmission in nucleus of the solitary tract in vitro. *Journal of neurophysiology*, 55(5), 1076–1090. <https://doi.org/10.1152/jn.1986.55.5.1076>.

Minic, Z., O'Leary, D. S., Goshgarian, H. G., & Scislo, T. J. (2018). Colocalization of A<sub>2a</sub> but not A<sub>1</sub> adenosine receptors with GABA-ergic neurons in cardiopulmonary chemoreflex network in the caudal nucleus of the solitary tract. *Physiological reports*, 6(22), e13913. <https://doi.org/10.14814/phy2.13913>.

Minic, Z., O'Leary, D. S., & Scislo, T. J. (2015). NTS adenosine A<sub>2a</sub> receptors inhibit the cardiopulmonary chemoreflex control of regional sympathetic outputs via a GABAergic mechanism. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 309(1), H185–H197. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00838.2014>.

- Moraes, D. J., Bonagamba, L. G., Costa, K. M., Costa-Silva, J. H., Zoccal, D. B., & Machado, B. H. (2014). Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. *The Journal of physiology*, 592(9), 2013–2033. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.262212>.
- Nagai, K., Nagasawa, K., & Fujimoto, S. (2005). Transport mechanisms for adenosine and uridine in primary-cultured rat cortical neurons and astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(4), 1343–1350. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.032>.
- Narahashi, T., & Frazier, D. T. (1971). Site of action and active form of local anesthetics. *Neurosciences research*, 4, 65–99. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-512504-8.50009-3>.
- Navabpour, S., Kwapis, J. L., & Jarome, T. J. (2020). A neuroscientist's guide to transgenic mice and other genetic tools. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 108, 732–748. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.12.013>.
- Navarro, G., Cordoní, A., Zelman-Femiak, M., Brugarolas, M., Moreno, E., Aguinaga, D., Perez-Benito, L., Cortés, A., Casadó, V., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C., Pardo, L., García-Sáez, A. J., McCormick, P. J., & Franco, R. (2016). Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and Gs. *BMC biology*, 14, 26. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0247-4>.
- Ochi, M., Koga, K., Kurokawa, M., Kase, H., Nakamura, J., & Kuwana, Y. (2000). Systemic administration of adenosine A(2A) receptor antagonist reverses increased GABA release in the globus pallidus of unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats: a microdialysis study. *Neuroscience*, 100(1), 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00250-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00250-5).
- Orru, M., Bakešová, J., Brugarolas, M., Quiroz, C., Beaumont, V., Goldberg, S. R., Lluís, C., Cortés, A., Franco, R., Casadó, V., Canela, E. I., & Ferré, S. (2011). Striatal pre- and postsynaptic profile of adenosine A(2A) receptor antagonists. *PloS one*, 6(1), e16088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016088>.
- Paladino L, Sinert R, Wallace D, Anderson T, Yadav K, Zehtabchi S. The utility of base deficit and arterial lactate in differentiating major from minor injury in trauma patients with normal vital signs. *Resuscitation*. 2008.
- Pedata, F., Pugliese, A. M., Coppi, E., Dettori, I., Maraula, G., Cellai, L., & Melani, A. (2014). Adenosine A2A receptors modulate acute injury and neuroinflammation in brain ischemia. *Mediators of inflammation*, 2014, 805198. <https://doi.org/10.1155/2014/805198>.
- Peña, F., Parkis, M. A., Tryba, A. K., & Ramirez, J. M. (2004). Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron*, 43(1), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.023>.
- Pecchi, E., Dallaporta, M., Charrier, C., Pio, J., Jean, A., Moyses, E., & Troadec, J. D. (2007). Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive radial-like cells are present in the vicinity of proliferative progenitors in the nucleus tractus solitarius of adult rat. *The Journal of comparative neurology*, 501(3), 353–368. <https://doi.org/10.1002/cne.21259>.

- Peng, L., Huang, R., Yu, A. C., Fung, K. Y., Rathbone, M. P., & Hertz, L. (2005). Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes. *Glia*, 52(1), 25–35. <https://doi.org/10.1002/glia.20216>.
- Phillis, J. W., Scislo, T. J., & O'Leary, D. S. (1997). Purines and the nucleus tractus solitarius: effects on cardiovascular and respiratory function. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 24(9-10), 738–742. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1997.tb02124.x>.
- Picciotto, M. R., & Wickman, K. (1998). Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiological reviews*, 78(4), 1131–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.1131>.
- Pinky, N. F., Wilkie, C. M., Barnes, J. R., & Parsons, M. P. (2018). Region- and Activity-Dependent Regulation of Extracellular Glutamate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 38(23), 5351–5366. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3213-17.2018>.
- Ramirez, D. M., & Kavalali, E. T. (2011). Differential regulation of spontaneous and evoked neurotransmitter release at central synapses. *Current opinion in neurobiology*, 21(2), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.01.007>.
- Rebola, N., Canas, P. M., Oliveira, C. R., & Cunha, R. A. (2005). Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience*, 132(4), 893–903. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.01.014>.
- Rodrigues, K. L., Souza, J. R., Bazilio, D. S., de Oliveira, M., Moraes, M., Moraes, D., & Machado, B. H. (2021). Changes in the autonomic and respiratory patterns in mice submitted to short-term sustained hypoxia. *Experimental physiology*, 106(3), 759–770. <https://doi.org/10.1113/EP089323>.
- Ross, C. A., Ruggiero, D. A., & Reis, D. J. (1985). Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. *The Journal of comparative neurology*, 242(4), 511–534. <https://doi.org/10.1002/cne.902420405>.
- Rossi, D. J., Oshima, T., & Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403(6767), 316–321. <https://doi.org/10.1038/35002090>.
- Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., & Kuncl, R. W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, 13(3), 713–725. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90038-8).
- Rudolphi, K. A., Schubert, P., Parkinson, F. E., & Fredholm, B. B. (1992). Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends in pharmacological sciences*, 13(12), 439–445. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90141-r](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90141-r).
- Rumney, R., & Górecki, D. C. (2020). Knockout and Knock-in Mouse Models to Study Purinergic Signaling. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2041, 17–43. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9717-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9717-6_2).
- Russell, D. M., Garry, E. M., Taberner, A. J., Barrett, C. J., Paton, J. F., Budgett, D. M., & Malpas, S. C. (2012). A fully implantable telemetry system for the chronic monitoring of brain

tissue oxygen in freely moving rats. *Journal of neuroscience methods*, 204(2), 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.11.019>.

Sakata, M., Sei, H., Eguchi, N., Morita, Y., & Urade, Y. (2005). Arterial pressure and heart rate increase during REM sleep in adenosine A2A-receptor knockout mice, but not in wild-type mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(10), 1856–1860. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300727>.

Sakmann, B., & Neher, E. (1984). Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual review of physiology*, 46, 455–472. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.46.030184.002323>.

Salmi, P., Chergui, K., & Fredholm, B. B. (2005). Adenosine-dopamine interactions revealed in knockout mice. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 26(2-3), 239–244. <https://doi.org/10.1385/JMN:26:2-3:239>.

Sara, Y., Virmani, T., Deák, F., Liu, X., & Kavalali, E. T. (2005). An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. *Neuron*, 45(4), 563–573. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.056>.

Scislo, T. J., Kitchen, A. M., Augustyniak, R. A., & O'Leary, D. S. (2001). Differential patterns of sympathetic responses to selective stimulation of nucleus tractus solitarius purinergic receptor subtypes. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 28(1-2), 120–124. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2001.03404.x>.

Scislo, T. J., & O'Leary, D. S. (2006). Adenosine receptors located in the NTS contribute to renal sympathoinhibition during hypotensive phase of severe hemorrhage in anesthetized rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 291(5), H2453–H2461. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00158.2006>.

Scislo, T. J., & O'Leary, D. S. (2005). Purinergic mechanisms of the nucleus of the solitary tract and neural cardiovascular control. *Neurological research*, 27(2), 182–194. <https://doi.org/10.1179/016164105X21959>.

Sehba, F. A., Flores, R., Muller, A., Friedrich, V., Chen, J. F., Britz, G. W., Winn, H. R., & Bederson, J. B. (2010). Adenosine A(2A) receptors in early ischemic vascular injury after subarachnoid hemorrhage. Laboratory investigation. *Journal of neurosurgery*, 113(4), 826–834. <https://doi.org/10.3171/2009.9.JNS09802>.

Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (2009). Adenosine receptors and the central nervous system. *Handbook of experimental pharmacology*, (193), 471–534. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-89615-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-540-89615-9_16).

Seiders, E. P., & Stuesse, S. L. (1984). A horseradish peroxidase investigation of carotid sinus nerve components in the rat. *Neuroscience letters*, 46(1), 13–18. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(84\)90191-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(84)90191-5).

Sekizawa, S., Joad, J. P., & Bonham, A. C. (2003). Substance P presynaptically depresses the transmission of sensory input to bronchopulmonary neurons in the guinea pig nucleus tractus solitarius. *The Journal of physiology*, 552(Pt 2), 547–559. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.051326>.



- Schiffmann, S. N., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R. A., & Ferré, S. (2007). Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Progress in neurobiology*, 83(5), 277–292. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.05.001>.
- Silva, A. J., Simpson, E. M., Takahashi, J. S., Lipp, H. P., Nakanishi, S., Wehner, J. M., ... & Wolfer, D. P. Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. *Neuron*, 19(4), 755-759, 1997.
- Smith, S. M., Chen, W., Vyleta, N. P., Williams, C., Lee, C. H., Phillips, C., & Andresen, M. C. (2012). Calcium regulation of spontaneous and asynchronous neurotransmitter release. *Cell calcium*, 52(3-4), 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.06.001>.
- Snell, B. J., Short, J. L., Drago, J., Ledent, C., & Lawrence, A. J. (2000). Characterisation of central adenosine A(1) receptors and adenosine transporters in mice lacking the adenosine A(2a) receptor. *Brain research*, 877(2), 160–169. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02670-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02670-6).
- Snyder S. H. (1985). Adenosine as a neuromodulator. *Annual review of neuroscience*, 8, 103–124. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.08.030185.000535>.
- Souza, J. R., Oliveira, M., & Machado, B. H. (2022). Sustained hypoxia in mice increases parasympathetic but not sympathetic tone. *Current research in physiology*, 5, 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.crphys.2022.09.006>.
- Spruston, N., Jaffe, D. B., Williams, S. H., & Johnston, D. (1993). Voltage- and space-clamp errors associated with the measurement of electrotonically remote synaptic events. *Journal of neurophysiology*, 70(2), 781–802. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.2.781>.
- Swanson, R. A., Ying, W., & Kauppinen, T. M. (2004). Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Current molecular medicine*, 4(2), 193–205. <https://doi.org/10.2174/1566524043479185>.
- Tanaka, A., Nishida, K., Okuda, H., Nishiura, T., Higashi, Y., Fujimoto, S., & Nagasawa, K. (2011). Peroxynitrite treatment reduces adenosine uptake via the equilibrative nucleoside transporter in rat astrocytes. *Neuroscience letters*, 498(1), 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.04.060>
- Tashiro, Y., & Kawai, Y. (2007). Glial coverage of the small cell somata in the rat nucleus of tractus solitarius during postnatal development. *Glia*, 55(16), 1619–1629. <https://doi.org/10.1002/glia.20577>.
- Thomas, T., St Lambert, J. H., Dashwood, M. R., & Spyer, K. M. (2000). Localization and action of adenosine A2a receptors in regions of the brainstem important in cardiovascular control. *Neuroscience*, 95(2), 513–518. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00473-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00473-x).
- Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., & Harris, R. C. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5221), 230–234. <https://doi.org/10.1126/science.7618084>.

- Tian, L., Tang, G., Liu, Q., Yin, Y., Li, Y., & Zhong, Y. (2020). Blockade of adenosine A1 receptor in nucleus tractus solitarius attenuates baroreflex sensitivity response to dexmedetomidine in rats. *Brain research*, 1743, 146949. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146949>.
- Tokita, Y., Keino, H., Matsui, F., Aono, S., Ishiguro, H., Higashiyama, S., & Oohira, A. (2001). Regulation of neuregulin expression in the injured rat brain and cultured astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(4), 1257–1264. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-04-01257.2001>.
- Urbanski, R. W., & Sapru, H. N. (1988). Evidence for a sympathoexcitatory pathway from the nucleus tractus solitarius to the ventrolateral medullary pressor area. *Journal of the autonomic nervous system*, 23(2), 161–174. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(88\)90080-x](https://doi.org/10.1016/0165-1838(88)90080-x).
- Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological reviews*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>.
- Vlachopoulos, C., & O'Rourke, M. (2000). Diastolic pressure, systolic pressure, or pulse pressure?. *Current hypertension reports*, 2(3), 271–279. <https://doi.org/10.1007/s11906-000-0010-6>.
- Wall, M. J., & Dale, N. (2013). Neuronal transporter and astrocytic ATP exocytosis underlie activity-dependent adenosine release in the hippocampus. *The Journal of physiology*, 591(16), 3853–3871. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.253450>.
- Wei, C. J., Li, W., & Chen, J. F. (2011). Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(5), 1358–1379. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.12.018>.
- Wilson, C. G., Martin, R. J., Jaber, M., Abu-Shaweesh, J., Jafri, A., Haxhiu, M. A., & Zaidi, S. (2004). Adenosine A2A receptors interact with GABAergic pathways to modulate respiration in neonatal piglets. *Respiratory physiology & neurobiology*, 141(2), 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.04.012>.
- Xu, M. H., Gong, Y. S., Su, M. S., Dai, Z. Y., Dai, S. S., Bao, S. Z., Li, N., Zheng, R. Y., He, J. C., Chen, J. F., & Wang, X. T. (2011). Absence of the adenosine A2A receptor confers pulmonary arterial hypertension and increased pulmonary vascular remodeling in mice. *Journal of vascular research*, 48(2), 171–183. <https://doi.org/10.1159/000316935>.
- Yaar, R., Jones, M. R., Chen, J. F., & Ravid, K. (2005). Animal models for the study of adenosine receptor function. *Journal of cellular physiology*, 202(1), 9–20. <https://doi.org/10.1002/jcp.20138>.
- Yeh J. Z. (1978). Sodium inactivation mechanism modulates QX-314 block of sodium channels in squid axons. *Biophysical journal*, 24(2), 569–574. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(78\)85403-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85403-4).
- Zaidi, S. I., Jafri, A., Martin, R. J., & Haxhiu, M. A. (2006). Adenosine A2A receptors are expressed by GABAergic neurons of medulla oblongata in developing rat. *Brain research*, 1071(1), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.077>.

- Zhang, W., Carreño, F. R., Cunningham, J. T., & Mifflin, S. W. (2008). Chronic sustained and intermittent hypoxia reduce function of ATP-sensitive potassium channels in nucleus of the solitary tract. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 295(5), R1555–R1562. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90390.2008>.
- Zhang, W., Carreño, F. R., Cunningham, J. T., & Mifflin, S. W. (2009). Chronic sustained hypoxia enhances both evoked EPSCs and norepinephrine inhibition of glutamatergic afferent inputs in the nucleus of the solitary tract. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(10), 3093–3102. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2648-08.2009>.
- Zhou, Z., Champagnat, J., & Poon, C. S. (1997). Phasic and long-term depression in brainstem nucleus tractus solitarius neurons: differing roles of AMPA receptor desensitization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(14), 5349–5356. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-14-05349.1997>.
- Zimmermann, H., Zebisch, M., & Sträter, N. (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic signalling*, 8(3), 437–502. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4>.
- Zucker, R. S., & Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annual review of physiology*, 64, 355–405. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547>.



*Apêndice I - Artigo publicado durante o período de realização do mestrado*



Contents lists available at ScienceDirect

## Current Research in Physiology

journal homepage: [www.sciencedirect.com/journal/current-research-in-physiology](http://www.sciencedirect.com/journal/current-research-in-physiology)

## Sustained hypoxia in mice increases parasympathetic but not sympathetic tone

Juliana R. Souza, Mauro de Oliveira, Benedito H. Machado\*

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

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Mice C57BL/6  
Sustained hypoxia  
Parasympathetic tone  
Sympathetic tone  
Cardiovascular system

## ABSTRACT

The autonomic profile of mice submitted to sustained hypoxia (SH) was not yet fully evaluated. Herein, we characterized the cardiovascular and autonomic profile of conscious freely moving mice submitted to SH using two sequential experimental protocols to evaluate the parasympathetic and sympathetic tone to the heart and the sympathetic tone to the vascular resistance. In the first protocol the sequence of antagonists was methyl-atropine followed by propranolol and then by prazosin, while in the second protocol the sequence was propranolol followed by methyl-atropine and then by prazosin. In SH the baseline heart rate was significantly lower than in control mice and the antagonism of the parasympathetic and sympathetic tone to the heart in both experimental protocols indicated an increased parasympathetic tone in SH mice and no changes in the sympathetic tone. Antagonism of the sympathetic tone to the vascular resistance with prazosin produced similar changes in arterial pressure in control and SH mice. Altogether these findings support the concept that mice submitted to SH present a significant increase in the parasympathetic but not in the sympathetic tone, which may explain why the baseline arterial pressure was not increased in SH mice.

### 1. Introduction

The assessment of cardiovascular autonomic control in mice has been studied using the analysis of heart rate (HR) and arterial pressure (AP) variability in the frequency-domain (spectral analysis) and by means of pharmacological autonomic blockades (Just et al., 2000; Janssen and Smits, 2002; Chen et al., 2005; Fazan et al., 2005; Baudrie et al., 2007; Laude et al., 2008; Rodrigues et al., 2011). Several studies reported a sympathetic predominance in the control of baseline HR in mice and also an important role of vagal tone under resting conditions (Ishii et al., 1996; Gehrmann et al., 2000; Janssen et al., 2000; Just et al., 2000; Janssen and Smits, 2002; Fazan et al., 2005; Rodrigues et al., 2011). However, the relative role of the parasympathetic and sympathetic in determining the baseline HR in mice are controversial because some studies raised questions about the predominant role of the sympathetic tone (Baudrie et al., 2007; Laude et al., 2008; Swoap et al., 2008; Lujan et al., 2016). These controversies are related to different factors surrounding the experimental design, such as the *in vivo* cardiovascular recordings conditions, the recovery period between the surgery for catheter/telemetric devices implantation and the recording in behaving mice, the impacts of room temperature on the metabolic

state of animals, and the different frequency-domain indexes used in the spectral analysis between the studies (Stauss, 2007).

It is also important to consider that the autonomic control to the cardiovascular system in mice depends upon the activity state, age, and genetic background of mice (Janssen and Smits, 2002; De Angelis et al., 2004; Axsom et al., 2020; Piantoni et al., 2021). In this context, it was demonstrated that some pathophysiological conditions, such as myocardial infarction, diabetes, and psychosocial stress can change the cardiac autonomic balance to the heart of mice (Costoli et al., 2004; Gross et al., 2008; Durand et al., 2014). However, the autonomic profile of conscious freely moving mice previously submitted to sustained hypoxia was not yet evaluated.

In a recent study, we showed that the changes in autonomic and respiratory patterns in mice submitted to SH are different in relation to that observed in rats submitted to the same protocol of hypoxia (Rodrigues et al., 2021). These previous studies suggested an autonomic imbalance in favor of the parasympathetic component in mice submitted to SH mainly related to changes in the respiratory pattern. However, from the observed increase in the vagus nerve activity in the *in situ* working heart-brainstem preparation of SH mice, it was not possible to correlate it with the significant reduction in the baseline HR of conscious

\* Corresponding author.

E-mail address: [bhmachad@fmrp.usp.br](mailto:bhmachad@fmrp.usp.br) (B.H. Machado).

<https://doi.org/10.1016/j.crphys.2022.09.006>

Received 20 April 2022; Received in revised form 22 August 2022; Accepted 20 September 2022

Available online 21 September 2022

2665-9441/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).