

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

**Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia sobre as alterações cardiovasculares
e respiratórias promovidas por diferentes modelos de
hipertensão experimental em ratos**

Raphael Rodrigues Perim

Ribeirão Preto

2015

RAPHAEL RODRIGUES PERIM

**Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia sobre as alterações cardiovasculares
e respiratórias promovidas por diferentes modelos de
hipertensão experimental em ratos**

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

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito H.
Machado

Ribeirão Preto

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Perim, Raphael Rodrigues

Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por diferentes modelos de hipertensão experimental em ratos. Ribeirão Preto, 2015.

163 p.: il.; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Machado, Benedito H.

1. Hipóxia Crônica intermitente, 2. Pré-condicionamento, 3. Modelos de hipertensão, 4. Atividade simpática, 5. Pressão arterial.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Raphael Rodrigues Perim

Título: Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por diferentes modelos de hipertensão experimental em ratos

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fisiologia

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. Benedito H. Machado

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Rubens Fazan Júnior

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Sergio Luiz Domingues Cravo

Instituição: Escola Paulista de Medicina, UNIFESP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal

Instituição: Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

Assinatura: _____

**Dedico esta tese à minha eterna
amada esposa, Natália. Seu apoio
incondicional e compreensão durante
todo o meu doutorado ajudaram a me
manter motivado para seguir em
frente.**

Agradecimentos

Obrigado a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste trabalho. Acredito cegamente que cada nova conquista alcançada ao longo da nossa existência está intrinsecamente entrelaçada ao caminho que percorremos muito antes de sequer pensar que tal mérito pudesse se tornar realidade. Por isso, gostaria de agradecer primeiramente aos meus amados pais Antônio e Iraci por todo o carinho e dedicação infindáveis, e pelo amor incondicional que têm por mim. Meu mais sincero obrigado por terem se preocupado tanto com minha educação e com os alicerces éticos, sociais e morais que permitiram que eu pudesse chegar até aqui.

À minha amada esposa Natália por ter estado ao meu lado em todos os momentos! Você é minha melhor amiga, minha companheira inseparável e meu porto seguro. Obrigado por ter acreditado em mim e me motivado à seguir em frente.

À minha amada irmã Mariana pela amizade e companheirismo ao longo de toda a minha vida.

Aos meus segundos pais, Aparecido e Maria Pereira, por me terem me aceitado como mais um membro da família e por sempre estarem ao meu lado.

Ao querido Professor Benedito pelos ensinamentos, por acreditar em meu potencial e me proporcionar grandes oportunidades. Obrigado pela confiança e suporte em todas as etapas envolvidas nessa conquista. O senhor é um modelo no qual eu tento me espelhar,

e irei guardar para sempre essa imagem de pessoa ética, extremamente trabalhadora e profissional.

À Leni pelo auxílio em praticamente todas as etapas do meu doutorado, assim como pelos ensinamentos e pelo exemplo de ética e profissionalismo.

À Daniela e ao Davi que contribuíram de formas variadas e em diferentes níveis ao longo desses anos de doutorado.

Aos amigos do laboratório Mateus, Marlusa, George e Ludmila pela colaboração, conversas, troca de experiências e momentos de alegrias que vivemos juntos ao longo desses anos no laboratório.

Aos amigos André Dagostin, Daniel Penteado, e Ernane Uchoa pela amizade que nasceu nos corredores da universidade e que levarei para sempre. Fica aqui minha gratidão pelo incentivo e pelas discussões valiosas, conselhos, risadas e companheirismo.

Aos queridos Elisa, Claudia e Fernando por todo o suporte e auxílio prestado.

À todos os colegas do Departamento de Fisiologia que não mencionei aqui, obrigado pela companhia e convívio.

Ao CNPQ, FAPESP e CAPES pelo financiamento do projeto.

**Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro
da FAPESP, Capes e do CNPq**

“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

PERIM, R. R. **Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por diferentes modelos de hipertensão experimental em ratos.** 2015. 163 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Ratos jovens submetidos à hipóxia crônica intermitente (HCI) por um período de 10 dias apresentam hipertensão arterial e alterações no padrão de acoplamento das atividades simpática e respiratória. A exposição à HCI promove aumento da atividade simpática na fase expiratória final, mas o pico de atividade observado no final da inspiração/pós-inspiração também permanece. Estudos do nosso laboratório realizados em animais acordados mostraram por meio da análise espectral e do bloqueio ganglionar que a atividade simpática total está aumentada após um protocolo de 10 dias de HCI, caracterizando esse como sendo um modelo de hipertensão neurogênica. Em outros estudos voltados para verificar a reversibilidade da hipertensão arterial após o encerramento do protocolo de HCI, foi demonstrado que a pressão arterial desses animais se normaliza dentro de 15 dias em condição de normóxia. No entanto, estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que a transmissão sináptica no núcleo do trato solitário permanece alterada mesmo após duas semanas de recuperação do protocolo de HCI. Sendo assim um dos objetivos desse trabalho foi avaliar as respostas cardiovasculares e respiratórias de ratos submetidos a um novo protocolo de HCI depois de 15 dias do encerramento do primeiro protocolo. Adicionalmente, avaliamos se as respostas cardiovasculares e respiratórias induzidas pela HCI seriam ou não influenciadas pelo pré-condicionamento com hipóxia mantida (HM).

Assim como na HCI, nos modelos de hipertensão neurogênica a principal causa associada ao aumento de pressão arterial é a hiperatividade simpática. Dentre esses modelos, podemos destacar a hipertensão renovascular 1 rim, 1 clipe (1R, 1C) e os ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Nesse contexto, avaliamos também se a pré-exposição à HCI poderia influenciar as respostas cardiovasculares e respiratórias observadas nesses 2 modelos de hipertensão.

Os resultados mostraram que o pré-condicionamento com HCI ou com HM não alterou as respostas cardiovasculares promovidas por uma subsequente exposição à HCI. Por outro lado, o nível de hipertensão promovido pelo modelo 1R, 1C foi significativamente menor em animais pré-condicionados com HCI, via inibição do tônus simpático vascular. O procedimento de desnervação renal praticamente eliminou o aumento de pressão arterial associado ao modelo 1R, 1C. Adicionalmente, após a remoção bilateral do corpúsculo carotídeo, o nível de hipertensão decorrente do modelo 1R, 1C foi o mesmo, independente do pré-condicionamento com HCI. Por outro lado, o pré-condicionamento com HCI não alterou o desenvolvimento da hipertensão arterial de ratos SHR.

Palavras chaves: Hipóxia Crônica intermitente, Pré-condicionamento, Modelos de hipertensão, Atividade simpática, Pressão arterial.

ABSTRACT

PERIM, R. R. **Effects of preconditioning to hypoxia upon cardiovascular and respiratory alterations produced by different experimental models of hypertension in rats.** 2015. 163 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia (CIH) during 10 days present hypertension and alterations in the sympathetic and respiratory coupling. Exposure to CIH produces sympathetic overactivity in the late expiratory phase, whereas the peak of activity observed at the end of inspiration/post-inspiration was also maintained. Studies from our laboratory performed in awake animals, using spectral analyses and ganglionic blockade showed that the total sympathetic activity is increased after CIH protocol, characterizing this as a neurogenic model of hypertension. Other studies, designed to verify the reversibility of hypertension at the end of the CIH protocol, showed that the arterial pressure normalizes within 15 days in normoxic conditions. Nevertheless, previous studies from our laboratory showed that the synaptic transmission in the nucleus of the solitary tract continues altered even after two weeks of recovery from the CIH protocol. Thus, one of our goals was to evaluate the cardiovascular and respiratory responses in rats submitted to a new CIH protocol 15 days after the first protocol. Additionally, we evaluated whether or not the cardiovascular and respiratory responses induced by CIH would be influenced by preconditioning with sustained hypoxia (SH).

As in CIH, in other models of hypertension the main cause associated with the rise of arterial pressure relies on the sympathetic overactivity. Among those models are the renovascular hypertension 1 kidney, 1 clip (1K, 1C) and the spontaneous

hypertensive rats (SHR). In this sense, another goal of this study was to evaluate whether a previous exposure to CIH could affect the cardiovascular and respiratory responses produced by the 1K, 1C and the SHR model.

Our results are showing that preconditioning with either CIH or SH did not alter the cardiovascular response produced by a subsequent exposure to CIH. On the other side, the level of hypertension promoted by 1K, 1C was significantly reduced in CIH preconditioned rats, via inhibition of the vascular sympathetic tone. The procedure of renal denervation practically eliminated the rise in arterial pressure associated with 1K, 1C. Additionally, after bilateral carotid body removal, the level of hypertension observed in 1K, 1C rats was the same, regardless CIH preconditioning. However, preconditioning with CIH did not affect the development of hypertension in SHR.

Key words: Chronic intermittent hypoxia, Preconditioning, Hypertension models, Sympathetic activity, Arterial pressure.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Painel A, representação esquemática ilustrando o protocolo de hipóxia crônica intermitente (HCI). Painel B, representação esquemática ilustrando o protocolo controle. 47
- Figura 2. Painel A, representação esquemática ilustrando o protocolo de hipóxia mantida (HM). Painel B, representação esquemática ilustrando o protocolo controle... 48
- Figura 3. Traçados de um rato representativo do grupo Sham-Con (submetido à cirurgia Sham para remoção do corpúsculo carotídeo, seguida de normóxia, e após cirurgia Sham para o modelo 1R, 1C), mostrando as respostas de pressão arterial (PAP, pressão arterial pulsátil; PAM, pressão arterial média) e da frequência cardíaca (FC) à ativação do quimiorreflexo (painel A) e do barorreflexo (painel B); e de um rato representativo do grupo RCC/Con-1R, 1C (submetido à cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo, seguida de normóxia, e após cirurgia para instalação do modelo 1R, 1C), mostrando as respostas de pressão arterial (PAP e PAM) e da FC à ativação do quimiorreflexo (painel C) e do barorreflexo (painel D). 52
- Figura 4. Painel A, Histograma de distribuição dos valores da pressão arterial média (PAM) e painel B, *normal probability plot* da PAM de um grupo controle representativo..... 57
- Figura 5. Protocolo experimental para avaliar os efeitos de uma exposição prévia à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias em resposta a uma segunda exposição à HCI 15 dias depois. O esquema acima ilustra cada fase do protocolo para os grupos Con, HCI e Pré-HCI..... 59
- Figura 6. Protocolo experimental para o acompanhamento temporal da elevação da pressão arterial durante a hipóxia crônica intermitente (HCI). O esquema acima ilustra

cada fase desenvolvida nos protocolos experimentais para os grupos HCI 3 dias e Pré-HCI/HCI 3 dias.	61
Figura 7. Protocolo experimental para avaliar os efeitos de uma exposição prévia à hipóxia mantida (HM) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias em resposta a uma segunda exposição à hipóxia crônica intermitente (HCI). O esquema acima ilustra cada fase desenvolvida nos protocolos experimentais para os grupos Con, HCI e Pré-HM.	63
Figura 8. Protocolo experimental para avaliar os efeitos de uma exposição prévia à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas pelo modelo de hipertensão renovascular 1 rim, 1 clipe (1R-1C). O esquema acima ilustra cada fase do protocolo para os grupos Con-Sham, Con-1R, 1C, HCI-Sham e HCI-1R, 1C.	65
Figura 9. Protocolo experimental para avaliar os efeitos de uma exposição prévia à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares promovidas pelo modelo da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R-1C) com desnervação renal (DR). O esquema acima ilustra cada fase dos protocolos experimentais para os grupos Con-1R, 1C/DR Sham, Con-1R, 1C/DR, HCI-1R, 1C/DR Sham e HCI-1R, 1C/DR.	67
Figura 10. Protocolo experimental para avaliar os efeitos de uma exposição prévia à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares promovidas pelo modelo de hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R-1C) em animais previamente submetidos a cirurgia para remoção do corpúsculo carotídeo (RCC). O esquema acima ilustra cada fase do protocolo para os grupos Sham-Con, RCC/Con-1R, 1C e RCC/HCI-1R, 1C.	70

Figura 11. Protocolos experimentais para avaliar os efeitos uma exposição prévia à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). O esquema acima ilustra cada fase dos protocolos experimentais para os grupos WKY-Con, SHR-Con, WKY-HCI e SHR-HCI.

..... 72

Figura 12. Painel A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HCI (Pré-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

..... 75

Figura 13. Variância total da pressão arterial sistólica avaliada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HCI (Pré-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Figura 14. Potência das bandas LF (Painel A) e HF (Painel B) no espectro da pressão arterial sistólica avaliada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HCI (Pré-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Figura 15. Painel A, frequência respiratória (f); painel B, volume corrente; painel C, ventilação basal, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente

submetidos à HCI (Pré-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 78

Figura 16. Painel A, traçados de um rato representativo dos grupos controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HCI (Pré-HCI). O painel B mostra os valores e a média da resposta da frequência cardíaca (FC) e o painel C mostra os valores e a média da resposta da pressão arterial média (PAM) em resposta à ativação do quimiorreflexo com cianeto de potássio (KCN), avaliada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos Con, HCI e Pré-HCI. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 80

Figura 17. Média da frequência respiratória (f) avaliada a cada 2 segundos, durante 20 segundos antes e 20 segundos após a ativação do quimiorreflexo com cianeto de potássio (KCN; indicado pela seta vermelha), realizada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HCI (Pré-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 81

Figura 18. Painel A, traçados de um rato representativo dos grupos controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HCI (Pré-HCI). O painel B mostra os valores e a média da bradicardia reflexa (Δ FC) e o painel C mostra os valores e a média da elevação na pressão arterial média (Δ PAM) em resposta à injeção de fenilefrina 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos Con, HCI e Pré-HCI. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 83

Figura 19. Painel A, traçados de um rato representativo dos grupos controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HCI (Pré-HCI). O

painel B mostra os valores e a média da bradicardia reflexa (ΔFC) e o painel C mostra os valores e a média da queda da pressão arterial média (ΔPAM) em resposta à injeção de nitroprussiato de sódio 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos Con, HCI e Pré-HCI. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 85

Figura 20. Painel A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: hipóxia crônica intermitente de 3 dias (HCI 3 dias) e previamente submetidos à HCI seguida de HCI de 3 dias (Pré-HCI/HCI 3 dias). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 87

Figura 21. Painel A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ 89

Figura 22. Painel A, frequência respiratória (f); painel B, volume corrente; painel C, ventilação basal, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 90

Figura 23. Painel A, traçados de um rato representativo dos grupos controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). O painel

B mostra os valores e a média da resposta da frequência cardíaca (FC) e o painel C mostra os valores e a média da resposta da pressão arterial média (PAM) em resposta à ativação do quimiorreflexo com cianeto de potássio (KCN), avaliada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos Con, HCI e Pré-HM. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ 92

Figura 24. Média da frequência respiratória (f) avaliada a cada 2 segundos, durante 20 segundos antes e 20 segundos após a ativação do quimiorreflexo com cianeto de potássio (KCN; indicado pela seta vermelha), realizada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ 93

Figura 25. Painel A, traçados de um rato representativo dos grupos controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). O painel B mostra os valores e a média da bradicardia reflexa (ΔFC) e o painel C mostra os valores e a média da elevação na pressão arterial média (ΔPAM) em resposta à injeção de fenilefrina 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos Con, HCI e Pré-HM. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 95

Figura 26. Painel A, traçados de um rato representativo dos grupos controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). O painel B mostra os valores e a média da bradicardia reflexa (ΔFC) e o painel C mostra os valores e a média da queda da pressão arterial média (ΔPAM) em resposta à injeção de nitroprussiato de sódio 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos Con, HCI e Pré-HM. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 97

Figura 27. Peso corporal avaliado 24 horas após o encerramento do protocolo experimental. nos grupos: controle seguido de cirurgia Sham (Con-Sham); controle seguido de cirurgia 1R, 1C (Con-1R, 1C); hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia Sham (HCI-Sham) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C (HCI-1R, 1C). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ 98

Figura 28. Gráfico de dispersão entre o peso corporal e a pressão arterial média (PAM) basal registrada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle seguido de cirurgia 1R, 1C (Con-1R, 1C) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C (HCI-1R, 1C). A figura acima mostra que não há associação entre o peso corporal dos animais e os valores de PAM obtidos no dia do registro. A linha contínua mostra a “best fit line” calculada na regressão linear pelo métodos dos mínimos quadrados, enquanto que as linhas tracejadas representam as bandas de confiança (95%)..... 99

Figura 29. Painel A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle seguido de cirurgia Sham (Con-Sham); controle seguido de cirurgia 1R, 1C (Con-1R, 1C); hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia Sham (HCI-Sham) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C (HCI-1R, 1C). Registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ 101

Figura 30. Painel A, frequência respiratória (f); painel B, volume corrente; painel C, ventilação basal, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental

nos grupos: controle seguido de cirurgia Sham (Con-Sham); controle seguido de cirurgia 1R, 1C (Con-1R, 1C); hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia Sham (HCI-Sham) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C (HCI-1R, 1C). Registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 103

Figura 31. Protocolo de bloqueio ganglionar com hexametônio. Painel A, pressão arterial média (PAM) antes (basal), após a injeção sequencial de losartan, AVPx e hexametônio. Painel B, variações na PAM promovidas pela injeção de hexametônio realizada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle seguido de cirurgia Sham (Con-Sham); controle seguido de cirurgia 1R, 1C (Con-1R, 1C); hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia Sham (HCI-Sham) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C (HCI-1R, 1C). Os registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ 105

Figura 32. Painel A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle seguido de cirurgia 1R, 1C + desnervação renal Sham (Con-1R, 1C/DR Sham); controle seguido de cirurgia 1R, 1C + desnervação renal (Con-1R, 1C/DR); hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C + desnervação renal Sham (HCI-1R, 1C/DR Sham) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C + desnervação renal (HCI-1R, 1C/DR). Registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ 108

Figura 33. Painel A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo Sham seguida de controle + cirurgia 1R, 1C (Sham-Con); cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo seguida de controle + cirurgia 1R, 1C (RCC/Con-1R, 1C); cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo seguida de hipóxia crônica intermitente + cirurgia 1R, 1C (RCC/HCI-1R, 1C). Registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ 110

Figura 34. Protocolo de bloqueio ganglionar com hexametônio. Painel A, pressão arterial média (PAM) antes (basal), após a injeção sequencial de losartan, AVPx e hexametônio. Painel B, variações na PAM promovidas pela injeção de hexametônio realizada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo Sham seguida de controle + cirurgia 1R, 1C (Sham-Con); cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo seguida de controle + cirurgia 1R, 1C (RCC/Con-1R, 1C); cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo seguida de hipóxia crônica intermitente + cirurgia 1R, 1C (RCC/HCI-1R, 1C). Os registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ 112

Figura 35. Painel A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: ratos Wistar Kyoto submetidos ao controle (WKY-Con); ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao controle (SHR-Con); ratos Wistar Kyoto submetidos à

hipóxia crônica intermitente (WKY-HCI); ratos espontaneamente hipertensos submetidos à hipóxia crônica intermitente (SHR-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ 114

Figura 36. Frequência Painel A, frequência respiratória (f); painel B, volume corrente; painel C, ventilação basal, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: ratos Wistar Kyoto submetidos ao controle (WKY-Con); ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao controle (SHR-Con); ratos Wistar Kyoto submetidos à hipóxia crônica intermitente (WKY-HCI); ratos espontaneamente hipertensos submetidos à hipóxia crônica intermitente (SHR-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 116

Figura 37. Protocolo de bloqueio ganglionar com hexametônio. Painel A, pressão arterial média (PAM) antes (basal), após a injeção sequencial de losartan, AVPx e hexametônio. Painel B, variações na PAM promovidas pela injeção de hexametônio realizada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: ratos Wistar Kyoto submetidos ao controle (WKY-Con); ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao controle (SHR-Con); ratos Wistar Kyoto submetidos à hipóxia crônica intermitente (WKY-HCI); ratos espontaneamente hipertensos submetidos à hipóxia crônica intermitente (SHR-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ 118

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Valores basais da duração do ciclo respiratório, da inspiração e da expiração, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HCI (Pré-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média..... 79
- Tabela 2. Valores basais da duração do ciclo respiratório, da inspiração e da expiração, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 91
- Tabela 3. Duração do ciclo respiratório, da inspiração e da expiração, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle seguido de cirurgia Sham (Con-Sham); controle seguido de cirurgia 1R, 1C (Con-1R, 1C); hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia Sham (HCI-Sham) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C (HCI-1R, 1C). Registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 104
- Tabela 4. Duração do ciclo respiratório, da inspiração e da expiração registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: ratos Wistar Kyoto submetidos ao controle (WKY-Con); ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao controle (SHR-Con); ratos Wistar Kyoto submetidos à hipóxia crônica intermitente (WKY-HCI); ratos espontaneamente hipertensos submetidos à hipóxia crônica intermitente (SHR-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. 117

LISTA DE ABREVIATURAS

f	Frequência respiratória
1R, 1C	1 rim, 1 clipe
AOS	Apneia obstrutiva do sono
DR	Desnervação renal
FC	Frequência cardíaca
FIO ₂	Fração inspirada de oxigênio
HCI	Hipóxia crônica intermitente
HIFs	Hypoxia inducible factors
HM	Hipóxia Mantida
KCN	Cianeto de potássio
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
RCC	Remoção do corpúsculo carotídeo
RVLM	Região rostral ventrolateral do bulbo
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
WKY	Ratos Wistar Kyoto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	31
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
Animais	46
Hipóxia crônica intermitente (HCI)	46
Hipóxia mantida (HM)	47
Canulação da artéria e da veia femoral	48
Modelo 1 rim, 1 clipe (1R, 1C).....	49
Desnervação renal	49
Remoção do corpúsculo carotídeo	50
Registros da pressão arterial e da frequência cardíaca	52
Registros da frequência respiratória, do volume corrente e da ventilação	53
Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca	54
Análise do tônus simpático vascular	55
Ativação dos reflexos	56
Análise estatística.....	56
Protocolos experimentais	58
Protocolo 1 – Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma segunda exposição à HCI.....	58
Protocolo 2 – Evolução temporal da elevação da pressão arterial em resposta à HCI em ratos previamente expostos à HCI.....	60

Protocolo 3 – Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia mantida (HM) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma nova exposição à hipóxia crônica intermitente (HCI)	61
Protocolo 4 – Influência do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)	63
Protocolo 5 – Participação da inervação renal no pré-condicionamento promovido pela hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)	65
Protocolo 6 – Participação dos quimiorreceptores periféricos no pré-condicionamento promovido pela hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C).....	68
Protocolo 7 – Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)	70
4. RESULTADOS	73
Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma segunda exposição à HCI.....	74
Variáveis cardiovasculares basais	74
Análise espectral	75
Variáveis respiratórias basais.....	77
Duração das diferentes fases do ciclo respiratório	78
Respostas cardiovasculares e respiratórias à ativação do quimiorreflexo	79
Respostas cardiovasculares em resposta à ativação do barorreflexo	82

Evolução temporal da elevação da pressão arterial em resposta à HCI de ratos previamente expostos à HCI.....	86
Variáveis cardiovasculares basais	86
Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia mantida (HM) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma nova exposição à hipóxia crônica intermitente (HCI)	88
Variáveis cardiovasculares basais	88
Variáveis respiratórias basais.....	89
Duração das diferentes fases do ciclo respiratório	90
Respostas cardiovasculares e respiratórias à ativação do quimiorreflexo	91
Respostas cardiovasculares em resposta à ativação do barorreflexo	93
Influência do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)	98
Peso corporal.....	98
Variáveis cardiovasculares basais	100
Variáveis respiratórias basais.....	101
Duração das diferentes fases do ciclo respiratório	103
Bloqueio ganglionar	104
Participação da inervação renal no pré-condicionamento promovido pela hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C).....	106
Variáveis cardiovasculares basais	106

Participação dos quimiorreceptores periféricos no pré-condicionamento promovido pela hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C).....	109
Variáveis cardiovasculares basais	109
Bloqueio ganglionar	111
Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)	113
Variáveis cardiovasculares basais	113
Variáveis respiratórias basais.....	115
Duração das diferentes fases do ciclo respiratório	116
Bloqueio ganglionar	117
5. DISCUSSÃO	119
Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma segunda exposição à HCI.....	120
Influência do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)	128
Participação da inervação renal no pré-condicionamento promovido pela hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C).....	134
Participação dos quimiorreceptores periféricos no pré-condicionamento promovido pela hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C).....	136

Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)	139
7. CONCLUSÕES	142
8. REFERÊNCIAS.....	144
ANEXOS.....	164

1. INTRODUÇÃO

A apneia obstrutiva do sono (AOS) foi foco de vários estudos nos últimos anos (Baby *et al.*, 2011; Kasai and Bradley, 2011; Ludka *et al.*, 2011; Pronzato, 2010; Randby *et al.*, 2012). Estima-se que na população adulta aproximadamente 25% dos homens e 10% das mulheres têm AOS (Peppard *et al.*, 2013; Young *et al.*, 1993). Essa doença é caracterizada pela interrupção repetida dos ciclos respiratórios durante o sono, com duração de pelo menos dez segundos, devido à oclusão total ou parcial das vias aéreas superiores (Somers *et al.*, 2008). A hipóxia resultante leva a ativação dos quimiorreceptores periféricos, o que promove uma série de ajustes cardiovasculares, respiratórios e o despertar do sono. Esses ajustes visam manter os níveis arteriais de oxigênio e reestabelecer o ritmo respiratório (Guilleminault, 1987; Lurie, 2011). A polissonografia durante a noite em um laboratório especializado nos permite avaliar, concomitantemente, variáveis respiratórias, características do sono e saturação arterial de oxigênio. Esse método é considerado como padrão ouro para diagnosticar indivíduos com AOS (Jordan *et al.*, 2014).

A AOS está associada com importantes disfunções cardiovasculares, como hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e arritmias cardíacas (Ari *et al.*, 2011; Dempsey *et al.*, 2010). Estima-se que 1 em cada 5 adultos apresente um grau leve, enquanto que 1 em cada 15 adultos já tenha desenvolvido pelo menos níveis moderados da doença (Young *et al.*, 2002). Adicionalmente, cerca de 50% dos indivíduos com AOS também apresentam níveis elevados de pressão arterial, e por conta disso é considerada a causa mais comum de hipertensão arterial secundária (Pedrosa *et al.*, 2011).

Diversos fatores de risco podem contribuir para o desenvolvimento da AOS, como fatores genéticos, obesidade, sexo e idade (Jordan *et al.*, 2014). O tratamento mais

indicado, não importando a origem do problema, é o uso do CPAP (*continuous positive airway pressure*). Esse equipamento assegura uma pressão de ar positiva nas vias aéreas superiores suficiente para manter a respiração constante por ocasião das apneias durante o período de sono. No entanto, a aderência ao uso continuado do tratamento, que muitas vezes pode durar a vida toda, é reduzida e os ciclos de hipóxia durante o sono retornam (Sawyer *et al.*, 2011).

Considerando as limitações para estudar os mecanismos fisiopatológicos associados à AOS, Fletcher *et al.* (1992) desenvolveram um modelo experimental em ratos que permite simular situações de hipoxemia decorrentes desse distúrbio do sono. Nesse modelo experimental, a fração inspirada de oxigênio (FIO_2) durante o período de sono é repetidamente reduzida, por meio da injeção de nitrogênio/oxigênio dentro de câmaras de acrílico fechadas. A redução cíclica da FIO_2 determina uma condição conhecida como hipóxia crônica intermitente (HCI). Após 30 dias de exposição à HCI, os animais apresentaram aumento em torno de 15 mmHg na pressão arterial média, assim como remodelamento no tecido cardíaco (Fletcher *et al.*, 1992). Por outro lado, a desnervação bilateral do corpúsculo carotídeo eliminou completamente a resposta pressora induzida pela HCI, mostrando a importância dos quimiorreceptores periféricos para o desenvolvimento das alterações cardiovasculares nesse modelo de hipertensão neurogênica (Fletcher *et al.*, 1992). Atualmente, os protocolos de HCI reportados na literatura variam consideravelmente entre os estudos, embora frequentemente a FIO_2 é reduzida para 5%, durante 15-30 segundos, entre 8 e 12 vezes por hora (Kanagy *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2006; Pawar *et al.*, 2008; Zoccal *et al.*, 2008).

Todas as células do organismo são sensíveis às variações na concentração extracelular de oxigênio, podendo responder a tais estímulos (Semenza, 2011).

Entretanto, um conjunto de células neuroepiteliais apresenta a capacidade intrínseca de se despolarizarem frente a situações de hipóxia, estimulando terminais axonais de fibras aferentes com as quais elas fazem sinapse (Heymans and Bouckaert, 1930; Lahiri *et al.*, 2006). Essas, são células glomus do tipo 1, e estão localizadas em um pequeno órgão próximo à bifurcação das artérias carótidas comuns, denominados de corpúsculos carotídeos. No arco aórtico, células quimiossensíveis com características histológicas similares às dos corpúsculos carotídeos também foram identificadas, embora sejam escassamente distribuídas em ratos (Easton and Howe, 1983).

Diferentes mecanismos foram propostos para explicar como alterações na pressão parcial de oxigênio arterial podem ser detectadas pelas células glomus do tipo 1. Um deles depende da atividade tônica do monóxido de carbono sobre os canais de potássio ativados por cálcio presentes na membrana das células glomus. O monóxido de carbono é produzido pela enzima heme-oxigenase 2, juntamente com a biliverdina e o ferro. Essa reação química acontece a partir do catabolismo do grupamento heme, na presença dos cofatores oxigênio e NADPH (Williams *et al.*, 2004). A formação constante do monóxido de carbono em condições de normóxia mantêm abertos os canais de potássio ativados por cálcio (Hou *et al.*, 2009). Em situações de hipóxia, a falta de oxigênio limita a produção de monóxido de carbono levando ao fechamento dos canais de potássio ativados por cálcio, o que leva a despolarização celular e liberação do neurotransmissor na fenda sináptica (Williams *et al.*, 2004).

Outro mecanismo proposto depende da atividade mitocondrial. Em situações de hipóxia, a atividade mitocondrial é inibida, reduzindo a produção de ATP pela via oxidativa. Em decorrência disso, observamos um aumento na relação AMP/ATP intracelular e, conseqüentemente, ativação da enzima quinase dependente de AMP

(Evans, 2006; Evans *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2005; Wyatt *et al.*, 2007). A ativação dessa enzima inibe tanto canais de potássio ativados por cálcio, quanto canais de potássio de vazamento (Wyatt *et al.*, 2007), o que leva a despolarização celular e liberação do neurotransmissor na fenda sináptica.

Um ou mais neurotransmissores podem ser liberados na fenda sináptica e promover a despolarização do terminal pós-sináptico em situações de hipóxia, dentre os quais podemos destacar a dopamina (Nurse, 2005; Urena *et al.*, 1994) e o ATP (Nurse, 2005). As células glomus do corpúsculo carotídeo fazem sinapse com fibras aferentes que se projetam para o núcleo do trato solitário no tronco cerebral (Peers *et al.*, 2010). Neurônios do núcleo do trato solitário enviam projeções para outros centros no sistema nervoso central, como para o grupo respiratório ventral e para a região rostral ventrolateral do bulbo, conhecida como RVLM (Zoccal *et al.*, 2009). Esses centros possuem neurônios com característica autodespolarizante que estão envolvidos com a gênese do ritmo respiratório e da atividade simpática, respectivamente (Guyenet *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1991).

Os vasos de resistência recebem inervação simpática de neurônios provenientes dos gânglios paravertebrais. A atividade desses neurônios é controlada por projeções colinérgicas excitatórias de neurônios pré-ganglionares simpáticos, localizados na coluna intermédio-lateral da medula espinhal. Existem evidências de que alguns neurônios pré-ganglionares simpáticos também apresentam característica autodespolarizante, mas o padrão de oscilações rítmicas característico da atividade simpática depende de áreas supraespinhais (Logan *et al.*, 1996). Além da RVLM, outras regiões do bulbo, da ponte, do hipotálamo, e da medula espinhal estão envolvidas com a geração da atividade simpática, e esses grupos neuronais enviam projeções

glutamatérgicas para a coluna intermédio-lateral da medula espinhal. Muito provavelmente, a interação sináptica dessas áreas determina a atividade simpática basal (Guyenet, 2006).

Em adição aos resultados reportados por Fletcher *et al.* (1992), estudos posteriores de outros laboratórios mostraram que a exposição de ratos jovens e adultos à HCI está associada à diversas alterações cardiovasculares e respiratórias. Dentre essas, podemos destacar níveis elevados da pressão arterial, maior resistência periférica total, hipertrofia cardíaca, redução do débito cardíaco e alteração no acoplamento simpático-respiratório (Chen *et al.*, 2005; Fletcher *et al.*, 1992; Zoccal *et al.*, 2008). O mecanismo envolvido no desenvolvimento dessas alterações depende tanto da ativação intermitente e crônica dos quimiorreceptores periféricos durante os episódios de hipóxia, como da subsequente estimulação de centros de controle cardiovascular no sistema nervoso central (Fletcher *et al.*, 1992; Fletcher *et al.*, 1992). A estimulação desses centros leva ao aumento da atividade simpática sobre os vasos de resistência e, finalmente, elevação da pressão arterial (Fletcher *et al.*, 1992; Moraes *et al.*, 2013).

Estudos do nosso laboratório também demonstraram aumento da força de contração ventricular após a ativação do quimiorreflexo, efeito mediado por uma maior estimulação simpática sobre o coração (Braga *et al.*, 2007). Adicionalmente, foi demonstrado que o acoplamento simpático-respiratório está alterado após o protocolo de HCI, apresentando um aumento da atividade simpática no período expiratório final, enquanto que o pico de atividade simpática observado ao final da inspiração/pós-inspiração no animal controle permanece (Zoccal *et al.*, 2008). Esse pico adicional da atividade simpática na fase expiratória final desses animais pode explicar os níveis elevados de pressão arterial em ratos submetidos à HCI.

Estudos do nosso laboratório mostraram que a atividade simpática está aumentada após 35 dias de HCI em ratos adultos. A contribuição da atividade simpática para o aumento de pressão arterial observado nesse estudo foi avaliada por meio do bloqueio dos gânglios autonômicos com hexametônio, realizado após o antagonismo dos receptores AT1 da angiotensina II e dos receptores V1 da vasopressina. A maior queda da pressão arterial promovida pela injeção de hexametônio em ratos submetidos à HCI revelou que, nesse modelo de hipertensão neurogênica, os níveis elevados de pressão arterial são mediados pelo aumento da atividade simpática (Zoccal *et al.*, 2007). Adicionalmente, por meio da preparação coração-tronco cerebral isolados, foi observado que a resposta cardiovascular e respiratória promovida pela ativação do quimiorreflexo está aumentada em ratos jovens (P19 – P21 dias) submetidos à HCI por 10 dias, incluindo aumento nas respostas de taquipneia e bradicardia. Nesse estudo de Braga *et al.* (2006), o quimiorreflexo foi ativado por meio da injeção de cianeto de potássio (KCN), a qual promove uma hipóxia citotóxica sobre as células do corpúsculo carotídeo.

Estudos mostraram que a influência inibitória do barorreflexo sobre o sistema nervoso simpático está prejudicada após a HCI, o que ajuda a explicar o aumento da atividade simpática e da pressão arterial observada nesse modelo de hipertensão neurogênica (Prabhakar and Kumar, 2010). No entanto, o aumento da atividade simpática parece preceder a disfunção no controle barorreflexo promovida pela HCI (Lai *et al.*, 2006). Adicionalmente, estudos do nosso laboratório realizados em animais não anestesiados mostraram que a hipertensão causada por 10 dias de exposição à HCI não está relacionada a uma redução do ganho barorreflexo, o qual, de fato, está aumentado nesses animais (Zoccal *et al.*, 2009).

Estudos do nosso laboratório mostraram que os elevados valores de pressão arterial observados após 10 dias de HCI retornam aos valores basais após 15 dias de normóxia (Zoccal *et al.*, 2009). No entanto, análises eletrofisiológicas indicam que a transmissão sináptica em neurônios do núcleo do trato solitário permanece alterada mesmo após três semanas de normóxia (Almado, 2012). Esses resultados sugerem que a exposição à HCI pode causar alterações plásticas na rede neuronal envolvida no controle cardiovascular e respiratório. Outros estudos corroboram com esses achados, mostrando que ratos submetidos a modelos experimentais de estresse durante a fase inicial de vida passam a apresentar alterações cardiovasculares e respiratórias na vida adulta, como hipertensão, maior resposta ventilatória à hipóxia e instabilidade respiratória durante o sono (Genest *et al.*, 2004; Kinkead *et al.*, 2009; Nanduri *et al.*, 2012).

Outro ponto que merece destaque é que a exposição de ratos neonatos a episódios de hipóxia intermitente leva ao aumento da frequência de disparos das fibras aferentes do corpúsculo carotídeo, e da secreção de catecolaminas pela camada de células cromafins da medula adrenal em resposta à hipóxia na vida adulta. Esses efeitos estão associados ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio nesses órgãos, induzida pela HCI (Nanduri *et al.*, 2012; Souvannakitti *et al.*, 2009). Adicionalmente, foi observado que a simpatoexcitação promovida por um episódio de hipóxia aguda foi maior em animais pré-condicionados à HCI por 30 dias em relação aos controles, efeito que foi potencializado pela combinação entre hipóxia e hipercapnia (Greenberg *et al.*, 1999).

Em conjunto esses estudos citados acima sugerem que ratos expostos à HCI passam a apresentar alterações plásticas na rede neuronal, que persistem mesmo após o

retorno da pressão arterial aos valores basais. Desse modo, uma nova exposição à HCI pode gerar alterações cardiovasculares e respiratórias diferentes daquelas observadas em ratos que não passaram por essa prévia exposição à hipóxia. Estudos mostraram que desde o 3º dia após a primeira exposição à HCI, os níveis de pressão arterial de ratos adultos já estão aumentados em relação aos animais controle, podendo ser observado um platô a partir do 4º ou 5º dia de exposição (Lai *et al.*, 2006). No entanto, a pré-exposição à HCI também pode modificar a evolução temporal do aumento da pressão arterial, considerando que animais pré-condicionados podem apresentar maior resistência ou serem mais susceptíveis frente a novos episódios hipóxicos.

Diferentes estímulos hipóxicos estão associados com respostas respiratórias específicas, o que também parece estar relacionado ao sexo e a idade dos animais (Reeves *et al.*, 2003). A exposição prévia à hipóxia mantida (HM) no período pós-natal promove alterações plásticas persistentes na vida adulta em componentes noradrenérgicos de núcleos cardiorrespiratórios, influenciando a resposta ventilatória induzida por estímulos hipóxicos futuros. Esses efeitos são ainda potencializados pela combinação entre HM pós-natal e HCI na vida adulta (Olea *et al.*, 2012). Adicionalmente, foi mostrado que a combinação entre HM e HCI no período pós-natal reduz a sensibilidade à hipóxia do corpúsculo carotídeo, mas aumenta a excitabilidade dos neurônios do núcleo do trato solitário em resposta à estimulação do trato solitário. Essas alterações não ocorreram quando esses estímulos foram aplicados isoladamente (Mayer *et al.*, 2015).

Assim como a HCI, outros modelos de hipertensão também estão associados com elevação da atividade simpática, como a hipertensão renovascular, ratos espontaneamente hipertensos (Gerald *et al.*, 2013) e angiotensina-sal sensível (Toney

et al., 2010). No modelo de hipertensão renovascular 1 rim, um clipe (1R, 1C), o sistema renina-angiotensina parece contribuir para a resposta hipertensora inicial, mas cronicamente os níveis plasmáticos de renina são similares aos observados em animais controle (Katholi *et al.*, 1981; Pals *et al.*, 1971). Estudos mostraram que a inibição do sistema angiotensinérgico, por meio da administração de um antagonista dos receptores da angiotensina II, promoveu redução dos níveis pressóricos apenas na fase aguda do modelo de hipertensão 1R, 1C (Davis *et al.*, 1974; Pals *et al.*, 1971). Por outro lado, o procedimento de desnervação renal reduziu em mais de 40 mmHg os valores de pressão arterial sistólica de ratos hipertensos 2 semanas após o implante do clipe na artéria renal.

Estudos posteriores mostraram uma correlação positiva entre a pressão arterial média e os níveis plasmáticos de noradrenalina, o que indica que a atividade simpática está aumentada no modelo 1R, 1C. Esse resultado foi confirmado por meio da administração de hexametônio, sendo observada uma maior queda da pressão arterial nos animais 1R, 1C em relação aos controles (Katholi *et al.*, 1982). No entanto, a queda da pressão arterial promovida pela desnervação renal parece depender exclusivamente das aferências renais e não da inervação eferente simpática, tendo em vista que a natriurese observada após o procedimento de desnervação renal foi similar entre animais submetidos ao modelo 1R, 1C e animais controle, excluindo a participação da inervação simpática renal (Katholi *et al.*, 1981). Nesse sentido, estudos sugerem que o aumento da atividade das fibras aferentes renais pode alterar a atividade de neurônios geradores da atividade simpática na RVLM (Vizzard *et al.*, 1992), o que explica o aumento da atividade simpática na fase crônica do modelo 1R, 1C. A possível

influência da HCI sobre o desenvolvimento da hipertensão no modelo 1R, 1C ainda não foi estudada.

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foi originalmente desenvolvida a partir do cruzamento entre ratos Wistar que apresentavam elevados valores de pressão arterial na idade adulta sem qualquer intervenção cirúrgica, assim como entre o cruzamento de seus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) (Okamoto and Aoki, 1963). Nesse modelo, sabemos que os animais desenvolvem hipertensão por volta da quinta semana de vida (Zicha and Kunes, 1999), o que está associado com o aumento da atividade simpática. Assim como em outros modelos de hipertensão, a atividade simpática de animais SHR está aumentada mesmo antes da elevação da pressão arterial (Simms *et al.*, 2009). Esse aumento parece estar associado a uma maior atividade aferente dos corpúsculos carotídeos (Abdala *et al.*, 2012; Przybylski, 1981). Nesse sentido, estudos anteriores mostraram que a exposição de ratos neonatos SHR à HCI potencializa o desenvolvimento da hipertensão arterial na idade adulta (Soukhova-O'Hare *et al.*, 2008). Adicionalmente, estudos recentes mostraram que a resposta cardiovascular à apneia obstrutiva está aumentada em ratos SHR, o que se deve a uma maior sensibilidade dos quimiorreceptores periféricos (Angheben *et al.*, 2014). Esses achados em conjunto sugerem uma possível interação entre os modelos de hipertensão SHR e HCI. Portanto, estudamos também o possível efeito da HCI sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos SHR.

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram os seguintes:

1. Avaliar as respostas cardiovasculares e respiratórias de ratos Wistar ao final de um segundo protocolo de HCI, realizado 15 dias após o encerramento do primeiro protocolo de HCI.
2. Comparar a evolução temporal da elevação da pressão arterial no 4º dia do protocolo de HCI entre animais previamente submetidos à HCI e animais controle.
3. Avaliar as respostas cardiovasculares e respiratórias de ratos Wistar ao final de um protocolo de HCI, realizado 7 dias após o encerramento do protocolo de 24 horas de HM.
4. Avaliar os efeitos da exposição prévia à HCI sobre as alterações cardiovasculares observadas 9 dias após a cirurgia para instalação do modelo de hipertensão renovascular 1R, 1C.
5. Avaliar se o efeito do pré-condicionamento promovido pela HCI sobre o modelo 1R, 1C está associado a uma menor atividade simpática nesses animais, quando comparados com animais submetidos apenas ao procedimento 1R, 1C.
6. Avaliar se o efeito do pré-condicionamento promovido pela HCI sobre o modelo 1R, 1C depende da inervação renal.

7. Avaliar se o efeito do pré-condicionamento promovido pela HCI sobre o modelo 1R, 1C depende da integridade dos quimiorreceptores periféricos, ou se esse é um efeito direto da HCI em neurônios autonômicos no sistema nervoso central.

8. Avaliar se o desenvolvimento da hipertensão arterial no modelo SHR pode ser influenciado pelo pré-condicionamento à HCI.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar ou ratos SHR/WKY provenientes do Serviço de Biotério do Campus da USP de Ribeirão Preto. Durante o período prévio à realização dos experimentos, os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno forradas com maravalha (34,5 cm de largura, 41 cm de comprimento e 21 cm de altura), com no máximo cinco animais por caixa, e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP, USP. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP, protocolo nº 056/2013).

Hipóxia crônica intermitente (HCI)

O protocolo de HCI teve duração de 10 dias consecutivos (Figura 1). Inicialmente, agrupamos os animais experimentais em gaiolas coletivas, as quais foram mantidas dentro de câmaras de acrílico (volume de 210 L), equipadas com injetores de gases e sensores de oxigênio, dióxido de carbono, temperatura e umidade. Durante oito horas por dia, entre 08h30 e 16h30, os animais foram submetidos frequentemente a episódios de hipóxia em ciclos de 9 minutos. Cada ciclo foi constituído de cinco minutos de normóxia, na qual a FIO_2 foi mantida em 20,8%, seguidos de 4 minutos de injeção de nitrogênio puro, visando diminuir a FIO_2 para o nível de hipóxia desejado de 6,0%, sendo este mantido por aproximadamente 30 - 40 segundos. A seguir, as válvulas injetoras de nitrogênio foram fechadas e as válvulas injetoras de oxigênio foram abertas, promovendo rapidamente o aumento da FIO_2 ao nível inicial de 20,8%. Nas 16 horas remanescentes (entre 16h30 e 08h30) os animais permaneceram em normóxia. Simultaneamente, animais controle foram mantidos em câmaras idênticas àquelas dos

animais experimentais, mas durante todo protocolo de HCI eles permaneceram em normóxia (Figura 1). Esse protocolo foi adotado em vários estudos do nosso laboratório, o qual promoveu alterações significativas nas funções cardiovasculares e respiratórias dos animais submetidos à HCI (Zoccal *et al.*, 2009; Zoccal *et al.*, 2008).

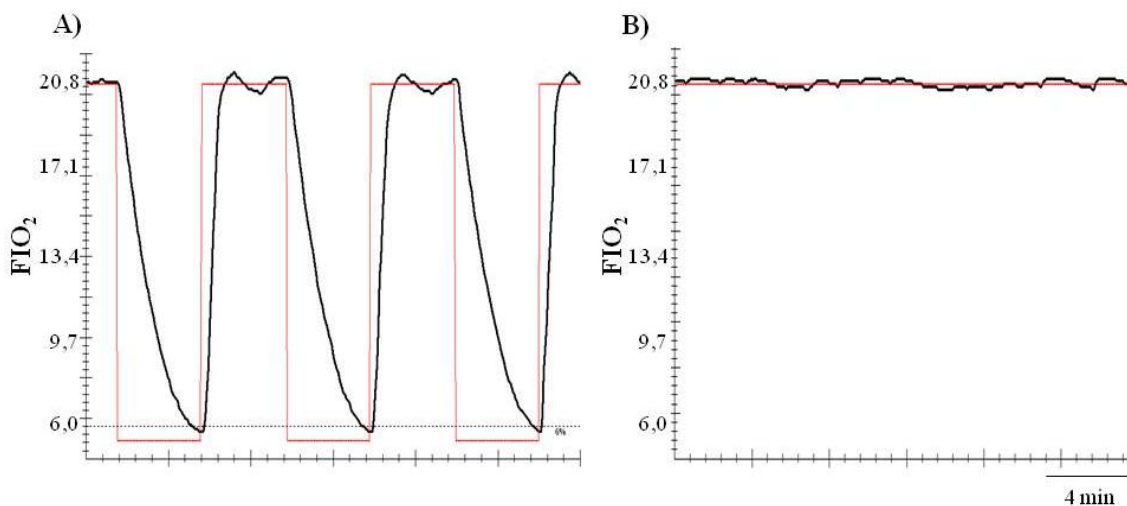


Figura 1. Painel A, representação esquemática ilustrando o protocolo de hipóxia crônica intermitente (HCI). Painel B, representação esquemática ilustrando o protocolo controle.

Hipóxia mantida (HM)

O protocolo de HM teve duração de 24 horas (Figura 2). Inicialmente agrupamos os animais experimentais em gaiolas coletivas (máximo de cinco animais por gaiola), as quais foram mantidas dentro de câmaras específicas de acrílico (volume de 210 L) equipadas com injetores de gases e sensores de oxigênio, dióxido de carbono, temperatura e umidade. Durante todo o protocolo, a FIO₂ foi mantida em 10%. Simultaneamente, animais controle foram mantidos em câmaras idênticas àquelas dos animais experimentais, mas a FIO₂ permaneceu constante em torno de 20,8% (Figura 2).

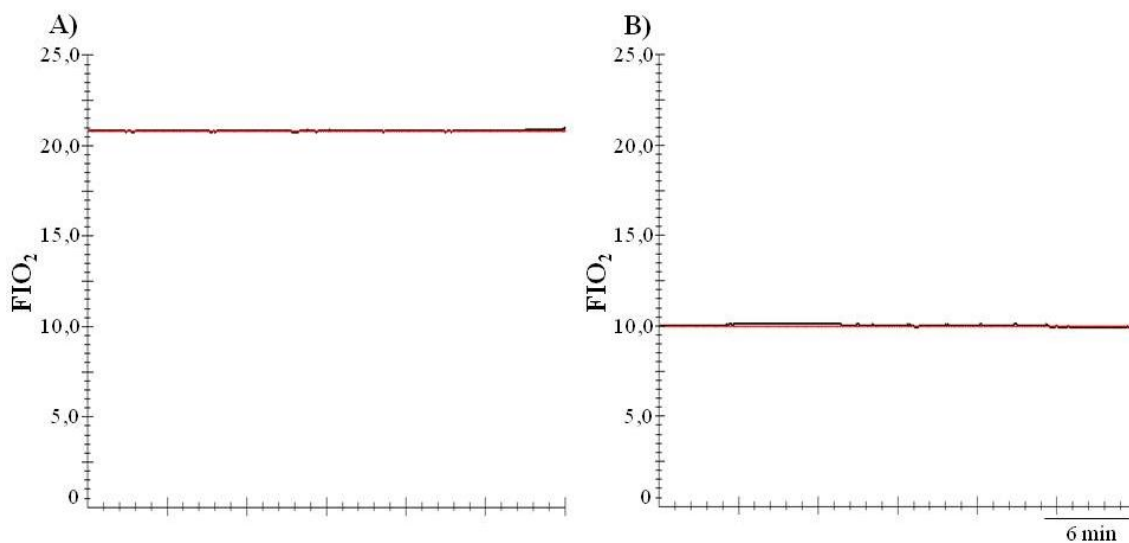


Figura 2. Painel A, representação esquemática ilustrando o protocolo de hipóxia mantida (HM). Painel B, representação esquemática ilustrando o protocolo controle.

Canulação da artéria e da veia femoral

Os ratos foram previamente anestesiados com ketamina (40mg/kg)/xilazina (5mg/kg; União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, Brasil). Com os animais sob o efeito da anestesia, um cateter PE-10 conectado a um cateter PE-50 (Clay Adams, Parsippany, EUA) foi introduzido na aorta abdominal, através de uma pequena incisura que dava acesso a artéria femoral. Outro cateter PE-10 conectado a um PE-50 (Clay Adams, Parsippany, EUA) foi introduzido na veia femoral para administração sistêmica de drogas. Ambos os cateteres foram conduzidos subcutaneamente até a cintura escapular dorsal do animal, utilizando um trocater. Os registros cardiovasculares e respiratórios (ver abaixo) foram realizados 24 horas após a cirurgia de canulação, visando minimizar os possíveis efeitos do anestésico. Ao término da cirurgia, como medida profilática, foi administrado intramuscularmente (1mg/kg) o analgésico e o antitérmico fluxina meglumina (Banamine, Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil).

Modelo 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)

Os ratos foram previamente anestesiados com ketamina (40 mg/kg)/xilazina (5mg/kg; União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, Brasil). Com os animais sob o efeito da anestesia, foi realizada uma laparotomia na linha Alba. As vísceras foram afastadas, permitindo a completa visualização do rim esquerdo. Então, a artéria renal esquerda foi isolada e um clipe de prata com abertura de 0,25 mm, fixado em volta da artéria, obstruindo parcialmente o fluxo sanguíneo. Em seguida, o rim contralateral foi localizado, a nefrectomia foi realizada, e a incisura abdominal foi suturada. Um subgrupo de animais foi submetido à cirurgia 1R, 1C Sham, na qual os mesmos procedimentos foram realizados, mas sem o implante do clipe na artéria renal esquerda. O grau de oclusão do clipe foi estabelecido com base em experimentos piloto, nos quais foi observado uma elevação nos níveis de pressão arterial média em torno de 30 mmHg após 9 dias da cirurgia. Ao término da cirurgia, como medida profilática, foi administrado intramuscularmente (1mg/kg) o analgésico e o antitérmico fluxina meglumina (Banamine, Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil) e 0,2 mL do pentabiótico veterinário 1.200.00 UI/3 mL (Fontoura-Wyeth, Campinas, Brasil). Após 8 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à cirurgia para canulação da artéria e da veia femoral para os registros da pressão arterial pulsátil, e para a injeção de drogas, respectivamente, realizados no dia seguinte.

Desnervação renal

A cirurgia de desnervação renal unilateral foi realizada simultaneamente com os procedimentos para promover hipertensão renal 1R, 1C em um subgrupo de animais. Os ratos foram previamente anestesiados com ketamina (40 mg/kg)/xilazina (5mg/kg;

União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, Brasil). Com os animais sob o efeito da anestesia, a artéria renal esquerda foi identificada e completamente isolada. Todos os nervos renais visíveis foram seccionados, incluindo fibras aderidas na camada externa da artéria. Em seguida o trecho da artéria renal isolado foi pincelado com fenol 10%, diluído em solução de álcool 100%. O procedimento de desnervação renal foi confirmado pela ausência de resposta vasoconstritora após estimulação elétrica da cadeia simpática lombar. Para tal, um eletrodo bipolar, conectado a um estimulador elétrico, foi posicionado ao redor da artéria renal esquerda. A alteração na coloração do rim de vermelho para branco foi utilizada com indicador da vasoconstrição renal. A intensidade de estimulação utilizada foi de 10 V, com duração de 0,5 ms e com frequências progressivas de 4, 8 e 10 Hz, como descrito por DiBona e Rios (1980). Em um subgrupo de animais foi realizada a cirurgia de desnervação renal Sham, na qual a artéria renal esquerda foi apenas isolada, mas com preservação da inervação renal.

Remoção do corpúsculo carotídeo

Os ratos foram anestesiados com a mistura ketamina (40 mg/kg)/xilazina (5mg/kg; União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, Brasil). Com os animais sob o efeito da anestesia, eles foram posicionados em uma mesa cirúrgica na posição supina. Foi realizada uma incisão na linha mediana do pescoço, para expor os músculos que recobrem a traqueia e a região da bifurcação carotídea. Após a dissecação do músculo esternocleidomastóideo, o mesmo foi afastado da artéria carótida comum juntamente com os nervos vago, laríngeo superior e o tronco simpático cervical. O corpúsculo carotídeo foi visualizado e removido com o auxílio de pinças cirúrgicas. Esse procedimento foi realizado em ambos os lados, visando a remoção bilateral do

corpúsculo carotídeo. Ao término da cirurgia, como medida profilática, foi administrado intramuscularmente (1mg/kg) o analgésico e o antitérmico fluxina meglumina (Banamine, Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil) e 0,2 mL do pentabiótico veterinário 1.200.00 UI/3 mL (Fontoura-Wyeth, Campinas, Brasil). A eficácia da remoção foi avaliada por meio da injeção intravenosa de 40µg de KCN, diluído em 0,05 mL de salina, após o registro basal das variáveis cardiovasculares. Em um subgrupo de animais, a integridade dos barorreceptores também foi avaliada por meio da injeção intravenosa de fenilefrina. A Figura 3 mostra os traçados da resposta cardiovascular após a ativação do quimio- e do barorreflexo em animais representativos do grupo controle e do grupo submetido à desnervação do corpúsculo carotídeo.

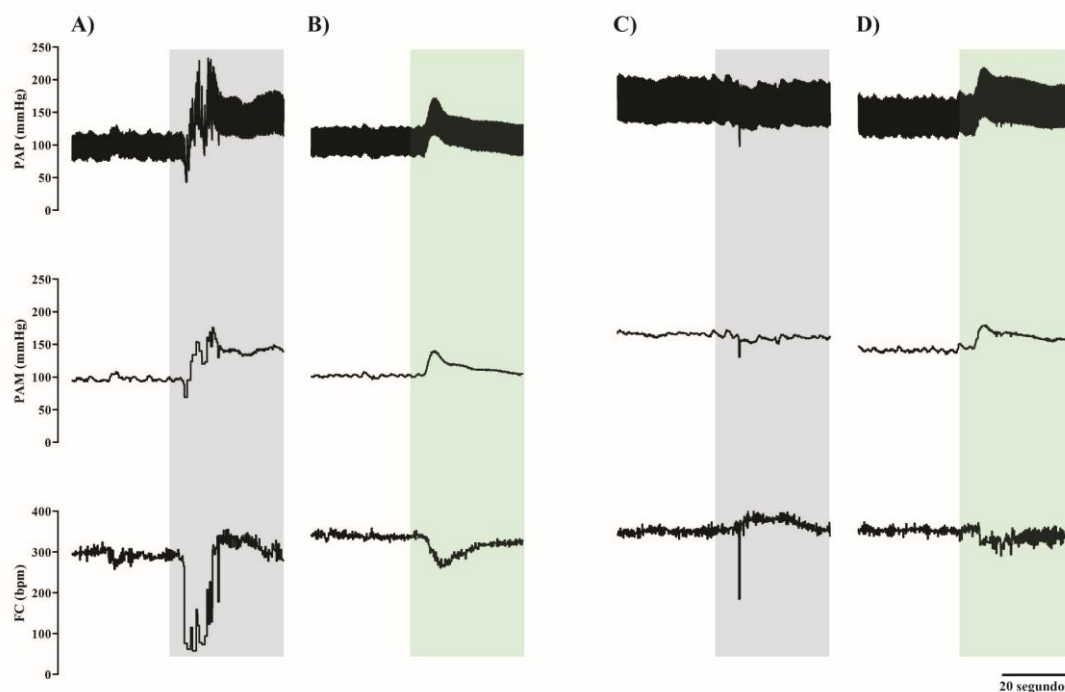


Figura 3. Traçados de um rato representativo do grupo Sham-Con (submetido à cirurgia Sham para remoção do corpúsculo carotídeo, seguida de normóxia, e após cirurgia Sham para o modelo 1R, 1C), mostrando as respostas de pressão arterial (PAP, pressão arterial pulsátil; PAM, pressão arterial média) e da frequência cardíaca (FC) à ativação do quimiorreflexo (painel A) e do barorreflexo (painel B); e de um rato representativo do grupo RCC/Con-1R, 1C (submetido à cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo, seguida de normóxia, e após cirurgia para instalação do modelo 1R, 1C), mostrando as respostas de pressão arterial (PAP e PAM) e da FC à ativação do quimiorreflexo (painel C) e do barorreflexo (painel D).

Registros da pressão arterial e da frequência cardíaca

Os registros cardiovasculares foram realizados 24 horas após a cirurgia de canulação da artéria e da veia femoral, conforme descrito previamente. O cateter posicionado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (MLT0380, ADInstruments, Bella Vista, Austrália), o qual estava acoplado a um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os sinais de pressão arterial pulsátil foram adquiridos por um sistema de aquisição (PowerLab 4/25, ML845,

ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e registrados por meio de um computador com uma frequência de aquisição de 1 kHz, utilizando um programa apropriado (Chart Pro, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os valores de pressão arterial sistólica, diastólica e média, assim como de frequência cardíaca foram derivados a partir dos sinais de pressão arterial pulsátil. As variáveis cardiovasculares foram registradas em animais não anestesiados por períodos entre 45 a 60 minutos, sendo os dados obtidos durante os últimos 30 minutos considerados para análise.

Registros da frequência respiratória, do volume corrente e da ventilação

As variáveis respiratórias foram registradas simultaneamente com a pressão arterial pulsátil. Durante todo o protocolo experimental, os animais foram mantidos dentro de uma câmara pletismográfica (6 litros) forrada com maravalha. Após um período de adaptação de aproximadamente 15-30 minutos com a câmara ainda aberta, a mesma foi fechada. As oscilações de pressão produzidas pelos ciclos respiratórios dos animais foram monitoradas usando um transdutor de pressão diferencial (ML141 Spirometer, PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, Austrália), o qual foi conectado a um sistema de aquisição (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). O volume corrente e a ventilação foram determinados de acordo com o método descrito por Drorbaugh e Fenn em 1955 (Equação 1).

Equação 1

$$VT = VK \times PT/PK \times (TC (PB - PA)) / (TC (PB - PA)) - (TA (PB - PC))$$

Na qual:

VT: volume corrente

VK: volume de ar injetado na câmara do animal para calibração;

PT: alteração de pressão associada a cada ciclo respiratório;

PK: alteração de pressão associada ao volume de ar injetado para a calibração;

TC: temperatura corporal;

TA: temperatura do ar dentro da câmara;

PB: pressão barométrica;

PC: pressão de vapor d'água à temperatura corporal;

PA: pressão de vapor d'água à temperatura da câmara.

A temperatura do interior da câmara pletismográfica e da sala de registros, foram continuamente monitoradas. A calibração do transdutor foi realizada ao final de cada registro por meio da injeção de 1 mL de ar, utilizando uma seringa graduada. Os valores de volume corrente obtidos foram corrigidos pelo peso do animal, sendo expressos em mL/kg. O produto da frequência respiratória pelo volume corrente corresponde a ventilação, a qual é expressa em $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. As variáveis respiratórias foram reportadas como a média de três medidas realizadas entre dois e três minutos no período basal, quando o animal estava imóvel. Ruídos causados por movimentação do animal dentro da câmara de registro foram excluídos das análises.

Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca

Foi utilizado um período de 10 minutos na condição basal para avaliar a variabilidade da pressão arterial sistólica, a qual foi calculada no domínio do tempo e expressa como a variância total da série temporal (σ^2). No domínio da frequência, séries batimento a batimento da pressão arterial sistólica foram convertidas em pontos a cada

100 ms, utilizando a interpolação cúbica de *spline* (10 Hz). As séries interpoladas foram divididas em sequências interpostas de 512 pontos com 50% de interposição. Os segmentos foram inspecionados visualmente e eventuais ruídos foram excluídos da análise. O espectro de todos os segmentos foi calculado por meio da Transformada Rápida de Fourier, utilizando um programa de computador gentilmente cedido pelo Dr. Daniel Penteado (CardioSeries, versão 2.4; Ribeirão Preto, Brasil). A potência obtida pelos componentes oscilatórios foi quantificada em duas bandas de frequência: baixa frequência (LF, 0,20 – 0,75 Hz) e alta frequência (HF, 0,75 – 3,0 Hz).

Análise do tônus simpático vascular

A contribuição da atividade simpática para a manutenção da pressão arterial foi avaliada por meio do bloqueio ganglionar. Depois do registro basal das variáveis cardiovasculares e respiratórias, os receptores de angiotensina do tipo 1 (AT1) foram bloqueados pelo antagonista losartan (10 mg.kg^{-1} , Galena, Campinas, Brasil), em seguida os receptores de vasopressina V1 foram bloqueados pelo antagonista AVPx ($10 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$, Sigma). Esses antagonistas foram administrados, visando eliminar possíveis mecanismos compensatórios do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do sistema vasopressinérgico frente à queda abrupta da pressão arterial em resposta ao bloqueio ganglionar simpático. A seguir, os gânglios autonômicos foram bloqueados por meio de hexametônio (25 mg.kg^{-1} , Sigma). A injeção sistêmica desse bloqueador foi realizada 5 minutos após a injeção do antagonista AVPx. A resposta cardiovascular foi avaliada por meio da diferença de pressão arterial média entre o período anterior a injeção do hexametônio e o pico da resposta hipotensora promovido pelo hexametônio.

Ativação dos reflexos

A ativação dos quimiorreceptores periféricos foi feita por meio de injeção intravenosa de KCN (40 μ g/rato; Merck, Darmstadt, Alemanha). A ativação dos barorreceptores foi avaliada por meio da resposta cronotrópica decorrente da injeção intravenosa em bolus de: 1) fenilefrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), com dose suficiente para promover aumentos acima de 30 mmHg na pressão arterial média (0,5-1 μ g, diluído em 0,5mL de salina); e 2) nitroprussiato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com dose suficiente para reduzir a pressão arterial média abaixo de 40 mmHg (3-5 μ g, diluído em 0,5mL de salina).

Análise estatística

Antes da realização de qualquer teste estatístico, todas as variáveis dependentes foram avaliadas quanto ao tipo de distribuição por meio de gráficos de histograma e *normal probability plot*. O tipo de distribuição observado entre as variáveis dependentes apresentou indícios de serem provenientes de uma população com distribuição normal. A Figura 4 mostra um exemplo representativo do padrão de distribuição da pressão arterial média de um determinado grupo. Isso indica que a transformação dos dados ou a utilização de modelos estatísticos mais avançados, como métodos bayesianos não foram necessários (Martinez and Achcar, 2014).

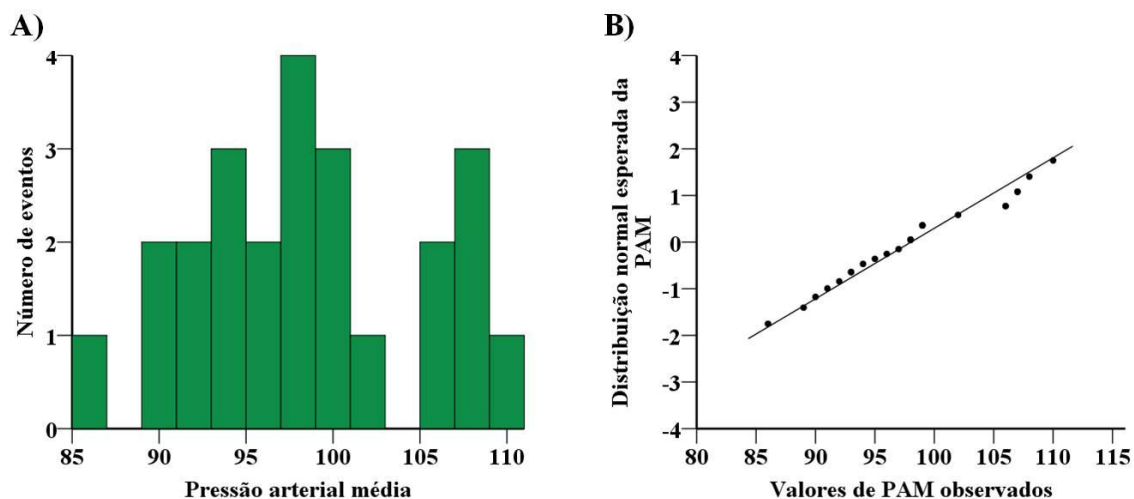


Figura 4. Painel A, Histograma de distribuição dos valores da pressão arterial média (PAM) e painel B, *normal probability plot* da PAM de um grupo controle representativo.

Portanto, a hipótese nula de que não há diferença entre os grupos para as variáveis cardiovasculares e respiratórias avaliadas foi testada por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via, ou de duas vias, no caso da resposta ventilatória ao KCN. Quando a ANOVA indicou diferença significativa total entre a média dos grupos para uma determinada variável, o *post hoc* de “*least significant difference*” (LSD) foi aplicado para investigar diferenças entre os grupos. A análise de regressão linear entre o peso corporal no dia do registro e a pressão arterial média dos animais submetidos à cirurgia para instalação do modelo 1R, 1C também foi realizada, considerando que a associação entre essas variáveis poderia interferir na interpretação dos resultados. Todos os resultados foram reportados como média \pm erro padrão da média. Os gráficos foram feitos por meio do programa GraphPad Prism (versão 4, GraphPad, La Jolla, EUA), e os procedimentos estatísticos por meio do programa SPSS (versão 17,0, Chicago, EUA). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Protocolos experimentais

Protocolo 1 – Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma segunda exposição à HCI

Para avaliar os possíveis efeitos de uma exposição prévia à HCI sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma segunda exposição à HCI, ratos Wistar recém-desmamados (P19-P21) foram divididos em 3 grupos:

1) Con – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente os animais foram mantidos em normóxia durante 10 dias; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) a seguir, eles foram mantidos em normóxia por mais 10 dias.

2) HCI – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente os animais foram mantidos em normóxia durante 10 dias; b) na etapa subsequente, eles foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) a seguir, eles foram expostos pela primeira vez ao protocolo de HCI.

3) Pré-HCI – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram submetidos ao protocolo de HCI; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de

normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) a seguir, foram novamente expostos ao protocolo de HCl (Figura 5).

Durante o protocolo os animais tiveram acesso *ad libitum* à ração e água, em ambiente com temperatura controlada (23° C) e expostos ao ciclo claro/escuro de 12/12h. Ao final do protocolo, os ratos dos 3 grupos experimentais foram anestesiados e canulados para avaliação dos parâmetros cardiovasculares e respiratórios no dia seguinte. As variáveis cardiovasculares e respiratórias registradas foram comparadas entre os grupos experimentais na condição basal e após a ativação do quimio- e do barorreflexo.

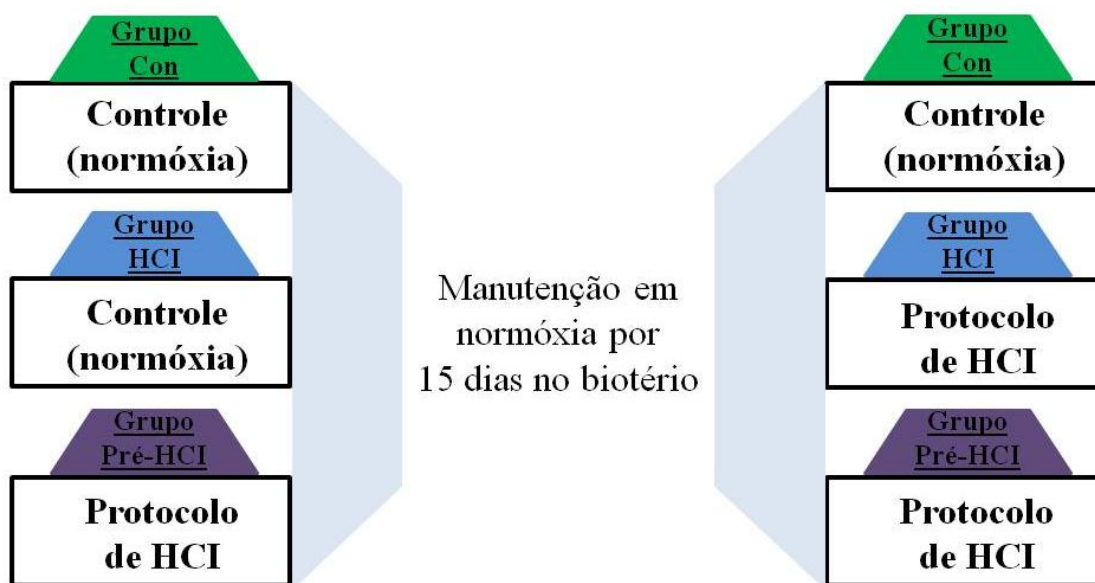


Figura 5. Protocolo experimental para avaliar os efeitos de uma exposição prévia à hipóxia crônica intermitente (HCl) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias em resposta a uma segunda exposição à HCl 15 dias depois. O esquema acima ilustra cada fase do protocolo para os grupos Con, HCl e Pré-HCl.

Protocolo 2 – Evolução temporal da elevação da pressão arterial em resposta à HCl em ratos previamente expostos à HCl

Para avaliar o efeito da pré-exposição à HCl sobre a evolução temporal do aumento da pressão arterial em resposta à exposição a um novo protocolo de HCl, ratos Wistar recém-desmamados (P19-P21) foram divididos em 2 grupos:

1) HCl 3 dias – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram mantidos em normóxia durante 10 dias; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) a seguir, eles foram expostos pela primeira vez ao protocolo de HCl com duração de 3 dias.

2) Pré-HCl/HCl 3 dias – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram submetidos ao protocolo de HCl por 10 dias; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) na sequência, eles foram novamente expostos ao protocolo de HCl, porém com duração de apenas 3 dias (Figura 6).

Durante o protocolo os animais tiveram acesso *ad libitum* à ração e água, em ambiente com temperatura controlada (23° C), e expostos ao ciclo claro/escuro de 12/12h. Ao final do protocolo os ratos dos 2 grupos experimentais foram anestesiados e canulados para registro dos parâmetros cardiovasculares e respiratórios no dia seguinte. Os níveis basais de pressão arterial e frequência cardíaca foram comparados entre os

grupos experimentais estudados. Esse protocolo foi baseado em estudos anteriores, mostrando que após 3 dias de exposição à HCI já podem ser observados aumentos da pressão arterial média (Lai *et al.*, 2006).

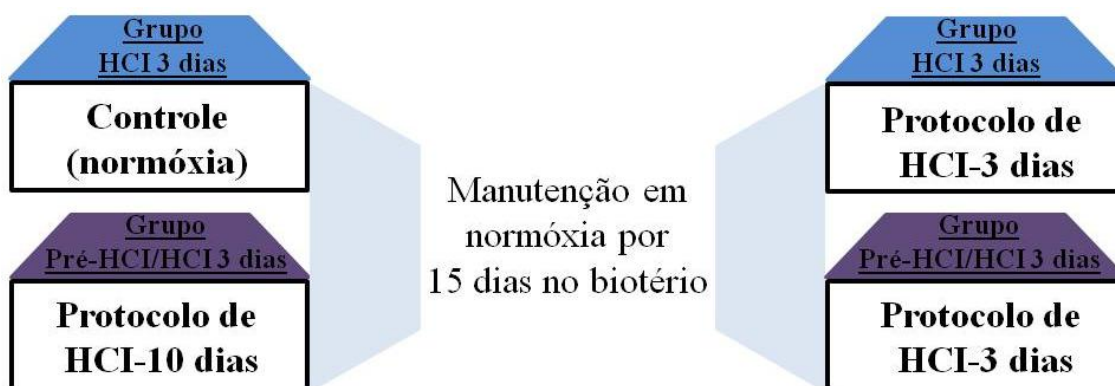


Figura 6. Protocolo experimental para o acompanhamento temporal da elevação da pressão arterial durante a hipóxia crônica intermitente (HCI). O esquema acima ilustra cada fase desenvolvida nos protocolos experimentais para os grupos HCI 3 dias e Pré-HCI/HCI 3 dias.

Protocolo 3 – Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia mantida (HM) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma nova exposição à hipóxia crônica intermitente (HCI)

Para avaliar os possíveis efeitos de uma exposição prévia à HM sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma segunda exposição à HCI, ratos Wistar (P30) foram divididos em 3 grupos:

1) Con – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram mantidos em normóxia durante 24 horas; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de

normóxia (ar ambiente) por 7 dias (período de reversão); c) a seguir, eles foram mantidos em normóxia por mais 10 dias.

2) HCl – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram mantidos em normóxia durante 24 horas; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 7 dias (período de reversão); c) a seguir, eles foram expostos ao protocolo de HCl.

3) Pré-HM – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram submetidos ao protocolo de HM por 24 horas; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por mais 7 dias (período de reversão); c) então, eles foram expostos ao protocolo de HCl (Figura 7).

Durante o protocolo os animais tiveram acesso *ad libitum* à ração e água, em ambiente com temperatura controlada (23° C) e expostos ao ciclo claro/escuro de 12/12h. Ao final do protocolo os ratos dos 3 grupos experimentais foram anestesiados e canulados para registro dos parâmetros cardiovasculares no dia seguinte. Os parâmetros cardiovasculares e respiratórios foram comparados entre os grupos experimentais na condição basal e após a ativação do quimio- e do barorreflexo.

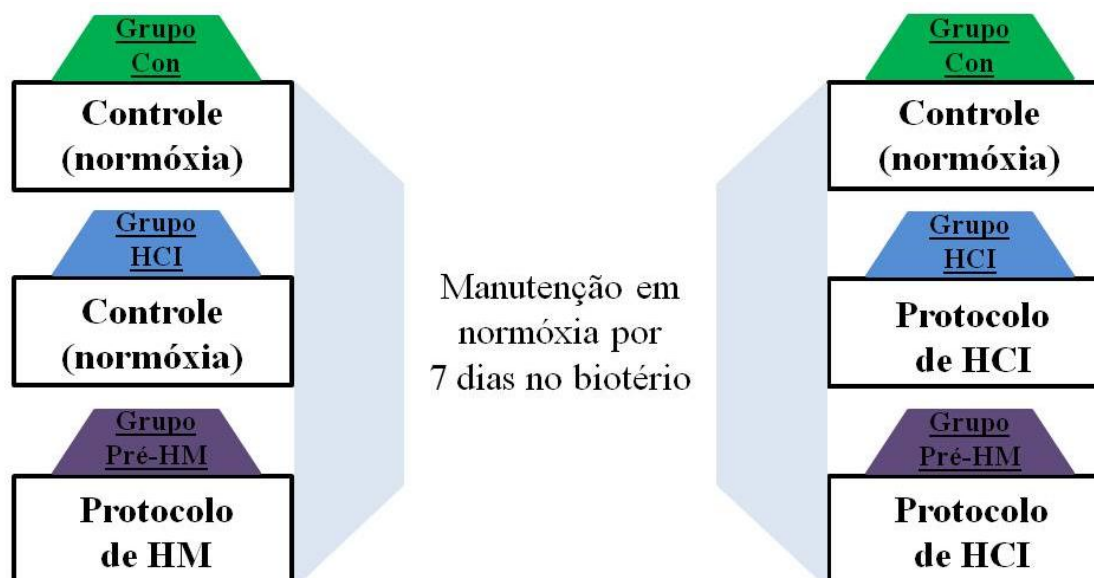


Figura 7. Protocolo experimental para avaliar os efeitos de uma exposição prévia à hipóxia mantida (HM) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias em resposta a uma segunda exposição à hipóxia crônica intermitente (HCI). O esquema acima ilustra cada fase desenvolvida nos protocolos experimentais para os grupos Con, HCI e Pré-HM.

Protocolo 4 – Influência do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)

Para testar a hipótese de que a exposição prévia à HCI poderia influenciar o desenvolvimento da hipertensão renal 1R, 1C, ratos Wistar recém-desmamados (P19-P21) foram divididos em 4 grupos:

1) Con-Sham – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram mantidos em normóxia durante 10 dias; b) em seguida os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) na sequência, eles foram submetidos a uma cirurgia Sham para controle da hipertensão renal 1R, 1C.

2) Con-1R, 1C – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram mantidos em normóxia durante 10 dias; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) a seguir, eles foram submetidos à cirurgia para instalação da hipertensão renal 1R, 1C.

3) HCI-Sham – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram submetidos ao protocolo de HCI; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) a seguir, eles foram submetidos a uma cirurgia Sham para controle da hipertensão renal 1R, 1C.

4) HCI-1R, 1C – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram submetidos ao protocolo de HCI; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) na sequência, eles foram submetidos à cirurgia para instalação da hipertensão renal 1R, 1C (Figura 8).

Após 8 dias da cirurgia para instalação da hipertensão renal 1R, 1C ou da cirurgia Sham os ratos dos 4 grupos experimentais foram anestesiados e canulados para avaliação dos parâmetros cardiovasculares no dia seguinte. Os parâmetros cardiovasculares e respiratórios foram comparados entre os grupos experimentais na condição basal e o nível de atividade simpática foi avaliado por meio do bloqueio ganglionar em um subgrupo de animais.

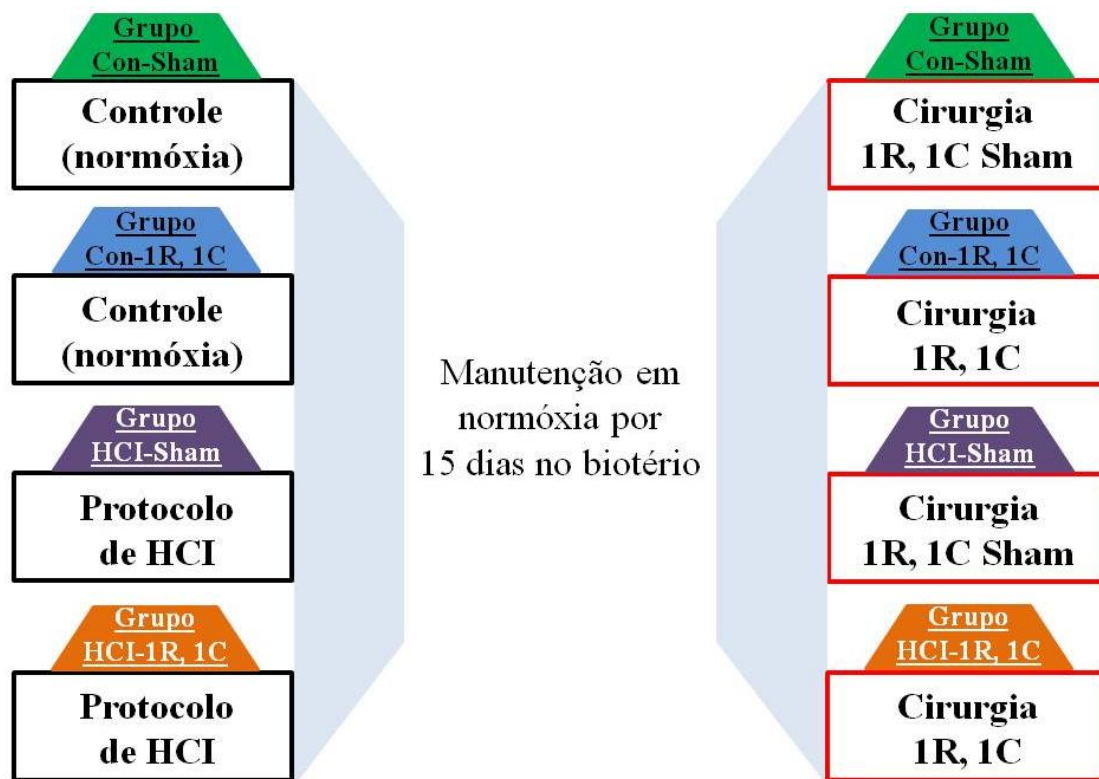


Figura 8. Protocolo experimental para avaliar os efeitos de uma exposição prévia à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas pelo modelo de hipertensão renovascular 1 rim, 1 clipe (1R-1C). O esquema acima ilustra cada fase do protocolo para os grupos Con-Sham, Con-1R, 1C, HCI-Sham e HCI-1R, 1C.

Protocolo 5 – Participação da inervação renal no pré-condicionamento promovido pela hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)

Visando avaliar se o pré-condicionamento promovido pela HCI sobre o desenvolvimento da hipertensão renal é dependente da integridade da inervação renal, ratos Wistar recém-desmamados (P19-P21) foram divididos em 4 grupos:

1) Con-1R, 1C/DR Sham – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram mantidos em normóxia durante 10 dias; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) na sequência, os animais foram submetidos à cirurgia para instalação da hipertensão renal 1R, 1C. Na mesma cirurgia, também foi realizado o procedimento Sham para controle da desnervação renal.

2) Con-1R, 1C/DR – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram mantidos em normóxia durante 10 dias; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) na sequência, os animais foram submetidos à cirurgia para instalação da hipertensão renal 1R, 1C. Na mesma cirurgia, também foi realizado o procedimento para desnervação renal.

3) HCI-1R, 1C/DR Sham – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram submetidos ao protocolo de HCI; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) na etapa seguinte, os animais foram submetidos à cirurgia para instalação da hipertensão renal 1R, 1C. Na mesma cirurgia, também foi realizado o procedimento Sham para controle da desnervação renal.

4) HCI-1R, 1C/DR – nesse grupo o protocolo foi composto de 3 fases: a) inicialmente, os animais foram submetidos ao protocolo de HCI; b) a seguir, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); c) a seguir, os animais foram submetidos à cirurgia para instalação da hipertensão renal 1R, 1C. Na mesma cirurgia, também foi realizado o procedimento para desnervação renal (Figura 9).

Após 8 dias da cirurgia os ratos dos 4 grupos experimentais foram anestesiados e canulados para avaliação dos parâmetros cardiovasculares no dia seguinte. Os parâmetros cardiovasculares foram comparados entre os grupos experimentais na condição basal.

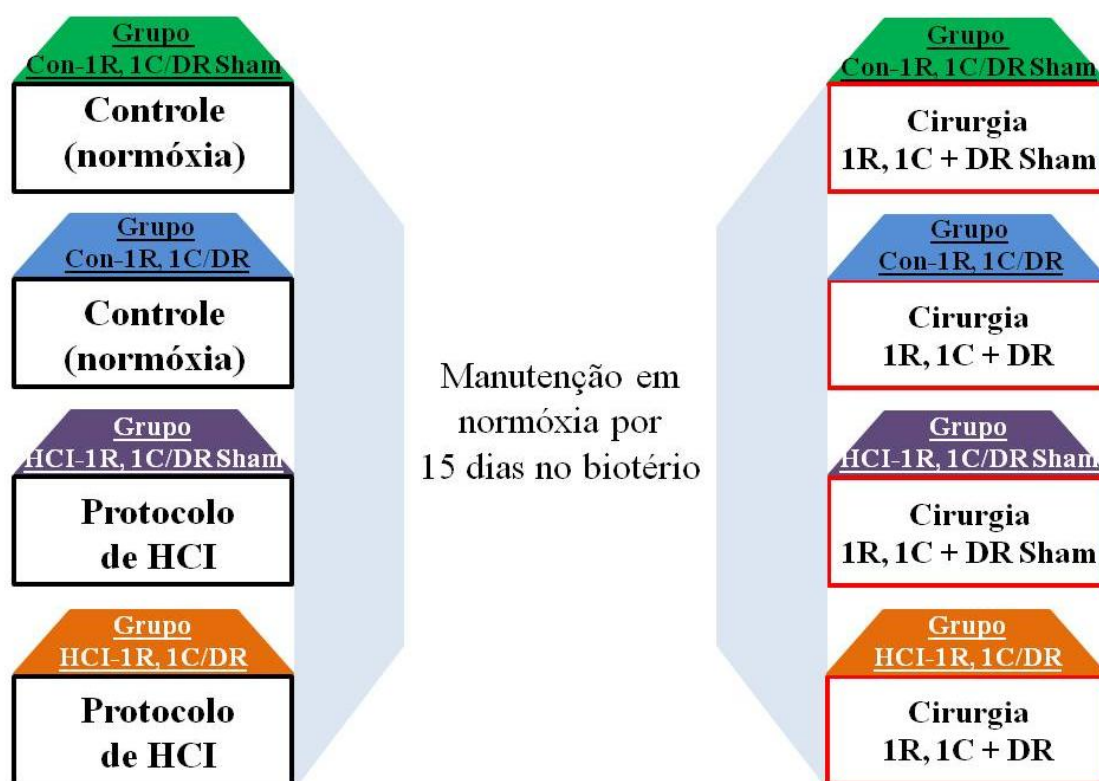


Figura 9. Protocolo experimental para avaliar os efeitos de uma exposição prévia à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares promovidas pelo modelo da hipertensão renal 1

rim, 1 clipe (1R-1C) com desnervação renal (DR). O esquema acima ilustra cada fase dos protocolos experimentais para os grupos Con-1R, 1C/DR Sham, Con-1R, 1C/DR, HCI-1R, 1C/DR Sham e HCI-1R, 1C/DR.

Protocolo 6 – Participação dos quimiorreceptores periféricos no pré-condicionamento promovido pela hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)

Para avaliar se o pré-condicionamento promovido pela HCI depende da integridade dos quimiorreceptores periféricos ou se esse é um efeito direto da HCI em núcleos do sistema nervoso central, ratos Wistar recém-desmamados (P19-P21) foram divididos em 3 grupos:

1) Sham-Con – nesse grupo o protocolo foi composto de 4 fases: a) inicialmente, os animais foram submetidos a uma cirurgia Sham para controle da cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo; b) após 3 dias de recuperação pós-cirúrgica, os animais foram mantidos em normóxia durante 10 dias; c) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); d) a seguir, eles foram submetidos a uma cirurgia Sham para controle do modelo 1R, 1C.

2) RCC/Con-1R, 1C – nesse grupo o protocolo foi composto de 4 fases: a) inicialmente, os animais foram submetidos a uma cirurgia para remoção do corpúsculo carotídeo; b) após 3 dias de recuperação pós cirúrgica, os animais foram mantidos em normóxia durante 10 dias; c) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias

(período de reversão); d) a seguir, eles foram submetidos à cirurgia para instalação do modelo 1R, 1C.

3) RCC/HCI-1R, 1C – nesse grupo o protocolo foi composto de 4 fases: a) inicialmente, os animais foram submetidos a uma cirurgia para remoção do corpúsculo carotídeo; b) após 3 dias de recuperação pós-cirúrgica, os animais foram submetidos ao protocolo de HCI; c) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão); d) na sequência, eles foram submetidos à cirurgia para instalação do modelo 1R, 1C (Figura 10).

Após 8 dias da cirurgia os ratos dos 3 grupos experimentais foram anestesiados e canulados para avaliação dos parâmetros cardiovasculares no dia seguinte. Os parâmetros cardiovasculares foram comparados entre os grupos experimentais na condição basal e o nível de atividade simpática foi avaliado por meio do bloqueio ganglionar.



Figura 10. Protocolo experimental para avaliar os efeitos de uma exposição prévia à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares promovidas pelo modelo de hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R-1C) em animais previamente submetidos a cirurgia para remoção do corpúsculo carotídeo (RCC). O esquema acima ilustra cada fase do protocolo para os grupos Sham-Con, RCC/Con-1R, 1C e RCC/HCI-1R, 1C.

Protocolo 7 – Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

Com o objetivo de avaliar o efeito do pré-condicionamento à HCI sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos SHR, ratos SHR ou WKY recém-desmamados (P19-P21) foram divididos em 4 grupos:

1) WKY-Con – nesse grupo o protocolo foi composto de 2 fases: a) inicialmente, ratos WKY foram mantidos em normóxia durante 10 dias; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão).

2) SHR-Con – nesse grupo o protocolo foi composto de 2 fases: a) inicialmente, ratos SHR foram mantidos em normóxia durante 10 dias; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão).

3) WKY-HCI – nesse grupo o protocolo foi composto de 2 fases: a) inicialmente, ratos WKY foram submetidos ao protocolo de HCI; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão).

4) SHR-HCI – nesse grupo o protocolo foi composto de 2 fases: a) inicialmente, ratos SHR foram submetidos ao protocolo de HCI; b) em seguida, os animais foram transferidos para o Biotério de Manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde permaneceram em condições de normóxia (ar ambiente) por 15 dias (período de reversão, Figura 11).

No último dia do protocolo, os ratos dos 4 grupos experimentais foram anestesiados e canulados para registro dos parâmetros cardiovasculares no dia seguinte. Os parâmetros cardiovasculares e respiratórios foram comparados entre os grupos experimentais na condição basal e o nível de atividade simpática foi avaliado por meio do bloqueio ganglionar. Nesse protocolo, o período de recuperação em normóxia foi maior do que o adotado nos outros protocolos de pré-condicionamento com o objetivo de que, no dia do registro dos parâmetros cardiovasculares e respiratórios, todos os animais apresentassem aproximadamente a mesma idade.

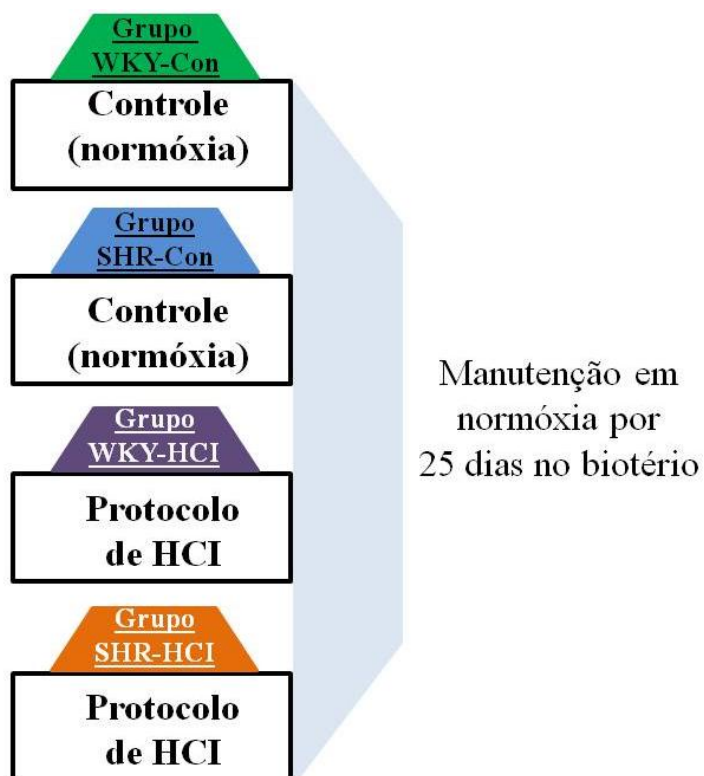


Figura 11. Protocolos experimentais para avaliar os efeitos uma exposição prévia à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). O esquema acima ilustra cada fase dos protocolos experimentais para os grupos WKY-Con, SHR-Con, WKY-HCI e SHR-HCI.

4. RESULTADOS

Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma segunda exposição à HCI

Variáveis cardiovasculares basais

Na Figura 12 podemos observar os valores médios da pressão arterial média, da pressão arterial sistólica, da pressão arterial diastólica e da frequência cardíaca nos 3 grupos estudados. Os dois grupos de animais submetidos à HCI apresentaram valores de pressão arterial média aumentados (HCI, 108 ± 2 mmHg e Pré-HCI, 107 ± 2 mmHg) em relação ao grupo Con (98 ± 1 mmHg) ao final do protocolo ($p < 0,05$; painel A). No entanto, a elevação da pressão arterial média foi similar entre os grupos HCI e Pré-HCI ($p > 0,05$).

Os valores de pressão arterial sistólica foram superiores nos grupos HCI e Pré-HCI quando comparados ao grupo Con ($p < 0,05$; painel B). No entanto, não observamos diferença significativa entre os grupos HCI e Pré-HCI. Os valores de pressão arterial diastólica foram superiores nos grupos HCI e Pré-HCI comparado ao grupo Con ($p < 0,05$; painel C). Não observamos diferença significativa entre os grupos HCI e Pré-HCI. A exposição à HCI promoveu elevação significativa da frequência cardíaca basal nos grupos HCI (433 ± 8 bpm) e Pré-HCI (442 ± 9 bpm) em relação ao grupo Con (389 ± 6 bpm) ao final do protocolo ($p < 0,05$; painel D). No entanto, o aumento na frequência cardíaca basal foi semelhante entre os grupos HCI e Pré-HCI ($p > 0,05$).

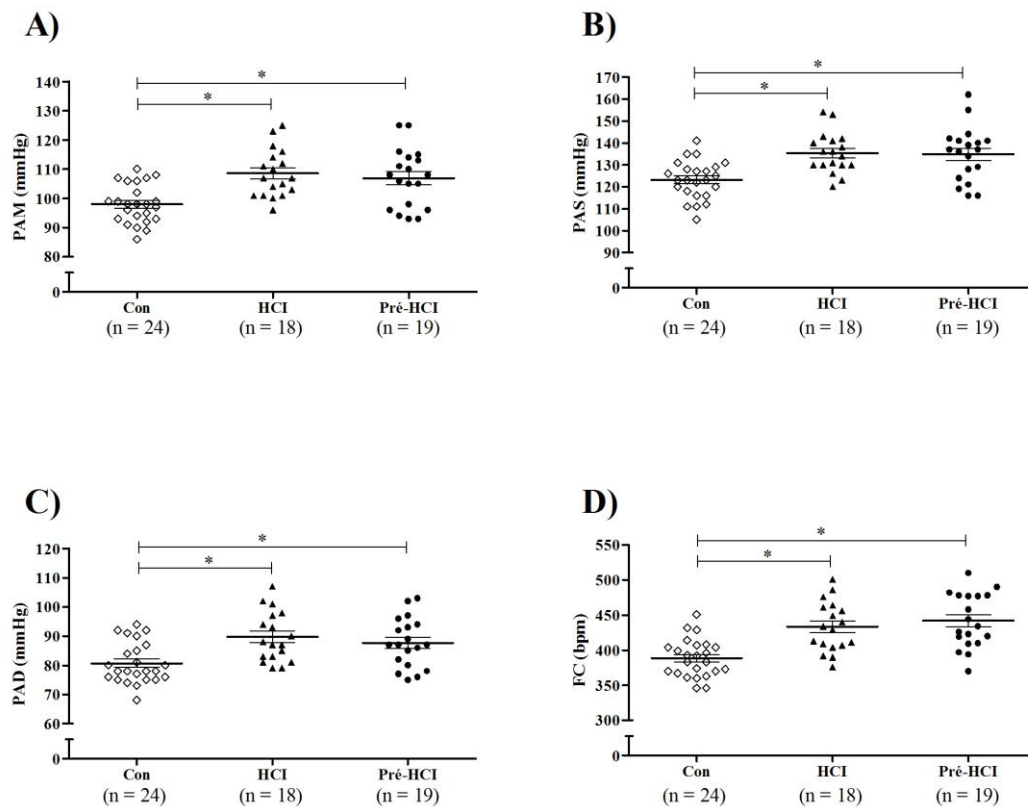


Figura 12. Paineis A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCl) e previamente submetidos à HCl (Pré-HCl). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Análise espectral

As análises no domínio do tempo mostraram que os grupos expostos à HCl apresentaram maior variabilidade da pressão arterial sistólica (HCl, $26 \pm 3 \text{ mmHg}^2$ e Pré-HCl, $24 \pm 3 \text{ mmHg}^2$) em relação ao grupo Con ($14 \pm 1 \text{ mmHg}^2$; $p < 0,05$; Figura 13). No entanto, não houve diferença entre os grupos HCl e Pré-HCl ($p > 0,05$).

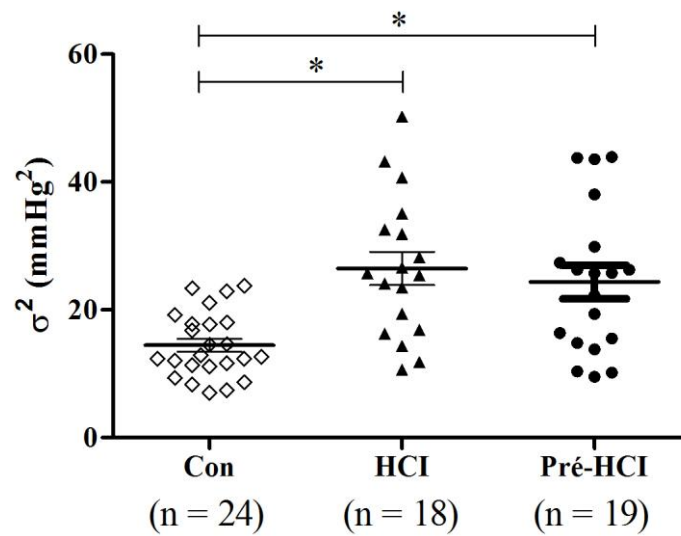


Figura 13. Variância total da pressão arterial sistólica avaliada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCl) e previamente submetidos à HCl (Pré-HCl). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

No domínio da frequência, a potência da banda de LF no espectro da pressão arterial sistólica foi igualmente aumentada nos dois grupos submetidos à HCl (HCl, 5.96 ± 0.9 ; Pré-HCl, 5.51 ± 0.8 mmHg²), quando comparado com o grupo Con (3.09 ± 0.3 ; $p < 0,05$; painel A, Figura 14). A potência da banda de HF foi significativamente maior apenas no grupo Pré-HCl (4.46 ± 1.3 mmHg²), quando comparada ao grupo Con (1.59 ± 0.3 mmHg²), mas não quando comparada ao grupo HCl (3.52 ± 0.8 mmHg²; $p > 0,05$; painel B, Figura 14).

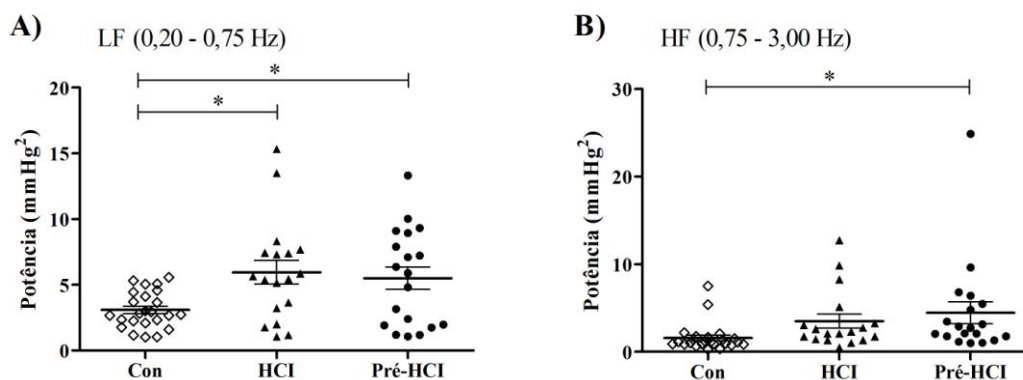


Figura 14. Potência das bandas LF (Painel A) e HF (Painel B) no espectro da pressão arterial sistólica avaliada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCl) e previamente submetidos à HCl (Pré-HCl). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Variáveis respiratórias basais

Na Figura 15 são apresentados os valores médios da frequência respiratória, do volume corrente, e da ventilação nos 3 grupos estudados. A frequência respiratória basal não diferiu significativamente entre os grupos analisados. Os valores médios de frequência respiratória foram: Con, 121 ± 4 ; HCl, 117 ± 5 ; Pré-HCl, 112 ± 3 ciclos por minuto (painel A).

O volume corrente foi similar entre os grupos ($p > 0,05$; painel B). Os valores médios do volume corrente foram: Con, $7,9 \pm 0,6$; HCl, $9,7 \pm 0,8$; Pré-HCl, $7,8 \pm 0,4$ mL/kg. A ventilação também não foi diferente entre os grupos estudados ($p > 0,05$). Os valores médios da ventilação foram: Con, $931,7 \pm 67,1$; HCl, $1106,6 \pm 88,6$; Pré-HCl, $879,3 \pm 48,7$ mL.kg⁻¹.min⁻¹ (painel C).

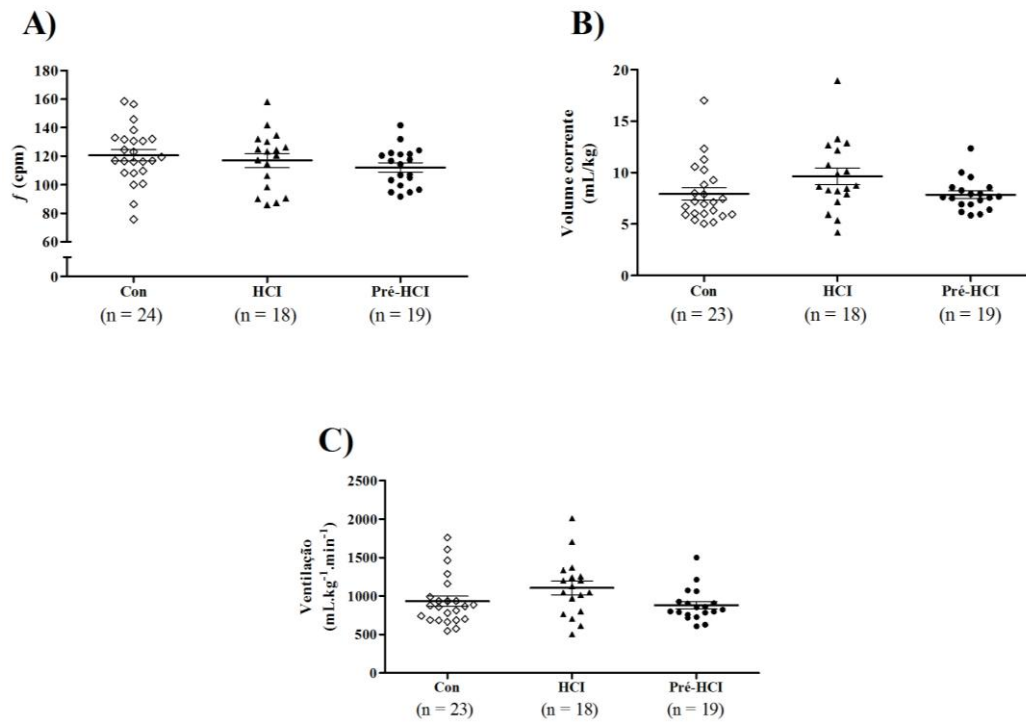


Figura 15. Paineis A, frequência respiratória (f); painel B, volume corrente; painel C, ventilação basal, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCl) e previamente submetidos à HCl (Pré-HCl). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

Duração das diferentes fases do ciclo respiratório

Os valores médios da duração do ciclo respiratório, da inspiração e da expiração são apresentados na Tabela 1. Nenhuma dessas variáveis foi alterada pela pré-exposição à HCl ($p > 0,05$).

Tabela 1. Valores basais da duração do ciclo respiratório, da inspiração e da expiração, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HCI (Pré-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

	<u>Con</u>	<u>HCI</u>	<u>Pré-HCI</u>
Duração do ciclo (ms)	540 \pm 23	560 \pm 30	570 \pm 16
Duração da inspiração (ms)	220 \pm 6	230 \pm 13	240 \pm 9
Duração da expiração (ms)	320 \pm 22	340 \pm 26	320 \pm 12

Respostas cardiovasculares e respiratórias à ativação do quimiorreflexo

A Figura 16 mostra as respostas pressora e bradicárdica à ativação do quimiorreflexo por meio da injeção intravenosa de KCN. Podemos observar que o pico da resposta bradicárdica (Con, -311 \pm 9; HCI, -332 \pm 9; Pré-HCI, -352 \pm 13 bpm; painel A) e da resposta hipertensora (Con, 57 \pm 2; HCI, 60 \pm 4; Pré-HCI, 59 \pm 4 mmHg; painel B) não foram diferentes entre os grupos ($p > 0,05$).

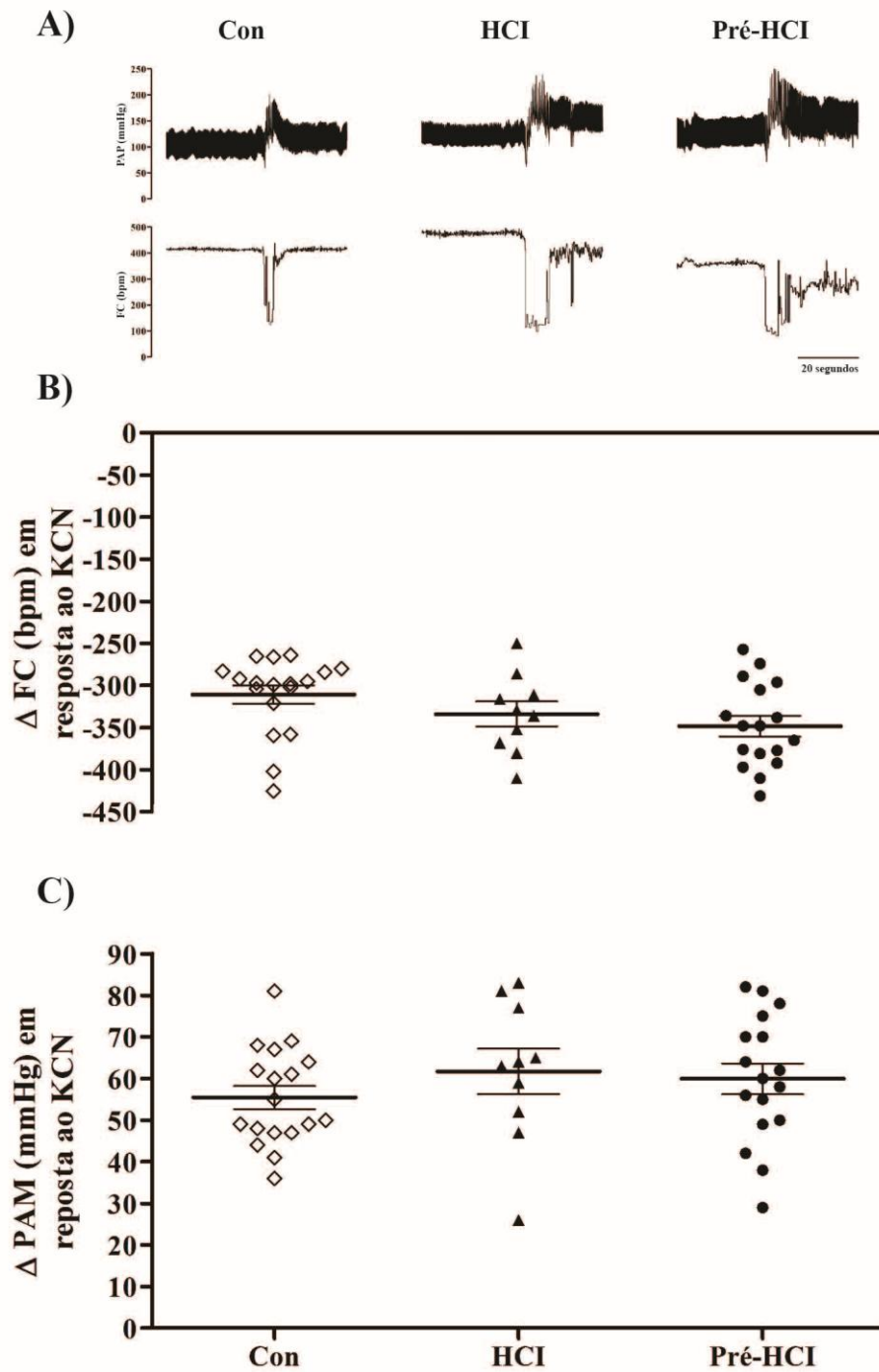


Figura 16. Painel A, traçados de um rato representativo dos grupos controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCl) e previamente submetidos à HCl (Pré-HCl). O painel B mostra os valores e a média da resposta da frequência cardíaca (FC) e o painel C mostra os valores e a média da resposta da pressão arterial média (PAM) em resposta à ativação do quimiorreflexo com cianeto de potássio (KCN), avaliada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos Con, HCl e Pré-HCl. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

A elevação máxima da frequência respiratória em resposta a ativação do quimiorreflexo ocorreu dentro de 2 segundos após a injeção de KCN (Con, 343 ± 15 ; HCI, 363 ± 24 e Pré-HCI, 327 ± 17 ciclos por minuto). No entanto, o delta entre frequência respiratória máxima e a frequência respiratória basal não diferiu entre os grupos Con (216 ± 14 ciclos por minuto), HCI (241 ± 23 ciclos por minuto) e Pré-HCI (211 ± 14 ciclos por minuto). Além disso, o comportamento da resposta respiratória avaliado a cada 2 segundos foi similar entre os grupos até 20 segundos após a injeção de KCN (Figura 17).

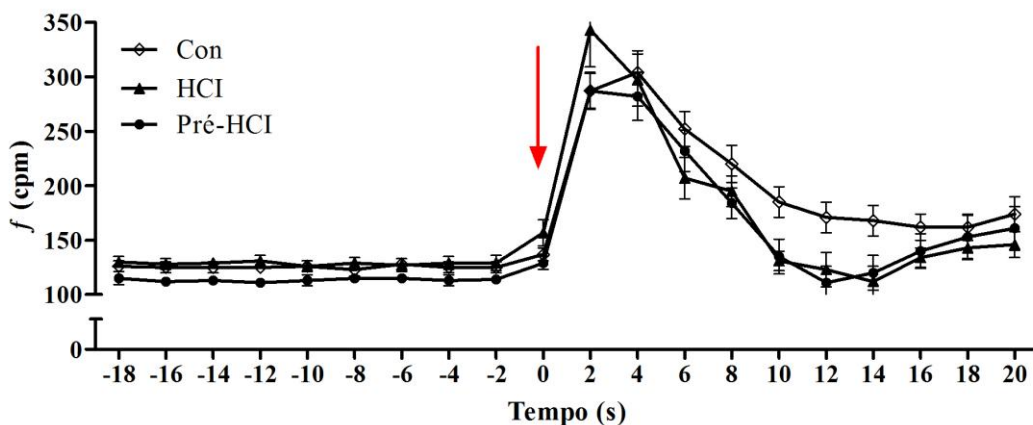


Figura 17. Média da frequência respiratória (f) avaliada a cada 2 segundos, durante 20 segundos antes e 20 segundos após a ativação do quimiorreflexo com cianeto de potássio (KCN; indicado pela seta vermelha), realizada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HCI (Pré-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

Respostas cardiovasculares em resposta à ativação do barorreflexo

A injeção de fenilefrina, um agonista seletivo para receptores adrenérgicos do tipo α_1 , promoveu aumento similar da pressão arterial média entre os grupos Con (40 ± 1 mmHg), HCI (38 ± 1 mmHg) e Pré-HCI (41 ± 2 mmHg; $p > 0,05$; painel B, Figura 18). A resposta bradicárdica reflexa em resposta ao aumento da atividade dos barorreceptores arteriais devido à elevação da pressão arterial promovida pela fenilefrina não foi significativamente alterada pela exposição à HCI entre os grupos estudados (Con, -55 ± 6 ; HCI, -62 ± 7 ; Pré-HCI, -56 ± 4 bpm; painel A, Figura 18).

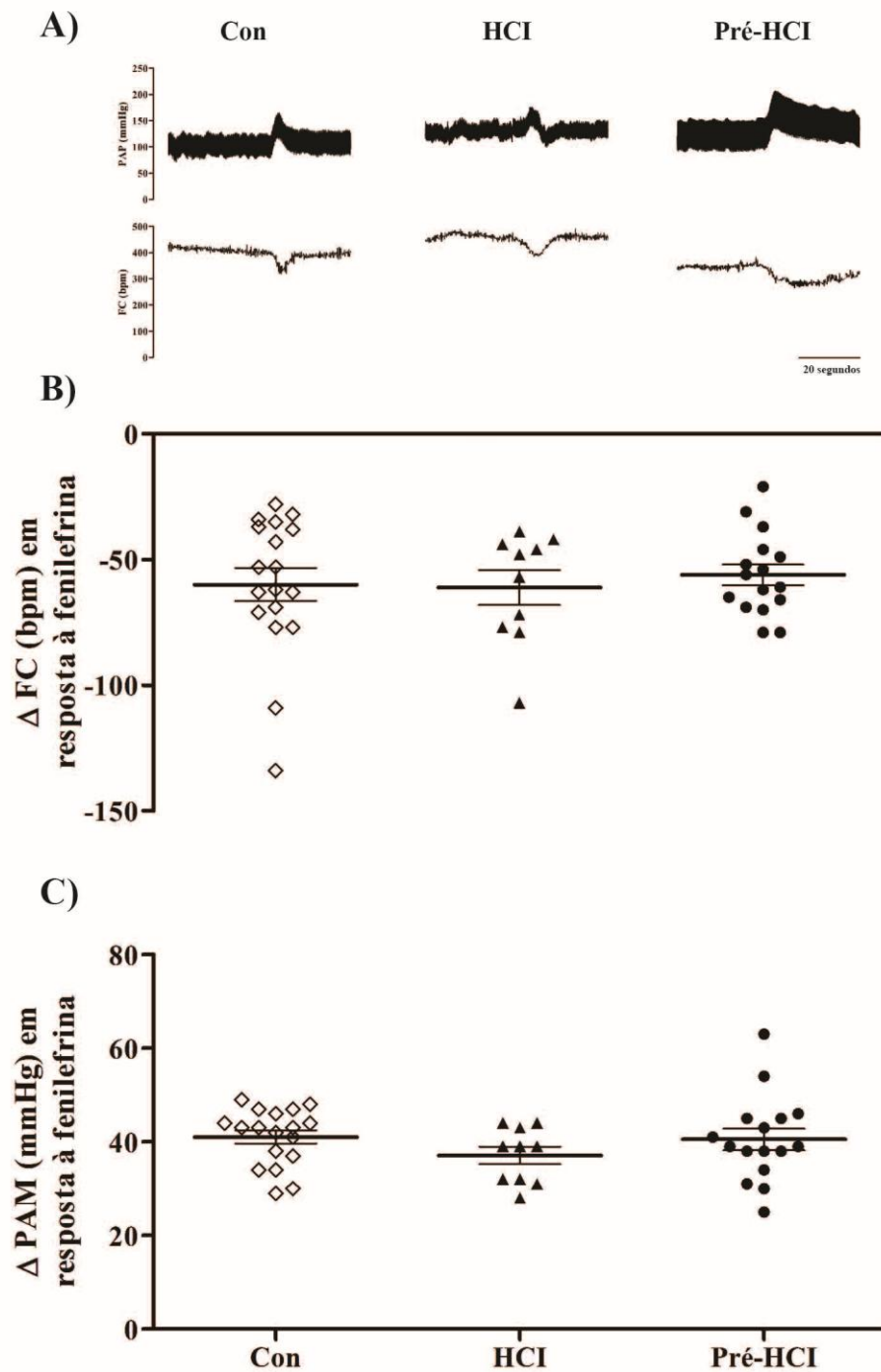


Figura 18. Painel A, traçados de um rato representativo dos grupos controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCl) e previamente submetidos à HCl (Pré-HCl). O painel B mostra os valores e a média da bradicardia reflexa (ΔFC) e o painel C mostra os valores e a média da elevação na pressão arterial média (ΔPAM) em resposta à injeção de fenilefrina 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos Con, HCl e Pré-HCl. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

A injeção de nitroprussiato de sódio, um potente vasodilatador por ser rapidamente degradado na circulação liberando óxido nítrico, promoveu queda similar da pressão arterial média entre os grupos Con (-33 ± 1 mmHg), HCl (-35 ± 2 mmHg) e Pré-HCl (-38 ± 2 mmHg; $p > 0,05$; painel B, Figura 19). A resposta taquicárdica reflexa em resposta à diminuição da atividade dos barorreceptores arteriais devido à queda da pressão arterial promovida pelo nitroprussiato também não foi significativamente alterada pela exposição à HCl entre os grupos (Con, 71 ± 6 ; HCl, 70 ± 6 ; Pré-HCl, 77 ± 7 bpm; painel A, Figura 19).

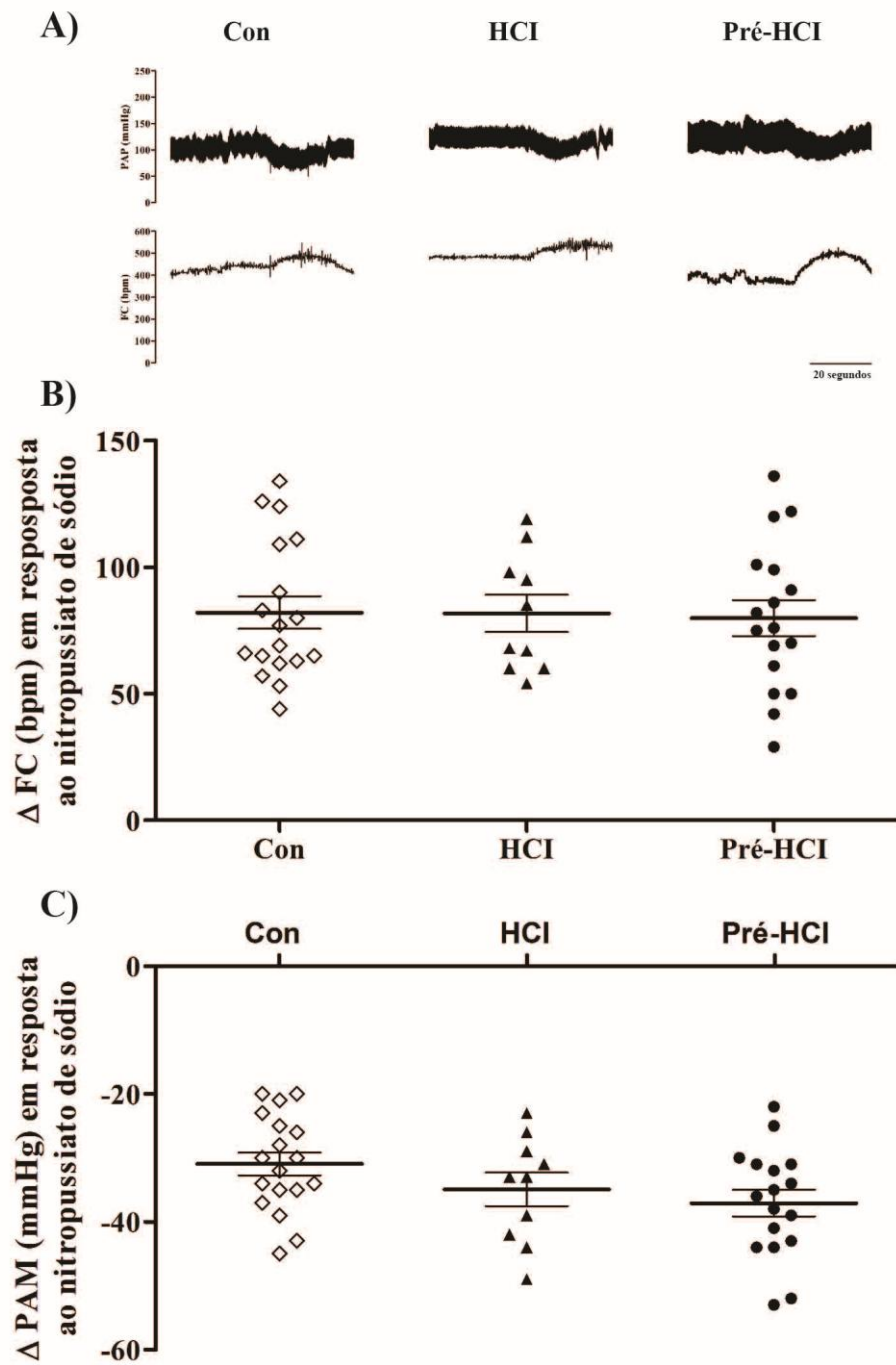


Figura 19. Painel A, traçados de um rato representativo dos grupos controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCl) e previamente submetidos à HCl (Pré-HCl). O painel B mostra os valores e a média da bradicardia reflexa (ΔFC) e o painel C mostra os valores e a média da queda da pressão arterial média (ΔPAM) em resposta à injeção de nitroprussiato de sódio 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos Con, HCl e Pré-HCl. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

Evolução temporal da elevação da pressão arterial em resposta à HCI de ratos previamente expostos à HCI

Variáveis cardiovasculares basais

A Figura 20 mostra a elevação dos valores da pressão arterial média, da pressão arterial sistólica, da pressão arterial diastólica e da frequência cardíaca 3 dias após exposição à HCI em um grupo previamente exposto à HCI e em um outro exposto à HCI pela primeira vez. Como podemos observar não houve diferença da pressão arterial média entre os grupos HCI 3 dias (98 ± 2 mmHg) e Pré-HCI/HCI 3 dias (100 ± 2 mmHg; $p > 0,05$; painel A).

A pressão arterial sistólica no grupo HCI 3 dias (126 ± 2 mmHg) foi similar àquela observada no grupo Pré-HCI/HCI 3 dias (127 ± 2 mmHg; $p > 0,05$; painel B). A pressão arterial diastólica no grupo HCI 3 dias (79 ± 2 mmHg) foi similar àquela observada no grupo Pré-HCI/HCI 3 dias (82 ± 2 mmHg; $p > 0,05$; painel C). Da mesma forma, a frequência cardíaca no grupo HCI 3 dias (407 ± 6 bpm) foi similar àquela observada no grupo Pré-HCI/HCI 3 dias (411 ± 8 bpm; $p > 0,05$; painel D). Esses dados indicam que o pré-condicionamento à HCI não altera a evolução das alterações cardiovasculares avaliadas após uma segunda exposição à HCI.

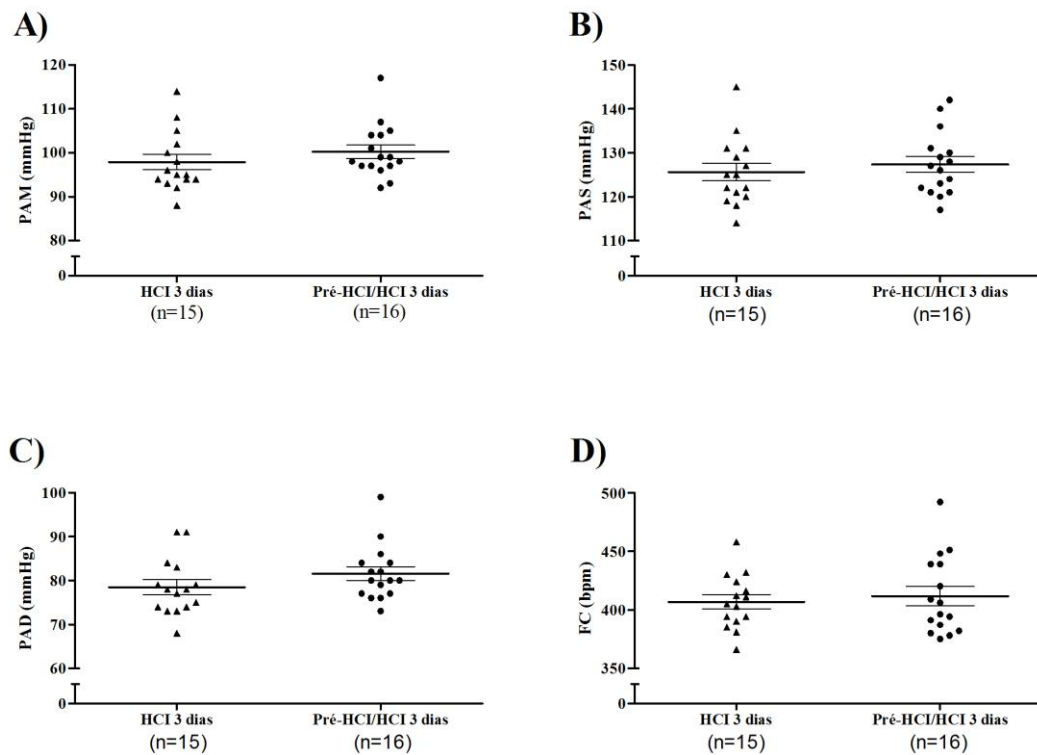


Figura 20. Paineis A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: hipóxia crônica intermitente de 3 dias (HCl 3 dias) e previamente submetidos à HCl seguida de HCl de 3 dias (Pré-HCl/HCl 3 dias). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia mantida (HM) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma nova exposição à hipóxia crônica intermitente (HCI)

Variáveis cardiovasculares basais

Na Figura 21 podemos observar os valores médios da pressão arterial média, da pressão arterial sistólica, da pressão arterial diastólica e da frequência cardíaca nos 3 grupos estudados. Ao final do protocolo os valores de pressão arterial média foram superiores em ambos os grupos submetidos à HCI (HCI, 105 ± 2 ; Pré-HM, 106 ± 2 mmHg) em relação ao grupo Con (98 ± 1 mmHg; $p < 0,05$; painel A). A exposição prévia à HM não influenciou a elevação da pressão arterial média promovida pela HCI entre os grupos (HCI e Pré-HM; $p > 0,05$).

A exposição à HCI elevou a pressão arterial sistólica dos grupos HCI (133 ± 3 mmHg) e Pré-HM (131 ± 2 mmHg) em comparação aos animais do grupo Con (123 ± 1 mmHg; $p < 0,05$; painel B). Não houve efeito adicional trazido pela pré-exposição à HM (HCI e Pré-HM; $p > 0,05$). Os níveis de pressão arterial diastólica foram superiores nos grupos HCI (86 ± 2 mmHg) e Pré-HM (88 ± 3 mmHg) em relação aos animais do grupo Con (80 ± 1 mmHg; $p < 0,05$; painel C). Efeito que foi independente da pré-exposição à HM (HCI e Pré-HM; $p > 0,05$). Os valores de frequência cardíaca basal foram superiores nos grupos HCI (427 ± 9 bpm) e Pré-HM (446 ± 9 bpm) quando comparados ao grupo Con (386 ± 5 bpm; $p < 0,05$; painel D). No entanto, não houve diferença entre os grupos HCI e Pré-HM ($p > 0,05$).

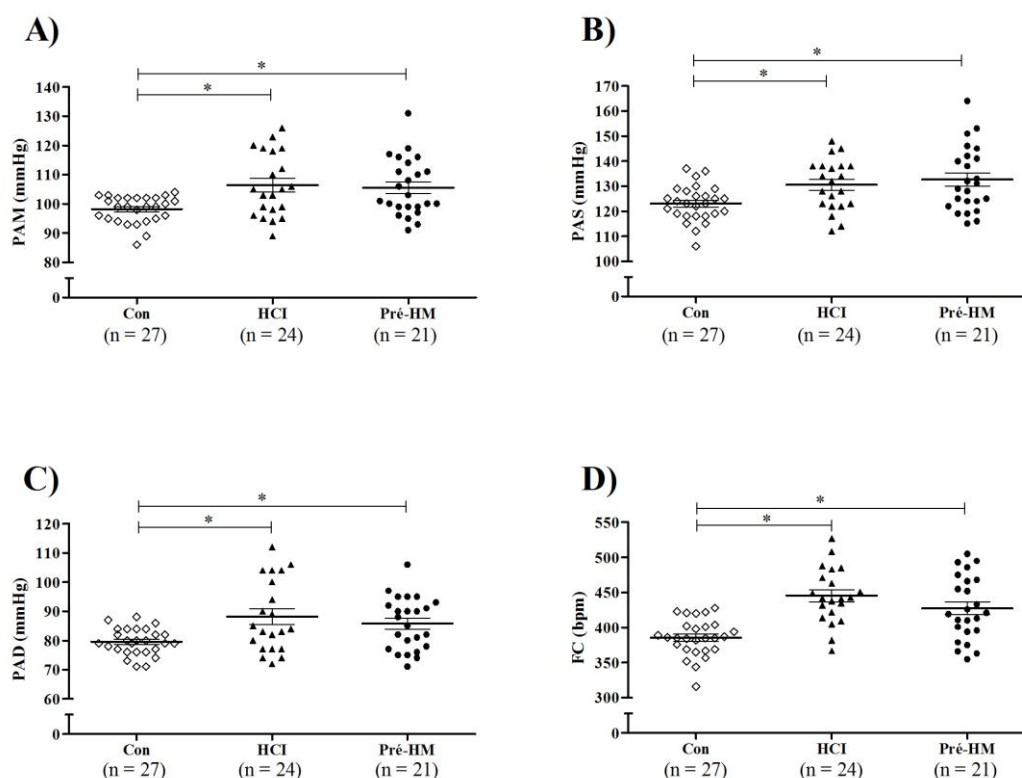


Figura 21. Paineis A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCl) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Variáveis respiratórias basais

Na Figura 22 são apresentados os valores médios da frequência respiratória, do volume corrente, e da ventilação nos 3 grupos estudados. A frequência respiratória basal não foi alterada por nenhum dos protocolos de hipóxia (painel A). Os valores médios da frequência respiratória em cada grupo são: Con, 108 ± 3 ; HCl, 111 ± 5 ; Pré-HM, 120 ± 5 ciclos por minuto ($p > 0,05$).

O volume corrente foi significativamente maior no grupo HCl ($12,5 \pm 0,4$ mL/kg) em relação ao grupo Con ($10,6 \pm 0,4$ mL/kg; $p < 0,05$). No entanto, o grupo

Con e o grupo pré-HM ($12,0 \pm 0,5$ mL/kg) apresentaram valores similares de volume corrente ($p > 0,05$; painel B). A ventilação basal também foi significativamente maior no grupo HCl ($1484,3 \pm 61,5$ mL.kg⁻¹.min⁻¹), quando comparada ao grupo Con ($1141,2 \pm 44,7$ mL.kg⁻¹.min⁻¹; $p < 0,05$). Os valores de ventilação basal foram similares entre os grupos Con e pré-HM ($1318,1 \pm 74,7$ mL.kg⁻¹.min⁻¹; $p > 0,05$; painel C).

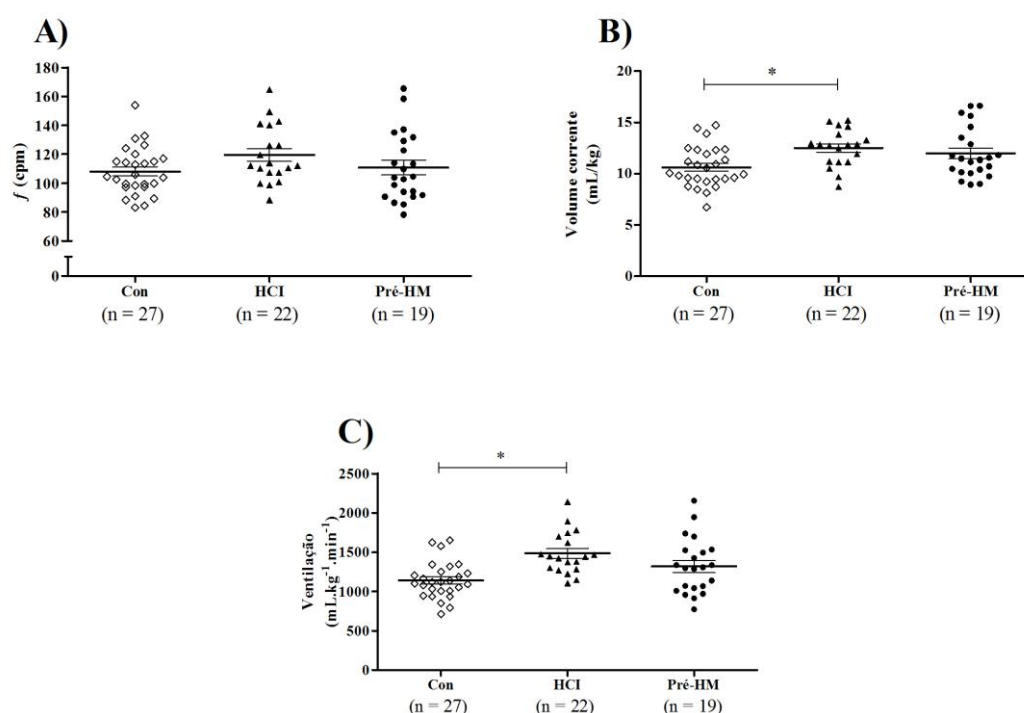


Figura 22. Painel A, frequência respiratória (f); painel B, volume corrente; painel C, ventilação basal, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCl) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

Duração das diferentes fases do ciclo respiratório

Os valores médios da duração do ciclo respiratório, da inspiração e da expiração nos grupos Con, HCl e Pré-HM são apresentados na Tabela 2. Nenhuma dessas variáveis foi alterada pela pré-exposição à HCl ($p > 0,05$).

Tabela 2. Valores basais da duração do ciclo respiratório, da inspiração e da expiração, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

	<u>Con</u>	<u>HCI</u>	<u>Pré-HM</u>
Duração do ciclo (ms)	596 \pm 19	596 \pm 26	535 \pm 19
Duração da inspiração (ms)	238 \pm 7	236 \pm 10	224 \pm 7
Duração da expiração (ms)	358 \pm 17	359 \pm 22	311 \pm 14

Respostas cardiovasculares e respiratórias à ativação do quimiorreflexo

A bradicardia máxima em resposta à ativação do quimiorreflexo foi maior nos grupos HCI (-346 \pm 9 bpm) e Pré-HM (-370 \pm 10 bpm), quando comparados ao grupo Con (-312 \pm 9 bpm; $p < 0,05$; painel A, Figura 23). Por outro lado, a magnitude da resposta pressora à ativação do quimiorreflexo não diferiu entre os grupos (Con, 64 \pm 2; HCI, 66 \pm 3; Pré-HM, 66 \pm 4 mmHg; $p > 0,05$; painel B, Figura 23).

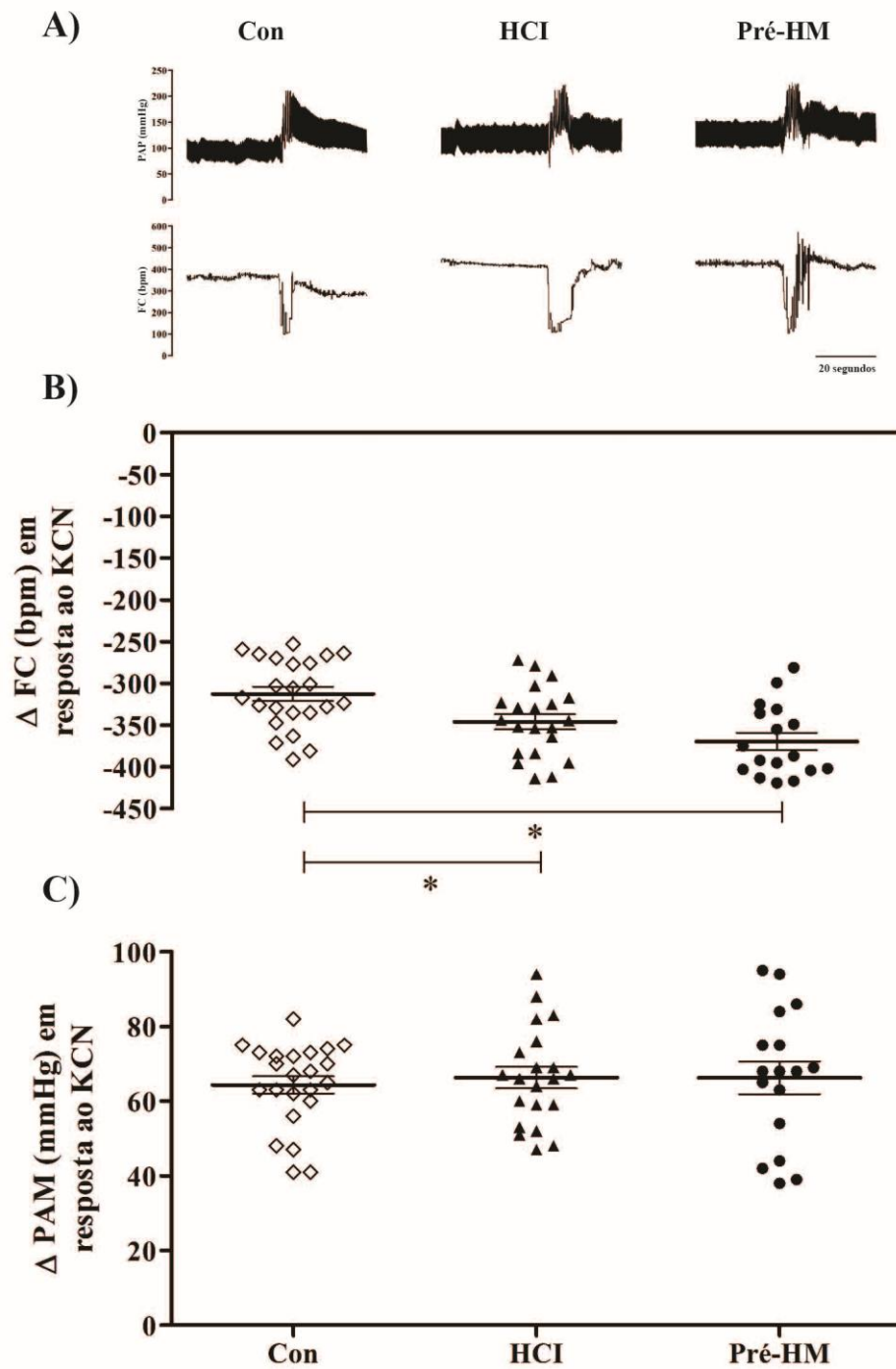


Figura 23. Painel A, traçados de um rato representativo dos grupos controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCl) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). O painel B mostra os valores e a média da resposta da frequência cardíaca (FC) e o painel C mostra os valores e a média da resposta da pressão arterial média (PAM) em resposta à ativação do quimiorreflexo com cianeto de potássio (KCN), avaliada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos Con, HCl e Pré-HM. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

A Figura 24 mostra que a magnitude da taquipneia em resposta à ativação do quimiorreflexo não foi diferente entre os grupos Con (205 ± 12 ciclos por minuto), HCl (213 ± 10 ciclos por minuto), e Pré-HM (239 ± 22 ciclos por minuto). A magnitude da resposta respiratória foi superior no grupo Pré-HM em relação ao grupo Con após a ativação do quimiorreflexo com KCN (4 seg., $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Con e HCl.

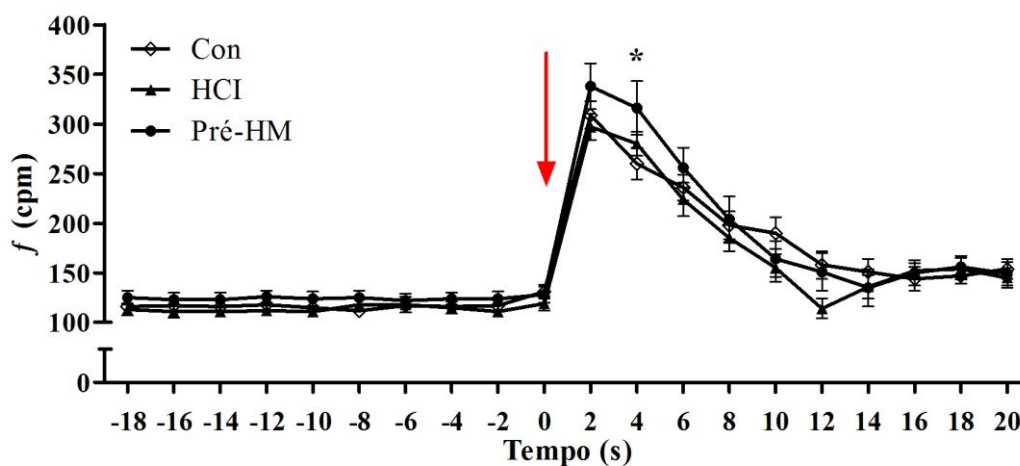


Figura 24. Média da frequência respiratória (f) avaliada a cada 2 segundos, durante 20 segundos antes e 20 segundos após a ativação do quimiorreflexo com cianeto de potássio (KCN; indicado pela seta vermelha), realizada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCl) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Respostas cardiovasculares em resposta à ativação do barorreflexo

A magnitude da resposta pressora em resposta à injeção de fenilefrina foi similar entre os grupos (Con, 42 ± 2 ; HCl, 43 ± 2 ; Pré-HM, 43 ± 2 mmHg; $p > 0,05$; painel B, Figura 25). Da mesma forma, a bradicardia reflexa em resposta a essas

elevações da pressão arterial após a administração da droga também não foram diferentes entre os grupos (Con, -63 ± 10 ; HCl, -72 ± 7 ; Pré-HM, -61 ± 7 bpm; $p > 0,05$; painel A, Figura 25).

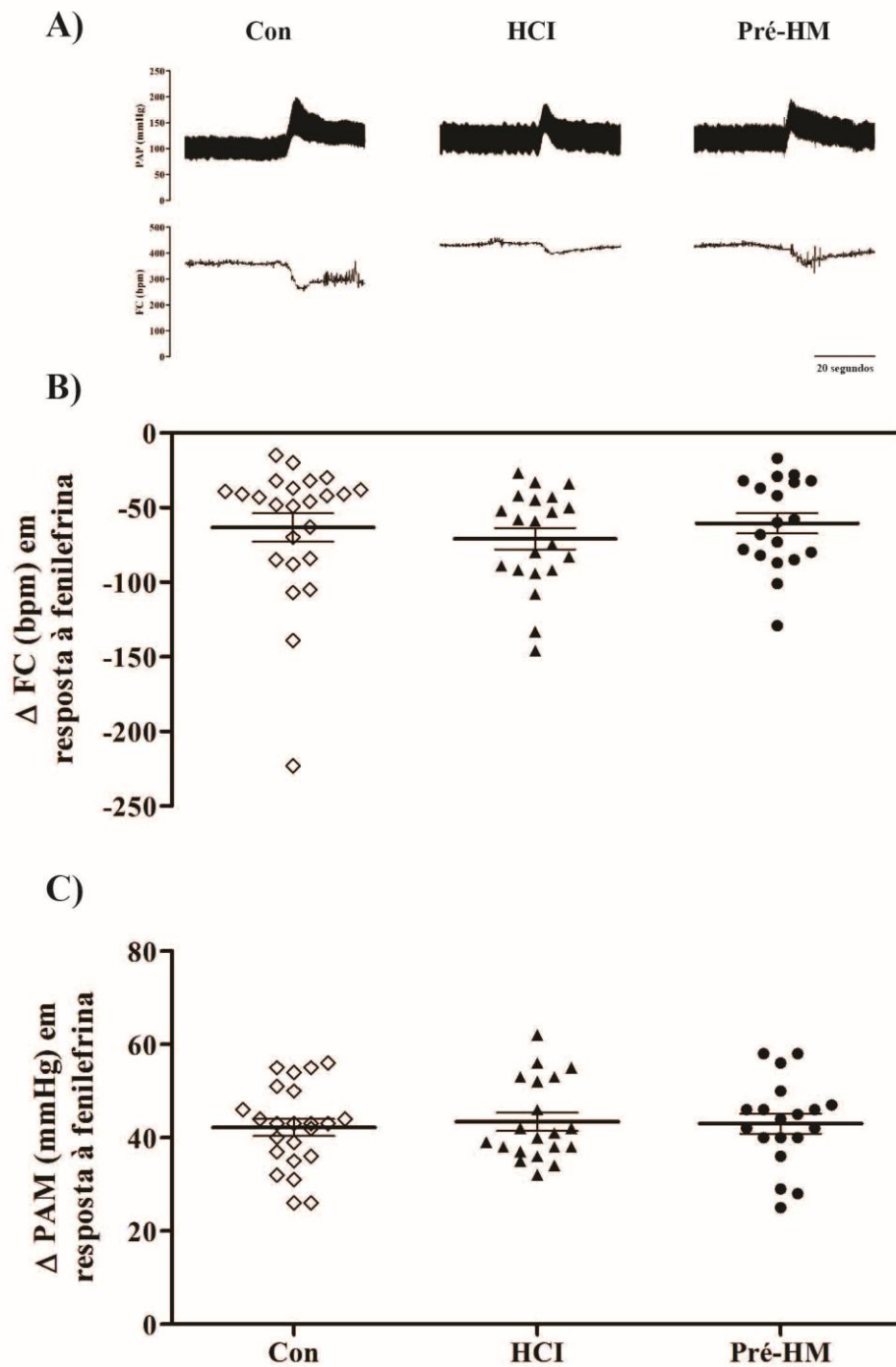


Figura 25. Painel A, traçados de um rato representativo dos grupos controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCI) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). O painel B mostra os valores e a média da bradicardia reflexa (ΔFC) e o painel C mostra os valores e a média da elevação na pressão arterial média (ΔPAM) em resposta à injeção de fenilefrina 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos Con, HCI e Pré-HM. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

A magnitude da resposta pressora (Δ PAM) em resposta à injeção de nitroprussiato de sódio foi semelhante entre os grupos (Con, -33 ± 2 ; Grupo HCl, -36 ± 2 ; Pré-HM, -40 ± 2 mmHg; painel B, Figura 26). A taquicardia reflexa em resposta à queda da pressão arterial também não foi alterada pelos protocolos de hipóxia entre os grupos (Con 76 ± 8 ; HCl, 72 ± 4 ; Pré-HM, 71 ± 8 bpm; $p > 0,05$; painel A, Figura 26).

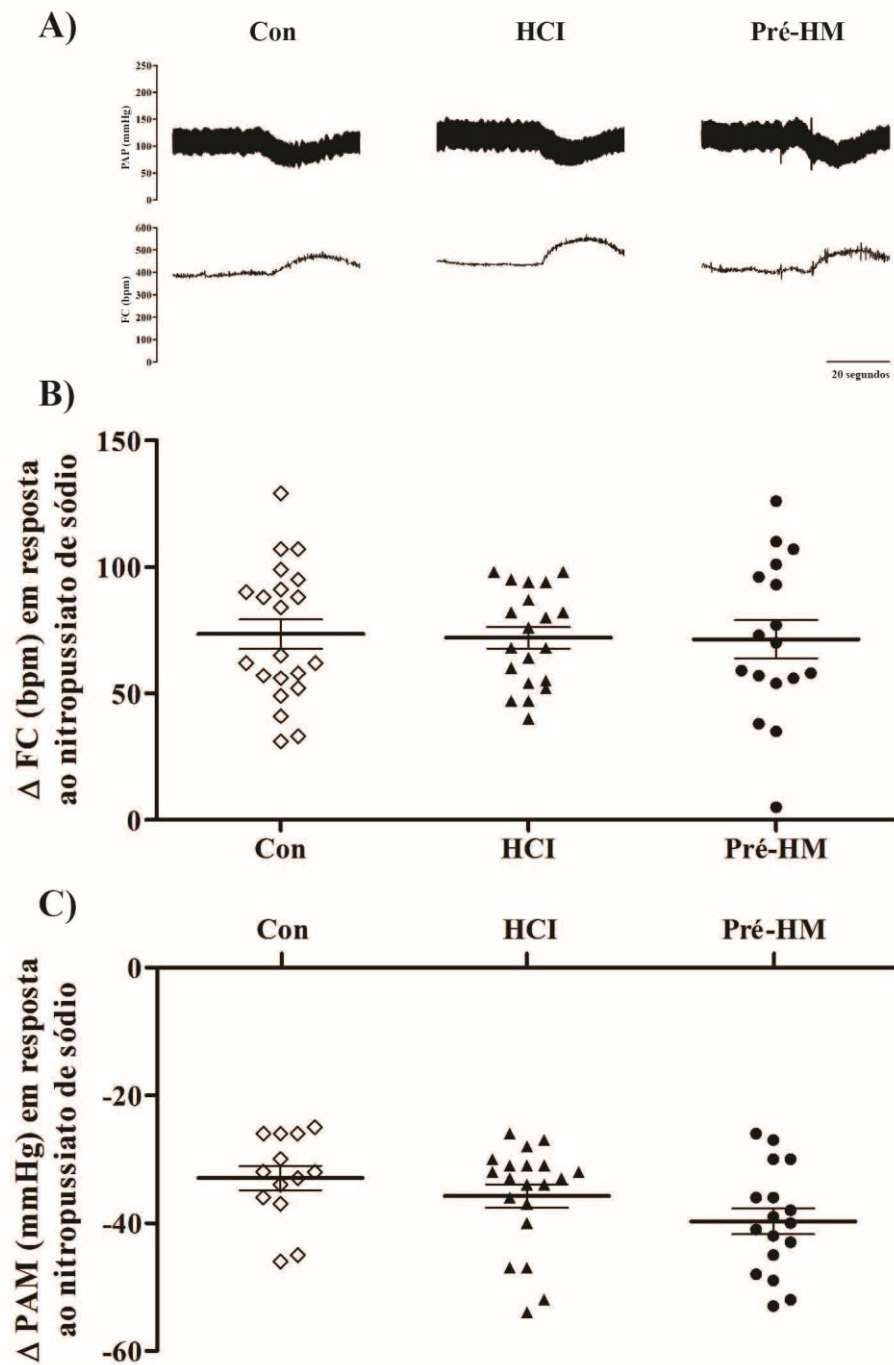


Figura 26. Paineis A, C, traçados de um rato representativo dos grupos controle (Con), hipóxia crônica intermitente (HCl) e previamente submetidos à HM (Pré-HM). O painel B mostra os valores e a média da bradicardia reflexa (ΔFC) e o painel C mostra os valores e a média da queda da pressão arterial média (ΔPAM) em resposta à injeção de nitroprussiato de sódio 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos Con, HCl e Pré-HM. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

Influência do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)

Peso corporal

O peso corporal dos animais no dia do registro das variáveis cardiorrespiratórias foi: Con-Sham, 323 ± 7 ; Con-1R, 1C, 306 ± 6 ; HCI-Sham, 286 ± 7 e HCI-1R, 1C, 311 ± 6 gramas (Figura 27). Apenas o grupo HCI-Sham apresentou menor peso corporal em relação ao grupo HCI-1R, 1C ($p < 0,05$).

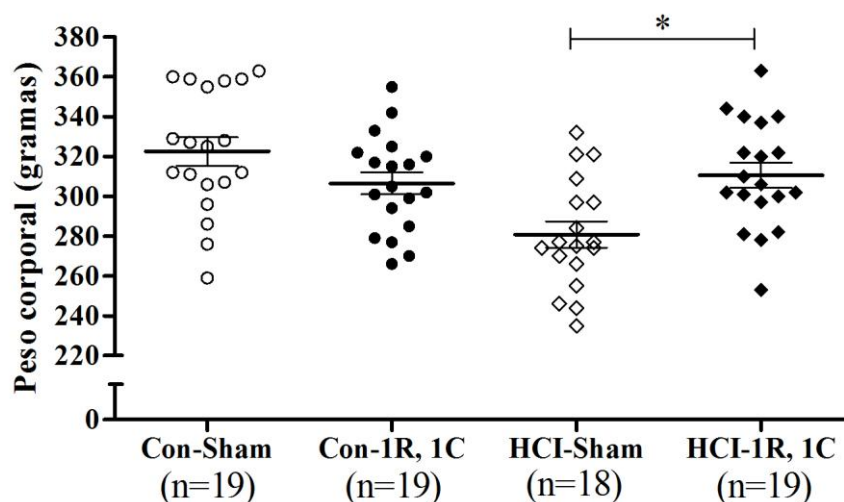


Figura 27. Peso corporal avaliado 24 horas após o encerramento do protocolo experimental. nos grupos: controle seguido de cirurgia Sham (Con-Sham); controle seguido de cirurgia 1R, 1C (Con-1R, 1C); hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia Sham (HCI-Sham) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C (HCI-1R, 1C). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Como podemos observar na Figura 28, não houve associação entre o peso corporal dos animais submetidos à cirurgia para instalação do modelo 1R, 1C e os níveis de pressão arterial média obtidos no dia do registro ($p > 0,05$). A inclinação da reta gerada pelo modelo de regressão mostra que para cada grama de peso corporal, a pressão arterial média desses animais aumenta 0,148 mmHg, o que não foi considerado significativamente diferente de zero. Adicionalmente, apenas 2% da variabilidade encontrada pode ser explicada pela associação entre o peso corporal dos animais e os valores de pressão arterial média, sendo os outros 98% atribuídos a outros fatores.

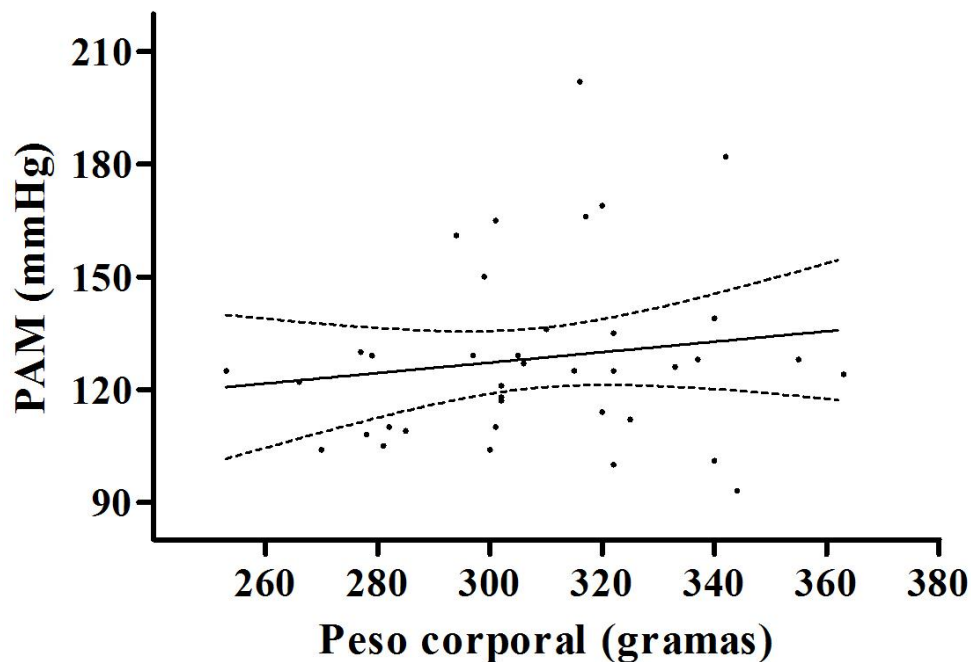


Figura 28. Gráfico de dispersão entre o peso corporal e a pressão arterial média (PAM) basal registrada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle seguido de cirurgia 1R, 1C (Con-1R, 1C) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C (HCI-1R, 1C). A figura acima mostra que não há associação entre o peso corporal dos animais e os valores de PAM obtidos no dia do registro. A linha contínua mostra a “best fit line” calculada na regressão linear pelo métodos dos mínimos quadrados, enquanto que as linhas tracejadas representam as bandas de confiança (95%).

Variáveis cardiovasculares basais

Na Figura 29 podemos observar os valores médios da pressão arterial média, da pressão arterial sistólica, da pressão arterial diastólica e da frequência cardíaca nos 4 grupos estudados. Ao final do protocolo experimental, a pressão arterial média do grupo Con-1R, 1C (140 ± 6 mmHg) foi significativamente superior em relação ao grupo Con-Sham (96 ± 1 mmHg; painel A). Da mesma forma, a pressão arterial média do grupo HCI-1R, 1C (117 ± 3 mmHg) foi maior em relação a do grupo HCI-Sham (94 ± 1 mmHg; $p < 0,05$). Não observamos diferenças nos níveis de pressão arterial média entre os grupos Con-Sham e HCI-Sham ($p < 0,05$). No entanto, a pressão arterial média do grupo HCI-1R, 1C foi significativamente menor quando comparada com a do grupo Con-1R, 1C.

Os valores de pressão arterial sistólica foram significativamente maiores nos grupos Con-1R, 1C (179 ± 8 mmHg) e HCI-1R, 1C (150 ± 4 mmHg) em relação aos seus respectivos controles (Con-Sham, 121 ± 2 e HCI-Sham, 118 ± 1 mmHg; $p < 0,05$; painel B). Não houve diferença significativa entre os valores de pressão arterial sistólica entre os grupos Con-Sham e HCI-Sham, embora o grupo HCI-1R, 1C tenha apresentado valores significativamente menores quando comparados aos do grupo Con-1R, 1C. A pressão arterial diastólica foi superior nos grupos Con-1R, 1C (111 ± 5 mmHg) e HCI-1R, 1C (91 ± 3 mmHg) em relação aos grupos Con-Sham (78 ± 1 mmHg) e HCI-Sham (76 ± 1 mmHg; $p < 0,05$; painel C), respectivamente. Não houve diferença significativa entre os grupos Con-Sham e HCI-Sham ($p > 0,05$), mas os níveis de pressão arterial diastólica foram significativamente menores no grupo HCI-1R, 1C em relação ao grupo Con-1R, 1C ($p < 0,05$). Os valores de frequência cardíaca basal nos grupos foram: Con-

Sham, 363 ± 7 ; Con-1R, 1C, 394 ± 16 ; HCI-Sham, 350 ± 7 e HCI-1R, 1C, 364 ± 6 bpm.

Não houve diferença significativa na frequência cardíaca basal entre os 4 grupos analisados (painel D).

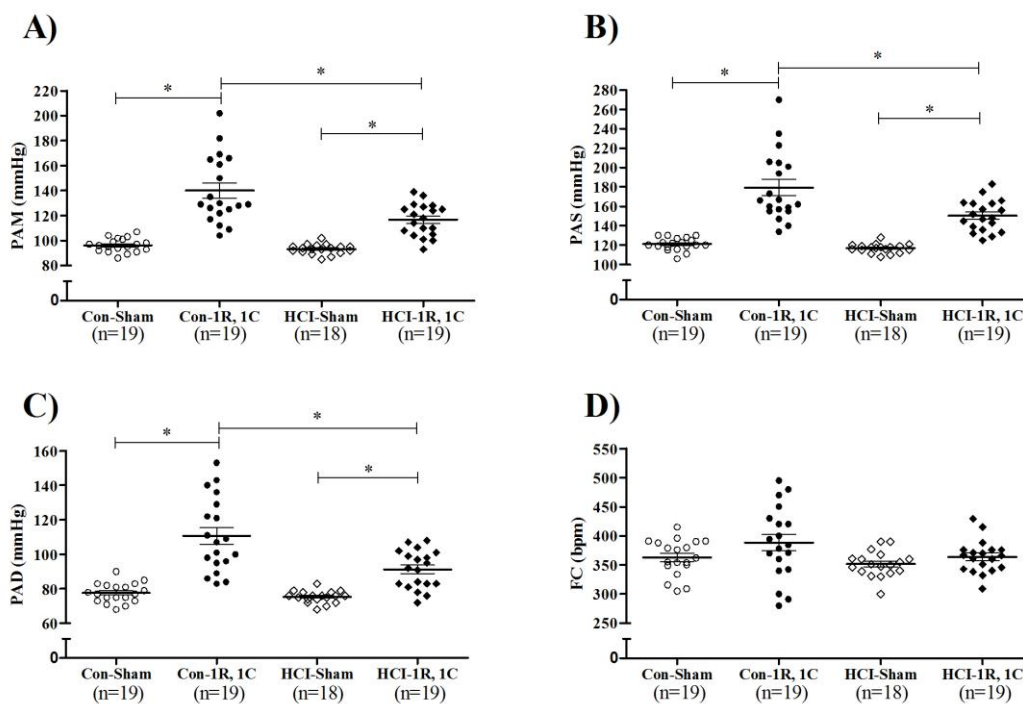


Figura 29. Painel A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle seguido de cirurgia Sham (Con-Sham); controle seguido de cirurgia 1R, 1C (Con-1R, 1C); hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia Sham (HCI-Sham) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C (HCI-1R, 1C). Registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Variáveis respiratórias basais

Na Figura 30 podemos observar os valores médios da frequência respiratória, do volume corrente, e da ventilação nos 4 grupos estudados. A frequência respiratória

basal foi semelhante nos diferentes grupos experimentais estudados ($p > 0,05$; painel A). Os valores de frequência respiratória basal para cada grupo foram: Con-Sham, 113 ± 3 ; Con-1R, 1C, 120 ± 5 ; HCI-Sham, 109 ± 6 ; HCI-1R, 1C, 123 ± 4 ciclos por minuto.

Os valores de volume corrente na condição basal também foram similares entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; painel B). Os valores de volume corrente para cada grupo foram: Con-Sham, $10,9 \pm 0,5$; Con-1R, 1C, $11,2 \pm 0,6$; HCI-Sham, $10,6 \pm 0,7$; HCI-1R, 1C, $11,0 \pm 0,3$ mL/kg. A ventilação basal também não foi diferente entre os grupos avaliados ($p > 0,05$; painel C). Os valores de ventilação entre os grupos foram: Con-Sham, $1245,0 \pm 83,5$; Con-1R, 1C, $1346,8 \pm 86,6$; HCI-Sham, $1100,9 \pm 50,5$; HCI-1R, 1C, $1350,2 \pm 52,3$ mL.kg⁻¹.min⁻¹.

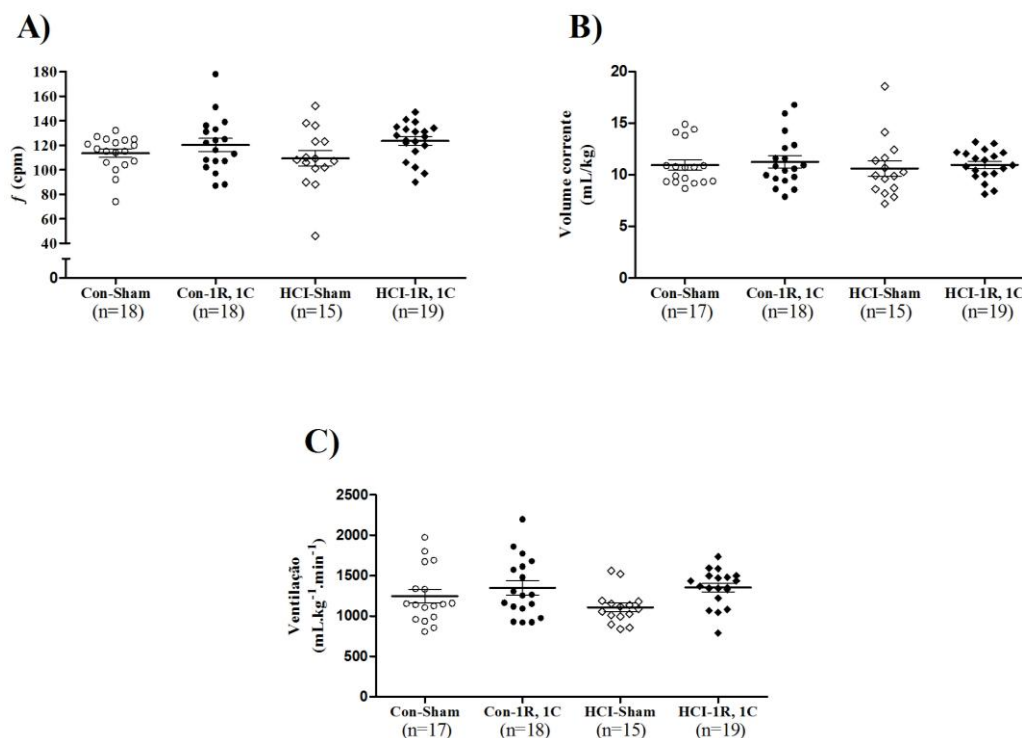


Figura 30. Painel A, frequência respiratória (f); painel B, volume corrente; painel C, ventilação basal, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle seguido de cirurgia Sham (Con-Sham); controle seguido de cirurgia 1R, 1C (Con-1R, 1C); hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia Sham (HCI-Sham) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C (HCI-1R, 1C). Registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

Duração das diferentes fases do ciclo respiratório

Os valores médios da duração do ciclo respiratório, da inspiração e da expiração nos grupos Con-Sham, Con-1R, 1C, HCI-Sham e HCI-1R, 1C são apresentados na Tabela 3. Nenhuma dessas variáveis foi alterada pela pré-exposição à HCI ($p > 0,05$).

Tabela 3. Duração do ciclo respiratório, da inspiração e da expiração, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle seguido de cirurgia Sham (Con-Sham); controle seguido de cirurgia 1R, 1C (Con-1R, 1C); hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia Sham (HCI-Sham) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C (HCI-1R, 1C). Registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

	<u>Con-Sham</u>	<u>Con-1R, 1C</u>	<u>HCI-Sham</u>	<u>HCI-1R, 1C</u>
Duração do ciclo (ms)	564 \pm 25	532 \pm 25	605 \pm 54	506 \pm 17
Duração da inspiração (ms)	225 \pm 7	225 \pm 10	220 \pm 11	222 \pm 10
Duração da expiração (ms)	338 \pm 25	307 \pm 18	385 \pm 47	284 \pm 10

Bloqueio ganglionar

Na Figura 31 podemos observar a pressão arterial média no período basal, e após a injeção intravenosa de losartan, AVPx e hexametônio (painel A). A queda da pressão arterial em resposta ao bloqueio ganglionar com hexametônio foi maior no grupo Con-1R, 1C (-62 ± 3 mmHg) em relação ao grupo Con-Sham (-44 ± 2 mmHg; $p < 0,05$; painel B, Figura 31). No entanto, a queda de pressão após a administração do hexametônio não diferiu entre os grupos HCI-Sham (-44 ± 3 mmHg) e HCI-1R, 1C (-52 ± 3 mmHg; $p > 0,05$), enquanto a queda de pressão observada no grupo HCI-1R, 1C foi menor quando comparada ao grupo Con-1R, 1C ($p < 0,05$).

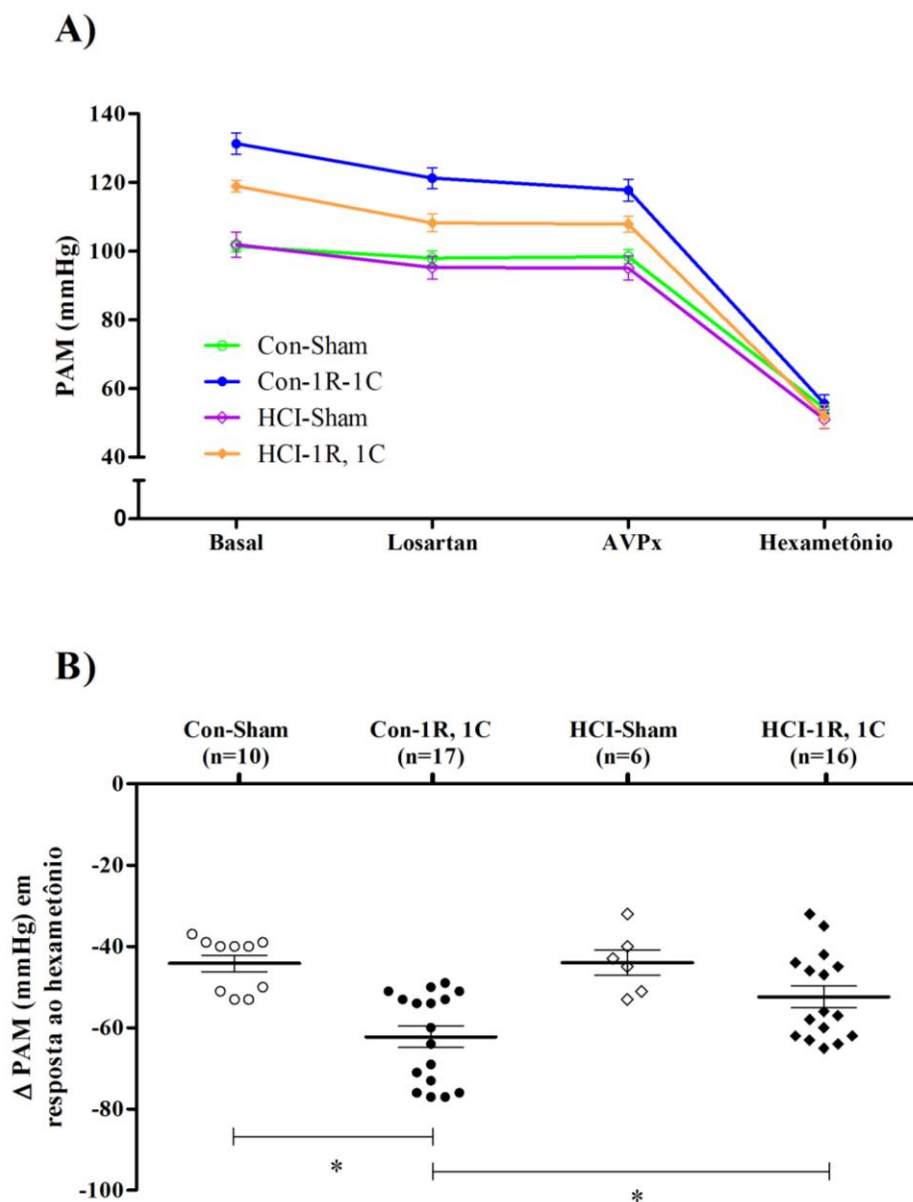


Figura 31. Protocolo de bloqueio ganglionar com hexametônio. Painei A, pressão arterial média (PAM) antes (basal), após a injeção sequencial de losartan, AVPx e hexametônio. Painei B, variações na PAM promovidas pela injeção de hexametônio realizada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle seguido de cirurgia Sham (Con-Sham); controle seguido de cirurgia 1R, 1C (Con-1R, 1C); hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia Sham (HCI-Sham) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C (HCI-1R, 1C). Os registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Participação da inervação renal no pré-condicionamento promovido pela hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)

Variáveis cardiovasculares basais

Na Figura 32 podemos observar os valores médios da pressão arterial média, da pressão arterial sistólica, da pressão arterial diastólica e da frequência cardíaca nos 4 grupos estudados. Após a desnervação renal, o aumento de pressão arterial promovido pelo modelo de hipertensão 1R, 1C foi significativamente reduzido. Os grupos Con-1R, 1C/DR (109 ± 3 mmHg) e HCI-1R, 1C/DR (109 ± 4 mmHg) apresentaram os valores de pressão arterial média significativamente menores quando comparados aos seus controles Con-1R, 1C/DR Sham (153 ± 9 mmHg) e HCI-1R, 1C/DR Sham (135 ± 6 mmHg; $p < 0,05$; painel A), respectivamente. As diferenças entre os grupos Con-1R, 1C/DR Sham e HCI-1R, 1C/DR Sham ($p < 0,05$), não foram mais observadas após a desnervação renal (Con-1R, 1C/DR vs HCI-1R, 1C/DR; $p > 0,05$).

Os valores de pressão arterial sistólica foram significativamente maiores nos grupos Con-1R, 1C/DR Sham (180 ± 11 mmHg) e HCI-1R, 1C/DR Sham (164 ± 8 mmHg), quando comparados aos grupos Con-1R, 1C/DR (128 ± 4 mmHg) e HCI-1R, 1C/DR (130 ± 6 mmHg; painel B), respectivamente. Não foram identificadas diferenças entre os grupos Con-1R, 1C/DR Sham e HCI-1R, 1C/DR Sham, assim como entre os grupos Con-1R, 1C/DR e HCI-1R, 1C/DR ($p > 0,05$). A pressão arterial diastólica dos grupos Con-1R, 1C/DR Sham (129 ± 9 mmHg) e HCI-1R, 1C/DR Sham (109 ± 5 mmHg) foi maior em relação aos grupos Con-1R, 1C/DR (92 ± 3 mmHg) e HCI-1R,

1C/DR (91 ± 5 mmHg; painel C), respectivamente. Por outro lado, o grupo Con-1R, 1C/DR Sham apresentou níveis superiores de pressão arterial diastólica em relação aos encontrados no grupo HCI-1R, 1C/DR Sham ($p < 0,05$). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas na pressão arterial diastólica entre os grupos Con-1R, 1C/DR e HCI-1R, 1C/DR ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa na frequência cardíaca basal entre os grupos ($p > 0,05$; painel D). Os valores médios de frequência cardíaca encontrados em cada grupo foram os seguintes: Con-1R, 1C/DR Sham, 326 ± 17 ; Con-1R, 1C/DR, 334 ± 18 ; HCI-1R, 1C/DR Sham, 340 ± 17 ; HCI-1R, 1C/DR, 374 ± 30 bpm.

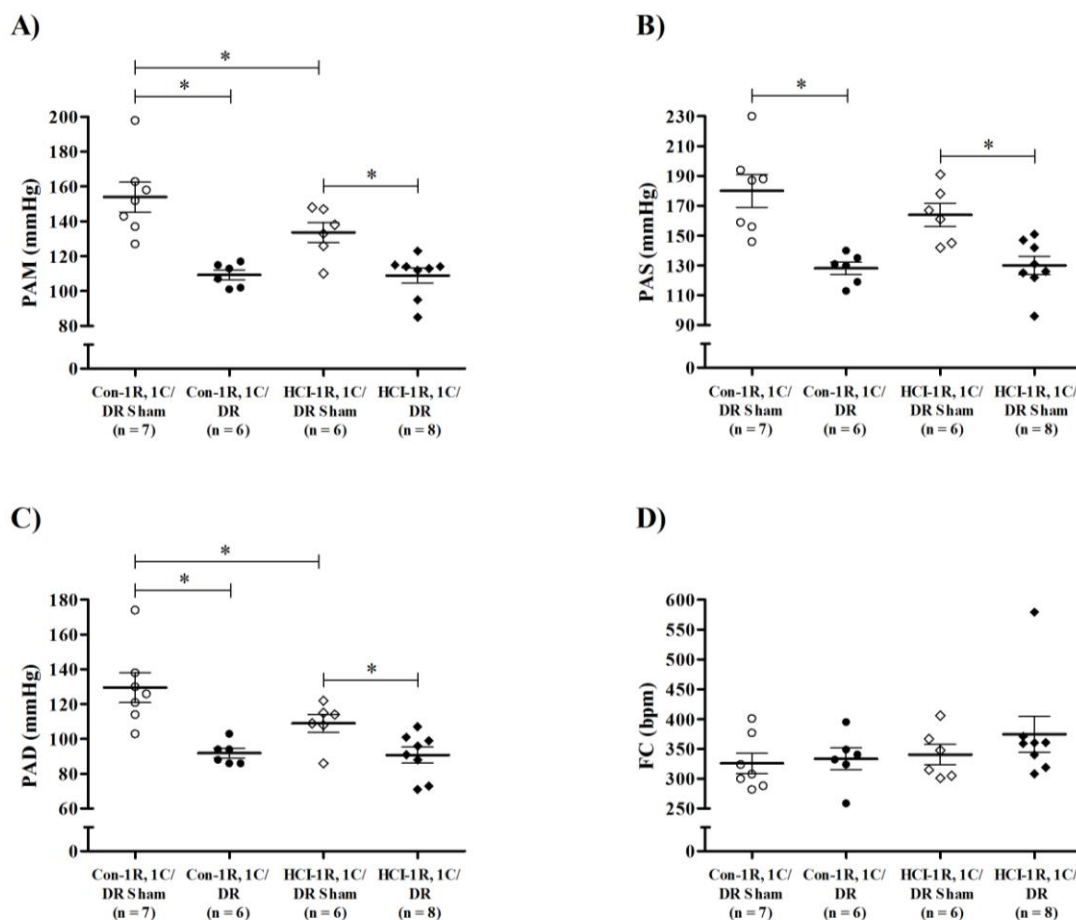


Figura 32. Paineis A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: controle seguido de cirurgia 1R, 1C + desnervação renal Sham (Con-1R, 1C/DR Sham); controle seguido de cirurgia 1R, 1C + desnervação renal (Con-1R, 1C/DR); hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C + desnervação renal Sham (HCI-1R, 1C/DR Sham) e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C + desnervação renal (HCI-1R, 1C/DR). Registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Participação dos quimiorreceptores periféricos no pré-condicionamento promovido pela hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)

Variáveis cardiovasculares basais

Na Figura 33 podemos observar os valores médios da pressão arterial média, da pressão arterial sistólica, da pressão arterial diastólica e da frequência cardíaca nos 3 grupos estudados. Os animais submetidos ao modelo de hipertensão renal 1R, 1C (RCC/Con-1R, 1C, 135 ± 6 ; RCC/HCI-1R, 1C, 128 ± 6 mmHg) desenvolveram níveis de pressão arterial média significativamente maiores que os observados no grupo Sham-Con (99 ± 2 mmHg; painel A). No entanto, com a remoção prévia do corpúsculo carotídeo, verificamos que o efeito do pré-condicionamento promovido pela HCI sobre o modelo de hipertensão 1R, 1C foi abolido (RCC/Con-1R, 1C vs RCC/HCI-1R, 1C; $p > 0,05$).

Os valores de pressão arterial sistólica foram significativamente maiores nos grupos RCC/Con-1R, 1C (162 ± 8 mmHg) e RCC/HCI-1R, 1C (145 ± 6 mmHg), quando comparados ao grupo Sham-Con (116 ± 3 mmHg; $p > 0,05$; painel B). Não foram identificadas diferenças entre os grupos RCC/Con-1R, 1C e RCC/HCI-1R, 1C ($p > 0,05$). Os valores de pressão arterial diastólica foram significativamente superiores nos grupos RCC/Con-1R, 1C e RCC/HCI-1R, 1C (111 ± 5 e 110 ± 6 mmHg, respectivamente), em relação ao grupo Sham-Con (85 ± 3 mmHg; painel C). No entanto, os níveis de pressão arterial observados nos grupos RCC/Con-1R, 1C e RCC/HCI-1R, 1C não foram diferentes ($p > 0,05$). Não observamos diferenças significativas na frequência cardíaca entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; painel D).

Os valores médios de frequência cardíaca obtidos em cada grupo foram: Sham-Con, 347 ± 9 ; RCC/Con-1R, 1C, 357 ± 15 e RCC/HCI-1R, 1C, 388 ± 20 bpm.

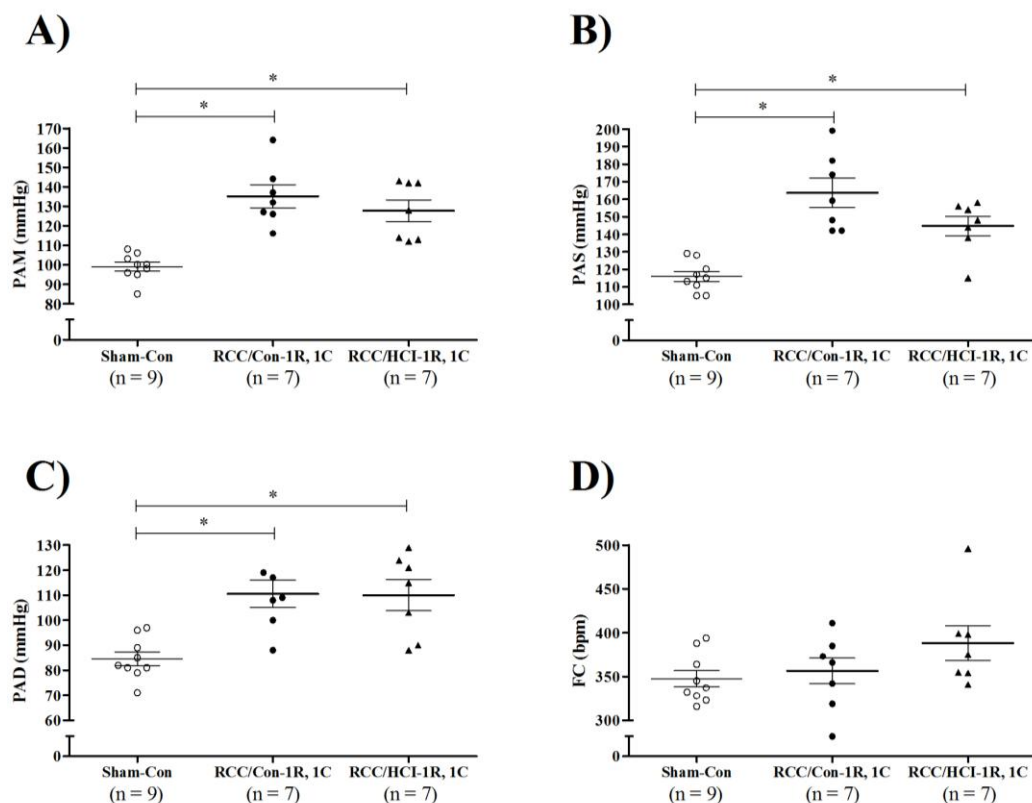


Figura 33. Paineis A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo Sham seguida de controle + cirurgia 1R, 1C (Sham-Con); cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo seguida de controle + cirurgia 1R, 1C (RCC/Con-1R, 1C); cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo seguida de hipóxia crônica intermitente + cirurgia 1R, 1C (RCC/HCI-1R, 1C). Registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Bloqueio ganglionar

Na Figura 34 podemos observar a pressão arterial média no período basal, e após a injeção intravenosa de losartan, AVPx e hexametônio (painel A). O protocolo de bloqueio ganglionar mostrou que a queda da pressão arterial média promovida pela injeção de hexametônio foi maior nos grupos RCC/Con-1R, 1C e RCC/HCI-1R, 1C (-60 ± 4 e -63 ± 7 mmHg, respectivamente), quando comparados ao grupo Sham-Con (-37 ± 2 mmHg). No entanto, não houve diferença entre os grupos RCC/Con-1R, 1C e RCC/HCI-1R, 1C ($p > 0,05$; painel B, Figura 34).

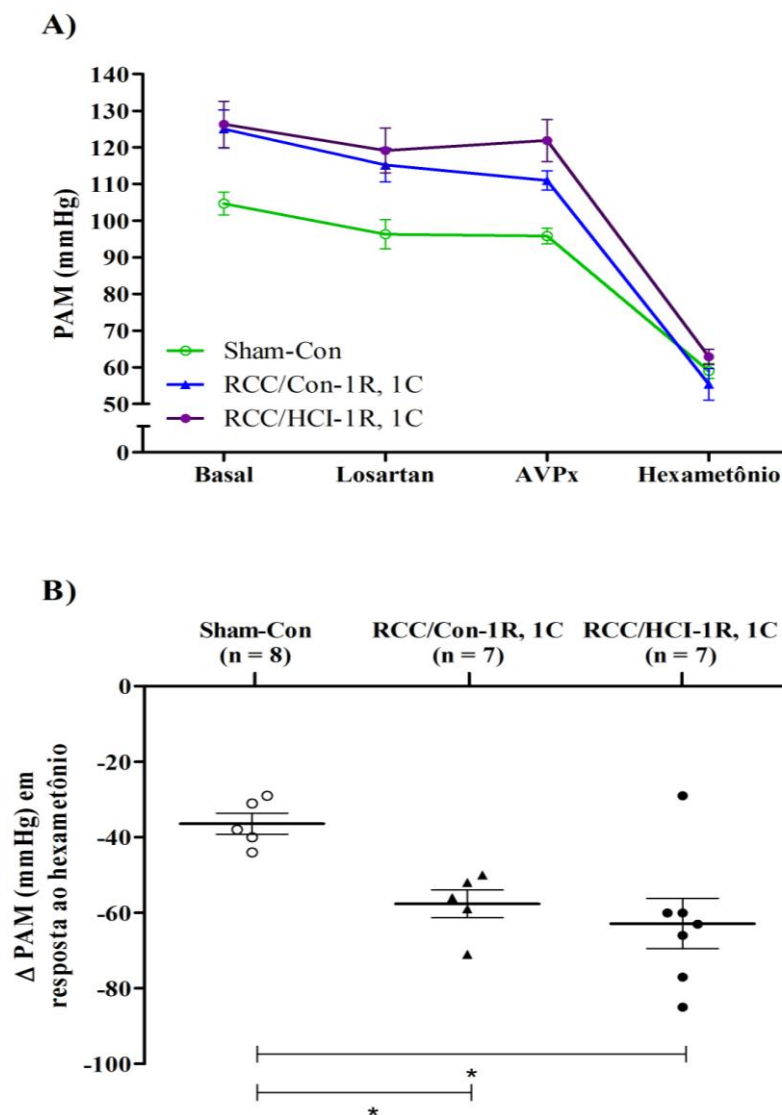


Figura 34. Protocolo de bloqueio ganglionar com hexametônio. Painei A, pressão arterial média (PAM) antes (basal), após a injeção sequencial de losartan, AVPx e hexametônio. Painei B, variações na PAM promovidas pela injeção de hexametônio realizada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo Sham seguida de controle + cirurgia 1R, 1C (Sham-Con); cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo seguida de controle + cirurgia 1R, 1C (RCC/Con-1R, 1C); cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo seguida de hipóxia crônica intermitente + cirurgia 1R, 1C (RCC/HCI-1R, 1C). Os registros cardiovasculares foram realizados 9 dias após o procedimento cirúrgico 1R, 1C e os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

Variáveis cardiovasculares basais

Na Figura 35 podemos observar os valores médios da pressão arterial média, da pressão arterial sistólica, da pressão arterial diastólica e da frequência cardíaca nos 4 grupos estudados. Os valores de pressão arterial média basal foram superiores nos grupos SHR-Con (138 ± 2 mmHg) e SHR-HCI (133 ± 3 mmHg) em comparação aos seus controles WKY-Con (104 ± 2 mmHg) e WKY-HCI (104 ± 1 mmHg; $p < 0,05$; painel A), respectivamente. No entanto, não houve diferença entre os grupos WKY-Con e WKY-HCI ($p > 0,05$), assim como entre os grupos SHR-Con e SHR-HCI ($p > 0,05$).

A pressão arterial sistólica basal também foi significativamente maior nos grupos SHR-Con (165 ± 3 mmHg) e SHR-HCI (155 ± 4 mmHg) em comparação aos seus controles WKY-Con (124 ± 3 mmHg) e WKY-HCI (121 ± 1 mmHg; painel B), respectivamente. Não houve diferença significativa entre os grupos WKY-Con e WKY-HCI, assim como entre os grupos SHR-Con e SHR-HCI ($p > 0,05$). Da mesma forma, os valores de pressão arterial diastólica basal foram significativamente maiores nos grupos SHR-Con (112 ± 3 mmHg) e SHR-HCI (113 ± 4 mmHg) em comparação aos seus controles WKY-Con (87 ± 3 mmHg) e WKY-HCI (87 ± 2 mmHg; $p < 0,05$; painel C), respectivamente. Os valores de pressão arterial diastólica não foram diferentes entre os grupos WKY-Con e WKY-HCI, assim como entre os grupos SHR-Con e SHR-HCI ($p > 0,05$). No que diz respeito à frequência cardíaca basal, os grupos SHR-Con ($356 \pm$

6 bpm) e SHR-HCI (389 ± 14 bpm) apresentaram valores significativamente elevados quando comparados aos seus respectivos controles WKY-Con (309 ± 10 bpm) e WKY-HCI (304 ± 6 bpm; $p < 0,05$; painel D). Os valores de frequência cardíaca basal nos grupos controle WKY-Con e WKY-HCI não foram diferentes entre os grupos estudados ($p > 0,05$).

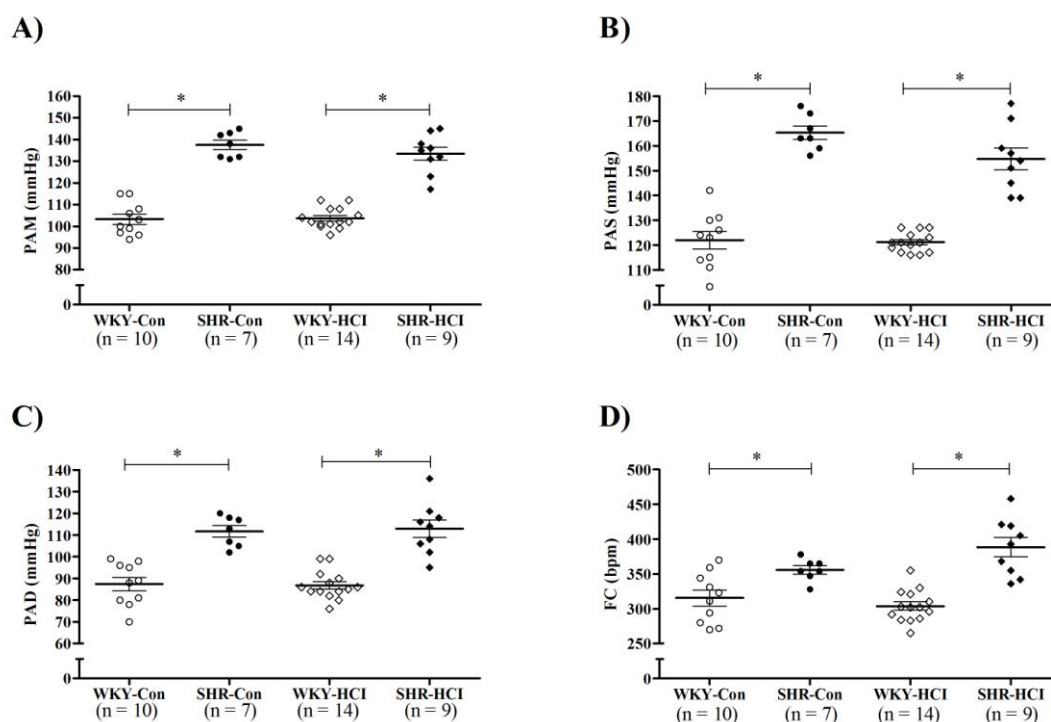


Figura 35. Paineis A, pressão arterial média (PAM); painel B, pressão arterial sistólica (PAS); painel C, pressão arterial diastólica (PAD); e painel D, frequência cardíaca (FC) basais registradas 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: ratos Wistar Kyoto submetidos ao controle (WKY-Con); ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao controle (SHR-Con); ratos Wistar Kyoto submetidos à hipóxia crônica intermitente (WKY-HCI); ratos espontaneamente hipertensos submetidos à hipóxia crônica intermitente (SHR-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

Variáveis respiratórias basais

Na Figura 36 podemos os valores médios da frequência respiratória, do volume corrente, e da ventilação nos 4 grupos estudados. Não foram detectadas diferenças significativas na frequência respiratória basal entre os grupos ($p > 0,05$; painel A). Os valores médios da frequência respiratória referentes a cada grupo experimental foram os seguintes: WKY-Con, 93 ± 9 ; SHR-Con, 89 ± 4 ; WKY-HCI, 99 ± 6 ; SHR-HCI, 84 ± 4 ciclos por minuto.

Não foram observadas diferenças significativas no volume corrente na condição basal entre os grupos (painel B). Os valores médios de volume corrente referentes a cada grupo experimental foram os seguintes: WKY-Con, $13,0 \pm 1,7$; SHR-Con, $15,7 \pm 1,2$; WKY-HCI, $13,4 \pm 0,7$; SHR-HCI, $14,9 \pm 1,8$ mL/kg. Não foram encontradas diferenças significativas nos valores médios da ventilação basal entre os grupos ($p > 0,05$; painel C). Os valores médios da ventilação referentes a cada grupo experimental foram os seguintes: WKY-Con, $1159,9 \pm 117,9$; SHR-Con, $1414,2 \pm 156,7$; WKY-HCI, $1381,4 \pm 118,1$; SHR-HCI, $1307,4 \pm 140,0$ mL.kg⁻¹.min⁻¹.

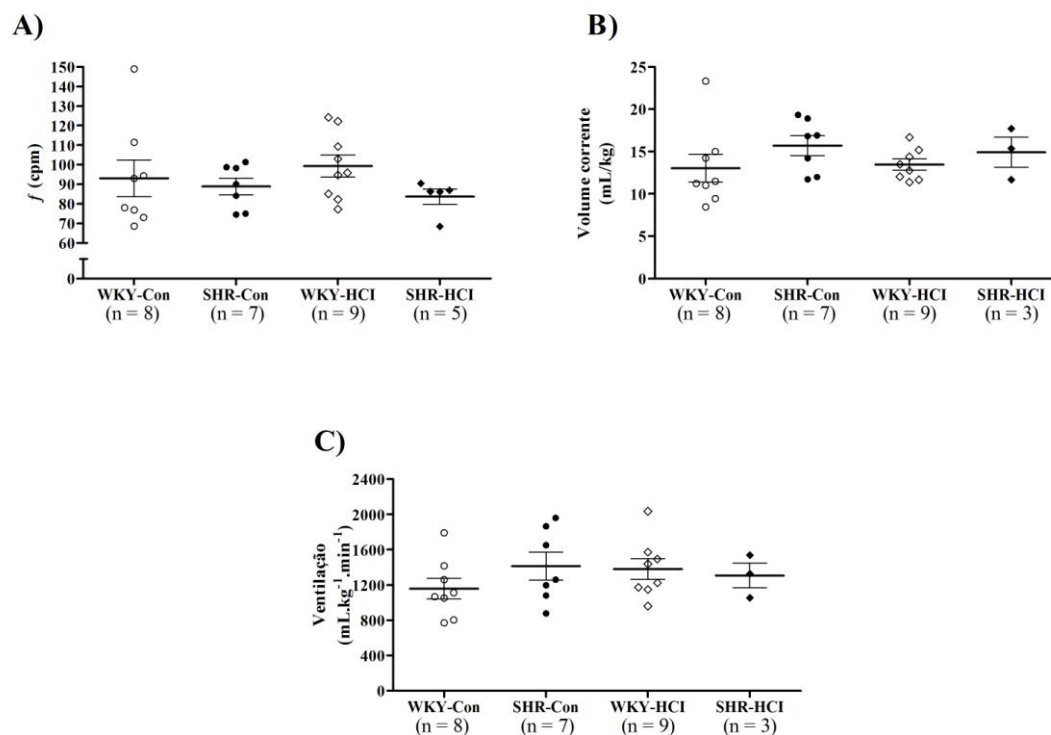


Figura 36. Frequência Painel A, frequência respiratória (f); painel B, volume corrente; painel C, ventilação basal, registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: ratos Wistar Kyoto submetidos ao controle (WKY-Con); ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao controle (SHR-Con); ratos Wistar Kyoto submetidos à hipóxia crônica intermitente (WKY-HCI); ratos espontaneamente hipertensos submetidos à hipóxia crônica intermitente (SHR-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

Duração das diferentes fases do ciclo respiratório

A duração do ciclo respiratório, da inspiração e da expiração foi semelhante entre os grupos analisados ($p > 0,05$). Os valores referentes a cada grupo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Duração do ciclo respiratório, da inspiração e da expiração registrados 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: ratos Wistar Kyoto submetidos ao controle (WKY-Con); ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao controle (SHR-Con); ratos Wistar Kyoto submetidos à hipóxia crônica intermitente (WKY-HCI); ratos espontaneamente hipertensos submetidos à hipóxia crônica intermitente (SHR-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

	<u>WKY-Con</u>	<u>SHR-Con</u>	<u>WKY-HCI</u>	<u>SHR-HCI</u>
Duração do ciclo (ms)	709 \pm 58	712 \pm 32	631 \pm 35	765 \pm 33
Duração da inspiração (ms)	375 \pm 37	360 \pm 31	332 \pm 23	380 \pm 34
Duração da expiração (ms)	334 \pm 26	352 \pm 41	298 \pm 20	383 \pm 15

Bloqueio ganglionar

Na Figura 37 podemos observar a pressão arterial média no período basal, e após a injeção intravenosa de losartan, AVPx e hexametônio (painel A). A queda na pressão arterial média observada após a injeção de hexametônio foi significativamente maior nos grupos SHR-Con (-64 ± 2 mmHg) e SHR-HCI (-67 ± 3 mmHg), quando comparada com os grupos WKY-Con (-51 ± 4 mmHg) e WKY-HCI (-54 ± 3 mmHg; $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos SHR-Con e SHR-HCI, assim como entre os grupos WKY-Con e WKY-HCI ($p > 0,05$; painel B, Figura 37).

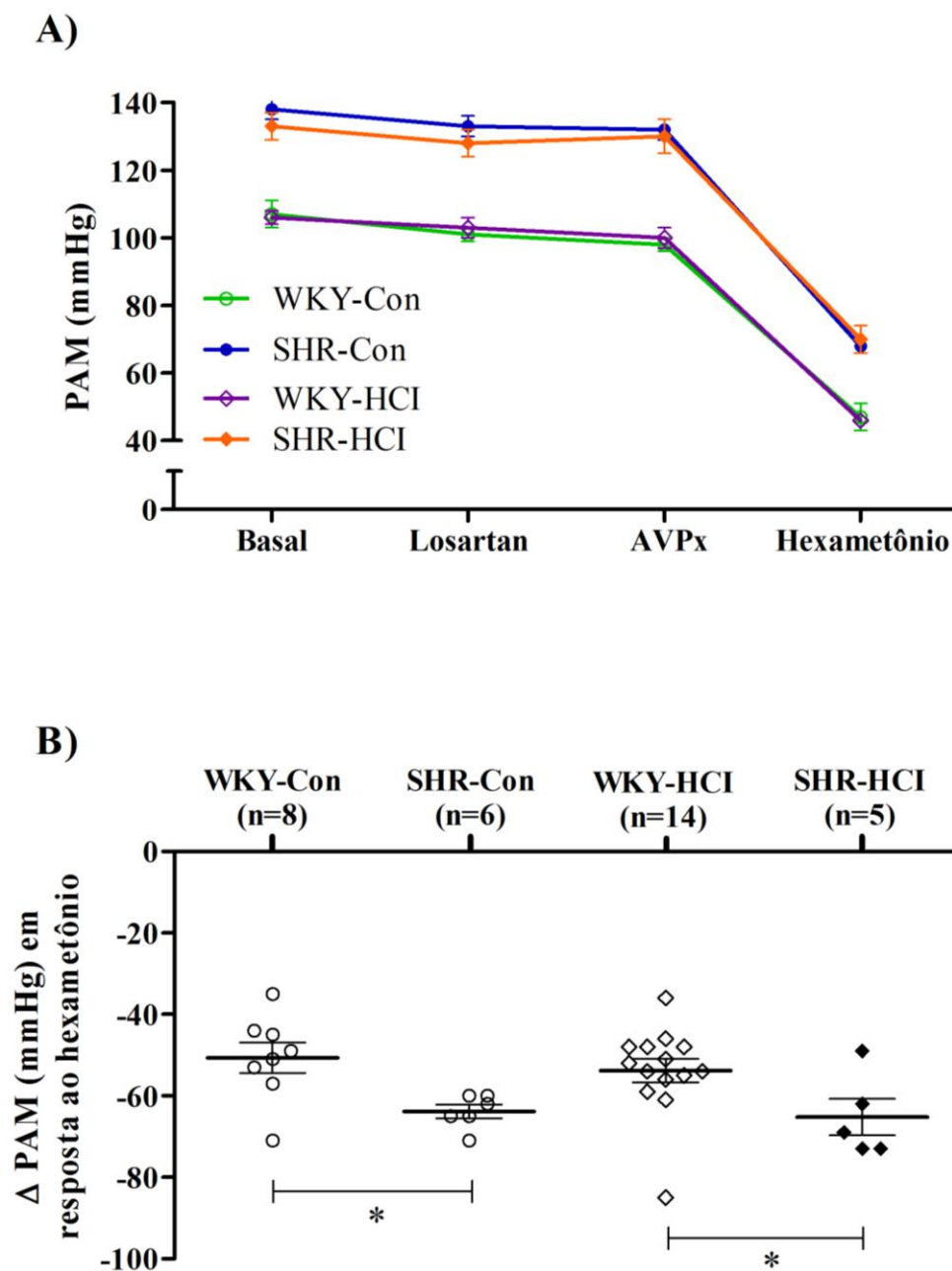


Figura 37. Protocolo de bloqueio ganglionar com hexametônio. Painei A, pressão arterial média (PAM) antes (basal), após a injeção sequencial de losartan, AVPx e hexametônio. Painei B, variações na PAM promovidas pela injeção de hexametônio realizada 24 horas após o encerramento do protocolo experimental nos grupos: ratos Wistar Kyoto submetidos ao controle (WKY-Con); ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao controle (SHR-Con); ratos Wistar Kyoto submetidos à hipóxia crônica intermitente (WKY-HCI); ratos espontaneamente hipertensos submetidos à hipóxia crônica intermitente (SHR-HCI). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma segunda exposição à HCI

Nesse protocolo investigamos os efeitos de uma exposição prévia à HCI sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias normalmente observadas em resposta a uma segunda exposição. Apesar das evidências experimentais indicando que diferentes tipos de pré-condicionamento protegem o sistema cardiovascular de outros estímulos futuros mais intensos (Katare *et al.*, 2009; Redington *et al.*, 2012), nos nossos experimentos observamos alterações semelhantes em ratos pré-condicionados à HCI e naïves quando expostos à HCI. Isso indica que o pré-condicionamento, pelo menos nessas condições experimentais, não exerce o esperado efeito protetor sobre o sistema cardiovascular.

Os grupos submetidos à HCI ficaram hipertensos, o que provavelmente está relacionado a um aumento da atividade simpática. Evidências sobre o aumento da atividade simpática cardiovascular foi obtida por meio da variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio do tempo e da frequência (Zoccal *et al.*, 2009). É que oscilações da banda LF no espectro da pressão arterial sistólica estão diretamente relacionadas com o tônus simpático vasoconstrictor, enquanto que oscilações da banda HF estão relacionadas com a modulação respiratória da pressão arterial (Japundzic *et al.*, 1990; Malliani *et al.*, 1991; Montano *et al.*, 1994).

Nós observamos aumento da variância total da pressão arterial sistólica, assim como da potência de LF em ambos os grupos expostos à HCI, o que sugere que a modulação simpática da pressão arterial sistólica está elevada em ratos submetidos à HCI. Esses resultados estão de acordo com os reportados em estudos prévios do nosso

laboratório, que mostraram por meio de bloqueio ganglionar e da análise espectral aumento da atividade simpática em ratos expostos à HCI (Zoccal *et al.*, 2009). Além disso, a frequência cardíaca basal foi maior nos animais submetidos à HCI quando comparada àquela registrada no grupo Con, o que também parece depender de uma elevação na atividade simpática.

A potência da banda de HF, por outro lado, aumentou apenas no Grupo Pré-HCI em relação ao grupo Con. Como mencionado acima, a potência da banda de HF no espectro da pressão arterial sistólica está relacionada com a modulação da respiração sobre a pressão arterial e pode estar associada com: 1) alterações da pressão intratorácica durante o ciclo respiratório, causadas especialmente por aferências de receptores de estiramento pulmonar; 2) alterações no acoplamento entre neurônios geradores da atividade simpática e respiratória no bulbo. Ainda que a potência da banda de HF esteja aumentada no grupo Pré-HCI em relação ao Con, não observamos diferenças entre os grupos HCI e Pré-HCI. Nesse sentido, estudos prévios do nosso laboratório mostraram aumento da potência de HF em animais expostos à HCI pela primeira vez (Zoccal *et al.*, 2009).

As variáveis ventilatórias basais, medidas por meio da pletismografia de corpo inteiro, não foram afetadas pela HCI. Todos os grupos avaliados apresentaram valores similares de frequência respiratória, volume corrente, ventilação e duração da respiração, da inspiração e da expiração. Estudos anteriores mostraram que a respiração basal não é afetada em animais adultos submetidos à HCI (McGuire *et al.*, 2003). No entanto, há estudos mostrando que a exposição de ratos neonatos à HCI leva a diversas disfunções respiratórias que permanecem até a vida adulta, como aumento da ventilação e da frequência respiratória, assim como respiração irregular (Nanduri *et al.*, 2012;

Reeves *et al.*, 2006). Estudos de Pawar *et al.* (2008) compararam as respostas das células do corpúsculo carotídeo à HCI entre ratos adultos e neonatos. A susceptibilidade à HCI, a magnitude da sensibilização, a reversibilidade da resposta e as mudanças morfológicas das células glomus foram diferentes entre eles, indicando que ratos neonatos são mais afetados pela HCI que ratos adultos. O método utilizado para avaliação dos parâmetros respiratórios também pode influenciar na interpretação dos resultados obtidos. Estudos prévios do nosso laboratório mostraram por meio do registro direto do nervo frênico, indicador da atividade inspiratória, e do nervo abdominal, indicador da atividade expiratória, que a exposição à HCI promove alterações em fases específicas ao longo do ciclo respiratório em ratos jovens (Zoccal *et al.*, 2008). No entanto, os resultados da pletismografia fornecem informações a respeito da atividade integrada dos diferentes músculos respiratórios recrutados durante o ciclo respiratório, não permitindo a distinção entre eles.

Nossos resultados mostraram que a resposta cardiovascular e respiratória do quimiorreflexo não foi alterada após a HCI. Estudos de Braga *et al.* (2006) mostraram na preparação coração-tronco cerebral isolados que a resposta de simpatoexcitação e a bradicardia promovida pela ativação do quimiorreflexo foi maior em ratos jovens expostos à HCI. A frequência respiratória, avaliada pela atividade do nervo frênico, também estava aumentada 20 segundos após a ativação do quimiorreflexo em animais expostos à HCI, mas corroborando com os nossos resultados a frequência respiratória foi similar em todos os outros períodos analisados anteriormente (Braga *et al.*, 2006). Estudos de Marcus *et al.* (2010) mostraram que a resposta pressora após 20 segundos de apneia foi similar entre ratos adultos mantidos em normóxia e expostos à HCI. Por outro lado, Nanduri *et al.* (2012) reportaram que a resposta ventilatória à hipóxia foi maior em

animais expostos à HCI no período neonatal. Possivelmente, a intensidade e duração dos protocolos de HCI, e a idade dos animais são responsáveis pelas diferenças entre os estudos supracitados.

Adicionalmente, não observamos alterações na resposta cronotrópica promovida pela ativação do barorreflexo, a qual foi analisada no pico da pressão arterial atingido após a injeção de fenilefrina ou nitroprussiato de sódio em ratos adultos expostos a 1 ou 2 protocolos de HCI. Estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que a resposta barorreflexa está aumentada em ratos jovens submetidos à HCI por 10 dias, o que de acordo com os autores contribuiu para que a elevação da pressão arterial promovida pela HCI não fosse ainda maior (Zoccal *et al.*, 2009). Outros estudos reportaram redução do controle barorreflexo após exposição à HCI (Lai *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2012).

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que não houve influência de uma pré-exposição à HCI sobre as respostas cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma nova exposição à HCI. As respostas cardiorrespiratórias observadas após a ativação do quimio- e do barorreflexo também não foram alteradas pela HCI. Quando as variáveis cardiovasculares foram avaliadas após 3 dias de exposição à HCI, não houve diferença da pressão arterial e da frequência cardíaca entre os animais pré-condicionados à HCI e animais naïve, o que sugere que o aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca em resposta à HCI ocorre de forma similar entre esses dois grupos.

Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia mantida (HM) sobre as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma nova exposição à hipóxia crônica intermitente (HCI)

Nosso objetivo nesse protocolo foi avaliar uma possível influência de outros estímulos hipóxicos sobre as respostas cardiovasculares e respiratórias observadas após uma exposição à HCI. Ainda que nossos resultados anteriores tenham mostrado que a pré-exposição à HCI não afetou as alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas pela HCI, nós testamos a hipótese de que outros estímulos hipóxicos como a HM poderiam influenciar as respostas cardiovasculares e respiratórias à HCI. Nesse sentido, os estudos de Reeves *et al.* (2003) mostraram que a exposição de ratos adultos durante 30 dias à HCI (FIO₂ 10% a cada 90 segundos, por 12 horas/dia) ou à HM (FIO₂10% por 12 horas/dia) promoveu aumento da ventilação basal, o qual seria mediado por mudanças distintas na relação entre frequência respiratória e volume corrente dependendo do protocolo de hipóxia adotado. Foi demonstrado por esses autores que a HCI, mas não a HM estava relacionada com aumento da expressão de receptores NMDA na região dorso-caudal do tronco cerebral (Reeves *et al.*, 2003), sugerindo que as adaptações observadas após episódios de HCI ou HM envolvem mecanismos celulares e moleculares diferentes.

Nossos resultados mostraram que ratos jovens previamente mantidos durante 24 horas em hipóxia (FIO₂ 10%) apresentam aumentos na pressão arterial em resposta a HCI similares àqueles observados em animais que não foram pré-condicionados. Por outro lado, alterações na plasticidade neuronal capazes de influenciar os níveis pressóricos em longo prazo foram observadas nos estudos de Ross *et al.* (2010), quando a exposição à HM ocorreu em um período crítico do desenvolvimento. Esses autores

mostraram que ratos neonatos mantidos em hipóxia (FIO_2 12% de P1 a P10) apresentam níveis de pressão arterial elevados após 2 meses de vida (Ross *et al.*, 2010). Esses estudos mostraram que a HM promove alterações plásticas no sistema cardiovascular quando aplicada dentro dos primeiros dias de nascimento. Nossos resultados indicam que tais alterações deixam de ser observadas quando esse estímulo hipóxico ocorre após o período de amamentação.

Nós observamos que o pré-condicionamento com HM preveniu contra o aumento da respiração basal após exposição à HCI. O mesmo não ocorreu quando realizamos o pré-condicionamento com a HCI, sugerindo uma influência em longo prazo específica da HM sobre a ventilação. No entanto, devemos ressaltar que o período de recuperação em normóxia adotado no protocolo de pré-condicionamento com HM foi metade daquele adotado no protocolo de pré-condicionamento com HCI, o que poderia ser suficiente para revelar possíveis efeitos na ventilação induzidos pelo pré-condicionamento. Nesse sentido, estudos de Olea *et al.* (2012) mostraram que o aumento da ventilação basal observado após a exposição de ratos neonatos à HM desaparece após certo tempo. Por outro lado, a combinação entre HM pós-natal e HCI (FIO_2 5% durante 40 segundos, a cada 80 segundos, 8 horas/dia) na vida adulta promoveu efeitos aditivos (Olea *et al.*, 2012). A combinação entre HM e HCI no período pós-natal (entre P0 e P15) aumenta a ventilação basal para níveis superiores aos observados com a exposição à HCI isolada (Mayer *et al.*, 2013). Reeves *et al.* (2003) mostraram que o aumento da ventilação observado após a exposição de ratos adultos à HM depende de um maior volume corrente. No entanto, a resposta ventilatória aguda à hipóxia depende de um aumento tanto na frequência respiratória, quanto no volume corrente.

Foi demonstrado que a exposição de ratos neonatos à HM está relacionada com uma menor resposta ventilatória aguda à hipóxia (Eden and Hanson, 1987; Mortola *et al.*, 1986), a qual parece ser dependente, ao menos em parte, de uma menor sensibilidade do corpúsculo carotídeo (Sterni *et al.*, 1999). A combinação entre HM e HCI nesse período diminui a resposta ventilatória aguda à hipóxia em relação tanto à HCI quanto à HM empregadas de forma isolada (Mayer *et al.*, 2013). No entanto, há evidências mostrando que a exposição de ratos à HM na fase adulta aumenta a resposta ventilatória aguda à hipóxia (Aaron and Powell, 1993; Reeves *et al.*, 2003). Nossos estudos, realizados em animais adultos e não anestesiados, mostraram que animais expostos à HCI apresentam maior bradicardia reflexa após a ativação do quimiorreflexo. Entretanto, não observamos qualquer influência do pré-condicionamento à HM sobre a resposta cronotrópica decorrente da injeção intravenosa de KCN. A resposta respiratória do quimiorreflexo diferiu apenas na fase inicial da resposta nos animais pré-condicionados à HM, sugerindo um efeito discreto da HM sobre o componente respiratório da resposta.

O barorreflexo arterial exerce uma influência inibitória tônica sobre a atividade simpática. Nossos resultados mostraram que a resposta de bradicardia reflexa, associada a um aumento na pressão arterial, não está alterada em ratos adultos expostos à HCI, independente do pré-condicionamento à HM. Estudos de Lai *et al.* (2006) foram os primeiros a reportar uma redução da atividade barorreflexa espontânea em ratos adultos a partir de 20 dias de exposição à HCI. Estudos de Peng *et al.* (2012) corroboraram com esses resultados, mostrando que a sensibilidade do barorreflexo está diminuída após a HCI, o que de acordo com esses autores seria decorrente do aumento da expressão de endotelina 1 em células endoteliais do seio carotídeo, mediada por espécies reativas de

oxigênio. Resultados consistentes foram obtidos tanto em animais adultos não anestesiados, como em animais sob o efeito de anestesia (Peng *et al.*, 2012). Por outro lado, estudos do nosso laboratório mostraram que o ganho do barorreflexo está aumentado após a HCI em ratos jovens com livre movimentação (Zoccal *et al.*, 2009). No entanto, a simpatoinibição ao nível do nervo cervical e a bradicardia reflexa não foi alterada em resposta a injeção de fenilefrina 30 dias após a HCI em animais adultos e anestesiados (Greenberg *et al.*, 1999). Considerando a diferença entre os estudos supracitados, o efeito da HCI sobre a atividade barorreflexa parece também ser influenciado pela duração e intensidade do estímulo hipóxico, efeito da anestesia e local onde a atividade simpática foi registrada.

Com base nos nossos resultados, podemos concluir que a pré-exposição à HM não afeta o desenvolvimento da hipertensão arterial observada após a HCI. A resposta respiratória do quimiorreflexo foi maior nos animais pré-condicionados à HM. No entanto, o controle do barorreflexo, avaliado em ratos adultos, não foi alterado após a HCI, independente do pré-condicionamento.

Influência do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)

Esse protocolo testou a hipótese de que a HCI promoveria alterações em longo prazo no sistema nervoso central, capazes de influenciar a resposta pressora do modelo de hipertensão renovascular 1R, 1C. Nossos resultados mostraram que a exposição prévia de ratos jovens à HCI durante 10 dias atenuou o desenvolvimento da hipertensão arterial induzida pelo modelo 1R, 1C. Nesse protocolo tivemos o cuidado de acompanhar o peso corporal dos animais ao longo de todo o protocolo experimental, incluindo o dia do implante do clipe na arterial renal e o dia do registro. Estudos sugerem que no modelo 1R, 1C, o nível de hipertensão observado para uma mesma abertura do clipe também está relacionado ao peso corporal, tendo em vista que animais mais pesados tendem a atingir os valores mais elevados de pressão arterial que animais mais leves (Bergamaschi *et al.*, 2014; Murphy *et al.*, 1984; Thomas *et al.*, 2003).

Não observamos nenhuma diferença de peso corporal entre os grupos controle seguido de cirurgia 1R, 1C e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C, seja no dia do implante do clipe na artéria renal, ou no dia do registro. Adicionalmente, a análise de regressão linear mostrou que não houve associação significativa entre peso corporal dos animais e o nível de hipertensão alcançado após a instalação do modelo 1R, 1C. Esses resultados excluem a possibilidade de que eventuais variações de peso entre os grupos poderiam contribuir para os menores valores de pressão arterial observados nos animais pré-condicionados à HCI. Mesmo que estatisticamente o peso dos animais do grupo hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia Sham tenha sido menor comparado ao peso dos animais do grupo hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C no dia do registro, por esse ser um grupo controle submetido apenas à

cirurgia 1R, 1C Sham, acreditamos que essa diferença não influenciou a interpretação dos nossos resultados.

A fisiopatologia associada ao modelo 1R, 1C foi bastante estudada por diferentes laboratórios (Bergamaschi *et al.*, 2014; Katholi *et al.*, 1982; Katholi *et al.*, 1981; Machado and Salgado, 1991; Menani *et al.*, 1988; Salgado and Machado, 1990), porém até hoje pouco se sabe sobre possíveis alterações respiratórias induzidas por esse modelo. Nossos resultados mostraram que as variáveis respiratórias avaliadas nesse estudo foram similares entre os grupos no dia do registro, mostrando que o modelo 1R, 1C não afeta o padrão respiratório desses animais, independente do pré-condicionamento à HCI. No entanto, o método de pletismografia avalia a atividade integrada dos diferentes músculos respiratórios, os quais, por sua vez, são controlados pela atividade coordenada dos neurônios respiratórios no tronco cerebral. Possíveis alterações em subpopulações específicas de neurônios geradores da atividade respiratória, assim como na atividade de determinado músculo respiratório não foram avaliadas devido às limitações desse método utilizado em animais acordados e com livre movimentação.

Nosso próximo passo foi investigar o mecanismo pelo qual a HCI atenua o aumento de pressão arterial promovido pelo modelo 1R, 1C. Inicialmente realizamos o bloqueio dos gânglios autonômicos com hexametônio. Esse método já foi utilizado em estudos anteriores do nosso laboratório (Zoccal *et al.*, 2009), assim como em estudos de outros laboratórios (Abdala *et al.*, 2012), visando comparar a contribuição da atividade simpática para manutenção dos níveis basais de pressão arterial. Nossos resultados estão em concordância com outros estudos que mostraram, por meio da medida de noradrenalina plasmática e da resposta pressora à injeção de hexametônio, aumento da

atividade simpática na fase crônica do modelo 1R, 1C (Katholi *et al.*, 1982). Adicionalmente, nós mostramos pela primeira vez que a exposição prévia à HCI reduz o nível da atividade simpática e protege contra o aumento de pressão arterial decorrente do modelo 1R, 1C.

Ainda que os mecanismos envolvidos sejam distintos, o aumento de pressão decorrente da exposição à HCI, assim como do modelo de hipertensão renal 1R, 1C, depende de alterações neurais que desencadeiam uma condição de hiperatividade simpática. Diferentes áreas no sistema nervoso central estão envolvidas na gênese da atividade simpática. Dentre elas podemos destacar a porção parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo; grupos celulares noradrenérgicos A5 da ponte; rafe caudal; neurônios C1 da RVLM; região rostral ventromedial do bulbo; e substância branca da medula espinhal ao nível da coluna cervical superior (Simms *et al.*, 2010). Essas áreas possuem neurônios pré-motores simpáticos e são caracterizadas por enviarem projeções monossinápticas para a coluna intermédio-lateral da medula espinhal (Jansen and Loewy, 1997; Strack *et al.*, 1989). Diversos estudos mostraram a importância desses grupos neuronais para a regulação simpática do tônus vasomotor, no entanto a RVLM parece exercer uma função essencial. A inativação ou lesão da RVLM imediatamente caudal ao grupo motor facial reduz a atividade simpática para níveis correspondentes àqueles observados após a transecção da medula espinhal, o que indica que a RVLM é a principal fonte excitatória para o tônus vasomotor simpático (Dampney and Moon, 1980; Guertzenstein and Silver, 1974; Guyenet, 2006; Ross *et al.*, 1984).

Em condições basais, sinapses inibitórias gabaérgicas da região caudal ventrolateral do bulbo regulam a atividade dos neurônios da RVLM (Cravo *et al.*,

1991). Neurônios pré-motores simpáticos da rafe, área A5, núcleo parabraquial e núcleo paraventricular do hipotálamo enviam projeções e podem influenciar a atividade dos neurônios da RVLM em situações específicas (Guyenet, 2006). Por outro lado, neurônios de segunda ordem na porção caudal do núcleo do trato solitário recebem preferencialmente aferências do corpúsculo carotídeo, e são estimulados em situações de hipóxia (Accorsi-Mendonca *et al.*, 2011; Machado, 2001; Mifflin, 1992). Esses neurônios, direta ou indiretamente, enviam projeções excitatórias para diversas áreas envolvidas com a geração da atividade simpática no sistema nervoso central (Zoccal *et al.*, 2014). Em ratos neonatos, a exposição à HCI foi capaz de promover alterações cardiovasculares permanentes, o que possivelmente está relacionado com alterações neuronais plásticas na via do quimiorreflexo (Nanduri *et al.*, 2012). Nesse contexto, nossos resultados dão suporte à hipótese de que a rede neuronal envolvida com o controle da pressão arterial está alterada após a HCI, mostrando que a pré-exposição à HCI protege contra a simpatoexcitação característica do modelo de hipertensão renal 1R, 1C, atenuando os valores de pressão arterial observados nesse modelo.

Oscilações na concentração de oxigênio observadas durante os ciclos de hipóxia-reoxigenação podem contribuir para o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Peng *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2006), levando a um desequilíbrio na expressão de fatores induzidos pela hipóxia (HIFs) (Nanduri *et al.*, 2015). Esse é considerado um importante mecanismo molecular envolvido nas alterações cardiovasculares e respiratórias promovidas pela HCI. Nesse sentido, o tratamento com antioxidantes preveniu contra o aumento da atividade simpática e, conseqüentemente, da pressão arterial associado à HCI (Nanduri *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2003). O aumento do estresse oxidativo em decorrência da exposição à HCI também está relacionado com reduções na

população neuronal em diferentes regiões cerebrais, como no hipocampo (Goldbart *et al.*, 2003), no núcleo ambíguo (Yan *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2008), no RVLN (Yan *et al.*, 2008), e no grupo respiratório ventral (Yan *et al.*, 2008). Dessa forma, os efeitos deletérios promovidos pela HCI frequentemente levam a deficiências cognitivas (Goldbart *et al.*, 2003), assim como a atenuação do controle cardiovascular (Yan *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2008). A possibilidade de que a degeneração neuronal promovida pela HCI em áreas específicas de controle cardiovascular possa estar envolvida nos mecanismos protetores associados ao pré-condicionamento à hipóxia não foi investigada nesse estudo. No entanto, esses achados podem ajudar a explicar nossos resultados.

Ao contrário do que foi observado em outros estudos de pré-condicionamento à HCI (Greenberg *et al.*, 1999), nossos dados mostraram um efeito protetor da HCI sobre o sistema cardiovascular em resposta ao modelo de hipertensão 1R, 1C. Na HCI, a ativação repetida dos quimiorreceptores periféricos leva ao aparecimento de disfunções cardiovasculares, como taquicardia, aumento da resistência vascular periférica, e elevação da pressão arterial, as quais são mediadas pela hiperatividade simpática (Marcus *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2015; Tahawi *et al.*, 2001; Zoccal *et al.*, 2007). No entanto, protocolos diferentes de hipóxia intermitente podem promover resultados opostos. Estudos mostraram que a exposição à hipóxia intermitente moderada é segura e eficiente na prevenção e no tratamento da hipertensão arterial sistêmica (Serebrovskaya *et al.*, 2008; Shatilo *et al.*, 2008). Isso mostra que a intensidade dos protocolos de HCI tem grande relevância para o tipo de alterações cardiovasculares que serão observadas, podendo ter efeitos desejáveis, indesejáveis, ou um balanço entre os dois (Brooks *et al.*,

1997; Fletcher *et al.*, 1992; Lesske *et al.*, 1997; Serebrovskaya *et al.*, 2008; Shatilo *et al.*, 2008; Tahawi *et al.*, 2001).

A exposição à HCI estimula a produção de múltiplos fatores de crescimento, como *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e *erythropoietin* (EPO). A BDNF é uma neurotrofina descoberta primeiramente pela sua função na neuroproteção de animais adultos e em desenvolvimento (Barde *et al.*, 1982; Jiang *et al.*, 2003; Marini *et al.*, 2004; Marini *et al.*, 1998; Tabakman *et al.*, 2004; Walton *et al.*, 1999). A expressão do BDNF no cérebro está diretamente associada com a pressão parcial de oxigênio no sangue arterial, via ativação do corpúsculo carotídeo (Dale *et al.*, 2014). Já a produção das proteínas VEGF e a EPO é regulada pelos níveis de *hipoxia-inducible factor-1* (HIF-1), um fator de transcrição importante na regulação de diferentes genes sensíveis à hipóxia. Tanto a VEGF quanto a EPO são conhecidas por desempenharem um papel protetor, seja no sistema nervoso central (Dale *et al.*, 2014) ou no sistema cardiovascular (Cai *et al.*, 2003; Dale *et al.*, 2014). Possivelmente, o aumento da expressão de BDNF, VEGF e EPO em decorrência da HCI pode também estar contribuindo para os efeitos cardioprotetores observados em nossos estudos. No entanto, estudos adicionais serão necessários para comprovarem essa hipótese.

Participação da inervação renal no pré-condicionamento promovido pela hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)

Como documentado em estudos anteriores, a manutenção da hipertensão durante a fase crônica do modelo 1R, 1C depende da integridade das aferências renais (Katholi *et al.*, 1981). A redução do fluxo sanguíneo causada pela clipagem da artéria renal é um forte estímulo para ativação de receptores quimiossensíveis situados em regiões estratégicas do parênquima renal (Ciriello and de Oliveira, 2002). Nesse sentido, estudos em gatos anestesiados mostraram que a estimulação elétrica dos nervos renais excita a maioria dos neurônios na região rostral ventrolateral do bulbo (Vizzard *et al.*, 1992), onde estão localizados os neurônios geradores da atividade simpática. Esses estudos destacam a importância da inervação renal para o desenvolvimento da hipertensão arterial, assim como indicam que o aumento da atividade simpática no modelo 1R, 1C parece depender da estimulação de áreas envolvidas na geração da atividade simpática por vias sensoriais de origem renal.

Com a finalidade de compreender a contribuição da inervação renal para o pré-condicionamento promovido pela HCI, observamos que a hipertensão decorrente do modelo 1R, 1C foi significativamente reduzida após a desnervação renal. Adicionalmente, o nível de pressão arterial foi semelhante entre os grupos controle seguido de cirurgia 1R, 1C com desnervação renal e hipóxia crônica intermitente seguida de cirurgia 1R, 1C com desnervação renal. Esses resultados nos permite concluir que a desnervação renal inibe o desenvolvimento da hipertensão arterial associado ao modelo 1R, 1C, e eliminou o efeito do pré-condicionamento promovido pela HCI. Como a desnervação renal remove tanto as fibras aferentes sensoriais como as

fibras eferentes simpáticas, não foi possível excluir a possibilidade de que uma maior atividade simpática renal poderia contribuir para esse resultado. No entanto, trabalhos de outros laboratórios já mostraram que a atividade simpática renal não está aumentada duas semanas após a instalação do modelo 1R, 1C (Katholi *et al.*, 1981).

Podemos sugerir que a redução parcial do fluxo sanguíneo que chega ao parênquima renal ativa mecano- e quimiorreceptores renais, estrategicamente localizados. Essa informação é, então, transmitida para áreas específicas envolvidas no controle da atividade simpática no sistema nervoso central via aferentes neurais (Vizzard *et al.*, 1992). A estimulação dessas áreas promove o aumento da resistência periférica e, conseqüentemente, da pressão arterial. Nos animais pré-condicionados à HCI, o mesmo estímulo proveniente das aferências renais leva a um menor aumento de pressão arterial, sugerindo que a HCI, nesse caso em particular, induz alterações de longa duração na rede neuronal envolvida no controle cardiovascular, atenuando o aumento de pressão observado no modelo de hipertensão 1R, 1C.

Participação dos quimiorreceptores periféricos no pré-condicionamento promovido pela hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 1 rim, 1 clipe (1R, 1C)

Está bem estabelecido na literatura o envolvimento do corpúsculo carotídeo nas alterações cardiovasculares e respiratórias relacionadas à HCI (Fletcher *et al.*, 1992; Iturriaga *et al.*, 2014; Nanduri *et al.*, 2012; Nanduri *et al.*, 2015). A HCI sensibiliza os quimiorreceptores periféricos à hipóxia, tornando suas aferências tonicamente ativas, mesmo quando a concentração de oxigênio no sangue arterial está dentro de níveis adequados, promovendo hiperatividade simpática (Prabhakar *et al.*, 2005; Wolk *et al.*, 2003). No entanto, estudos mostraram que neurônios localizados na superfície ventrolateral do bulbo podem responder diretamente à hipóxia, detectando mudanças na concentração de oxigênio circundante (Nolan and Waldrop, 1993; Reis *et al.*, 1994). Episódios de hipóxia aguda e crônica foram suficientes para promover aumento da expressão de RNA mensageiros para tirosina hidroxilase em neurônios C1 na superfície ventral do bulbo em animais sem corpúsculo carotídeo (Roux *et al.*, 2000). Dessa forma, podemos considerar a possibilidade da ação direta da HCI sobre grupos neuronais no sistema nervoso central. Portanto, nesse protocolo avaliamos o efeito da remoção do corpúsculo carotídeo sobre o pré-condicionamento promovido pela HCI sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial no modelo 1R, 1C.

Nossos resultados mostraram que na ausência das células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo, o efeito cardioprotetor promovido pela HCI não foi mais observado. Esses achados indicam que o mecanismo cardioprotetor da HCI é dependente das aferências periféricas do corpúsculo carotídeo. Por outro lado, durante a cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo, fibras aferentes do seio carotídeo podem

também terem sido danificadas, tendo em vista que não é possível remover seletivamente apenas as aferências do corpúsculo carotídeo. No entanto, a resposta do barorreflexo não foi alterada entre os grupos, o que exclui a possível participação dos barorreceptores no pré-condicionamento induzido pela HCI.

Por meio do bloqueio ganglionar com hexametônio mostramos que o aumento da atividade simpática decorrente do modelo 1R, 1C passa a ser similar entre os grupos submetidos à cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo seguida de controle em normóxia e posterior cirurgia 1R, 1C; e à cirurgia de remoção do corpúsculo carotídeo seguida de hipóxia crônica intermitente e posterior cirurgia 1R, 1C. Esse resultado evidencia que o pré-condicionamento promovido pela HCI ocorre via redução da atividade simpática. Sabemos que a HCI aumenta a atividade aferente do corpúsculo carotídeo (Prabhakar, 2011), e induz alterações plásticas em centros de controle cardiorrespiratório (Nanduri *et al.*, 2012). Possivelmente, o desenvolvimento da hipertensão arterial promovida pelo modelo 1R, 1C foi atenuado devido a menor responsividade de neurônios pré-motores simpáticos.

Possíveis centros neuronais que podem ter sido afetados pela HCI são: 1) a porção parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo; 2) grupos celulares noradrenérgicos A5 da ponte; e 3) rafe caudal. Em função de estudos anteriores do nosso laboratório podemos sugerir que a RVLM não está diretamente envolvida no pré-condicionamento à HCI, considerando que as propriedades intrínsecas dos neurônios pré-motores simpáticos dessa região não foram alteradas pela HCI (Almado *et al.*, 2014; Moraes *et al.*, 2013). Por outro lado, foi demonstrado que a exposição à HCI promove degeneração neuronal em diferentes áreas do sistema nervoso central envolvidas no

controle cardiovascular e respiratório (Goldbart *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2008), o que poderia explicar os resultados observados nesse estudo.

Sendo assim, nós podemos concluir que a HCI atenua o aumento de pressão arterial decorrente da instalação do modelo 1R, 1C. Esse efeito protetor da HCI depende da integridade do corpúsculo carotídeo, pois ele é eliminado em animais previamente desnervados. Portanto, a ativação dos quimiorreceptores periféricos durante a HCI, por mecanismo ainda não conhecido, previne o aumento da atividade simpática relacionado ao modelo 1R, 1C.

Efeitos do pré-condicionamento à hipóxia crônica intermitente (HCI) sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

Nesse protocolo avaliamos se a exposição à HCI poderia influenciar o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Como esperado, nossos resultados mostraram que os valores de pressão arterial foram superiores nos animais SHR em relação aos seus controles WKY. No entanto, o nível de hipertensão dos animais SHR não foi alterado pela exposição prévia à HCI. Já a pressão arterial dos animais WKY se manteve dentro de valores considerados normais, mesmo no grupo exposto à HCI. Devemos considerar que os registros das variáveis cardiovasculares aconteceram somente 26 dias após o término do protocolo de HCI. Em ratos Wistar, estudos do nosso laboratório mostraram que há reversão da hipertensão arterial dentro de 15 dias em normóxia (Zoccal *et al.*, 2009). Possivelmente o mesmo tenha ocorrido com os animais WKY, isto é, ainda que a HCI tenha elevado os níveis pressóricos agudamente, os mesmos retornaram para valores normotensos dentro de 4 semanas em condições de normóxia.

Independente da exposição à HCI no período pós-desmame, o desenvolvimento da hipertensão arterial foi similarmente elevado nos ratos SHR. Esses resultados são diferentes dos resultados obtidos no protocolo anterior, o qual mostrou a influência da HCI sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial no modelo renovascular 1R, 1C. Sabemos que diferentes áreas do sistema nervoso central estão envolvidas com a gênese da atividade simpática. Possivelmente, mecanismos neurais distintos desencadeiam a hiperatividade simpática, e conseqüentemente elevação da pressão arterial entre os modelos de ratos SHR e 1R, 1C.

As variáveis respiratórias após a HCI permaneceram dentro de valores considerados normais nos ratos WKY, assim como nos SHR. Isso mostra que nem o modelo SHR, nem a HCI promovem alterações nos parâmetros ventilatórios basais avaliados. Esses resultados corroboram com os encontrados em outros protocolos experimentais do nosso trabalho, descritos anteriormente.

Em determinadas situações de desafio fisiológico, a atividade respiratória pode ser regulada para níveis adequados por meio de alterações plásticas neuronais, visando assegurar o aporte de oxigênio para os tecidos. Esse fenômeno, conhecido como facilitação respiratória de longa duração, depende da liberação de serotonina por terminações axonais de regiões pontinas sobre núcleos motores do nervo frênico, localizados na região C4 da medula espinhal (Fuller *et al.*, 2001). Estudos mostraram que poucos episódios de hipóxia intermitente aguda são suficientes para promoverem a facilitação respiratória de longa duração (Feldman *et al.*, 2003; MacFarlane and Mitchell, 2008; Mahamed and Mitchell, 2007; Terada and Mitchell, 2011).

A facilitação respiratória de longa duração pode permanecer por até 1 hora após os episódios de hipóxia intermitente aguda, e depende da produção local de espécies reativas de oxigênio via NADPH oxidase. Essa teoria está fundamentada em estudos mostrando que a HCI regula a ativação da NADPH oxidase (Peng *et al.*, 2009), e que a injeção intratecal de agentes antioxidantes elimina a facilitação respiratória de longa duração induzida pela hipóxia intermitente aguda (MacFarlane and Mitchell, 2008). Adicionalmente, estudos recentes mostraram que a formação de espécies reativas de oxigênio pela NADPH oxidase medeia outros tipos de facilitação de longo prazo (Kishida *et al.*, 2006; Kishida and Klann, 2007).

Sabe-se que ciclos de hipóxia/reoxigenação tecidual é um potente estímulo para produção de espécies reativas de oxigênio (MacFarlane *et al.*, 2008; Prabhakar *et al.*, 2012; Wilkerson *et al.*, 2007). Durante a HM, os níveis de baixa FIO₂ são mantidos constantes, e os ciclos de hipóxia/reoxigenação característicos da HCI não são observados. Nessa condição de HM, a facilitação respiratória de longa duração normalmente não ocorre (Baker and Mitchell, 2000), mas pode ser revelada por meio da inibição farmacológica de proteínas fosfatases, reguladas negativamente durante a HCI (Wilkerson *et al.*, 2008). Nós realizamos o registro das variáveis respiratórias várias semanas após o término da HCI e, muito provavelmente, qualquer efeito da HCI sobre a respiração basal tanto de animais WKY quando de SHR foi revertido ao longo desse período.

A injeção de hexametônio, pelo antagonismo de receptores nicotínicos (N_N) nos gânglios autonômicos, mostrou que ambos os grupos de animais SHR apresentavam maior queda de pressão arterial em resposta ao bloqueio ganglionar. Esses experimentos corroboram com os estudos existentes na literatura, pois indicam que o mecanismo envolvido no aumento da pressão arterial nos animais SHR depende do aumento da atividade simpática (Simms *et al.*, 2009; Zicha and Kunes, 1999). Adicionalmente, a influência da atividade simpática sobre os valores de pressão arterial também não foi afetada pela exposição prévia à HCI.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que o pré-condicionamento com hipóxia pode promover respostas cardiovasculares diferentes, dependendo do desafio fisiológico enfrentado no futuro. Nossos resultados mostraram que o pré-condicionamento com a HCI, assim como com a HM não alterou as respostas cardiovasculares e respiratórias promovidas por uma segunda exposição à HCI.

A exposição prévia à HCI exerceu um efeito cardioprotetor em resposta ao aumento de pressão arterial promovido pelo modelo de hipertensão renal 1R, 1C. Esse efeito foi devido a uma inibição do tônus simpático vasoconstrictor. O procedimento de desnervação renal confirmou resultados de outros estudos, mostrando que a integridade da inervação renal é necessária para o desenvolvimento da hipertensão arterial no modelo 1R, 1C. Conseqüentemente, os efeitos protetores associados ao pré-condicionamento com HCI foram eliminados após o procedimento de desnervação renal. Adicionalmente, o nível de hipertensão arterial promovido pelo modelo 1R, 1C foi similar entre animais pré-condicionados com HCI e animais controle após a remoção do corpúsculo carotídeo.

O pré-condicionamento com HCI não alterou o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos SHR. O tônus simpático vasoconstrictor também não foi afetado pelo pré-condicionamento com HCI nesses animais.

8. REFERÊNCIAS

1. Aaron EA & Powell FL (1993). Effect of chronic hypoxia on hypoxic ventilatory response in awake rats. *J Appl Physiol* (1985) 74, 1635-40.
2. Abdala AP, McBryde FD, Marina N, Hendy EB, Engelman ZJ, Fudim M, Sobotka PA, Gourine AV & Paton JF (2012). Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. *J Physiol* 590, 4269-77.
3. Accorsi-Mendonca D, Castania JA, Bonagamba LG, Machado BH & Leao RM (2011). Synaptic profile of nucleus tractus solitarius neurons involved with the peripheral chemoreflex pathways. *Neuroscience* 197, 107-20.
4. Almado CE. Efeitos da hipóxia crônica intermitente sobre a neurotransmissão glutamatérgica no NTS e as propriedades intrínsecas dos neurônios retículo-espinhais respiratórios e pré-sinápticos da região ventral do bulbo de ratos. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2012.
5. Almado CE, Leao RM & Machado BH (2014). Intrinsic properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic and bulbospinal respiratory neurons of juvenile rats are not affected by chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol* 99, 937-50.
6. Angheben JM, Schoorlemmer GH, Rossi MV, Silva TA & Cravo SL (2014). Cardiovascular responses induced by obstructive apnea are enhanced in hypertensive rats due to enhanced chemoreceptor responsivity. *PLoS One* 9, e86868.
7. Ari H, Ari S, Yazici F, Koca V & Bozat T (2011). Cardiac autonomic function and cardiac arrhythmias in patients with obstructive sleep apnea. *Turk Kardiyol Dern Ars* 39, 292-9.
8. Baby BS, Aronow WS & Chandy D (2011). Therapeutic Options for Obstructive Sleep Apnea. *Am J Ther.*

9. Baker TL & Mitchell GS (2000). Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats. *J Physiol* 529 Pt 1, 215-9.
10. Barde YA, Edgar D & Thoenen H (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1, 549-53.
11. Bergamaschi CT, Silva NF, Pires JG, Campos RR & Neto HA (2014). Participation of 5-HT and AT1 Receptors within the Rostral Ventrolateral Medulla in the Maintenance of Hypertension in the Goldblatt 1 Kidney-1 Clip Model. *Int J Hypertens* 2014, 723939.
12. Braga VA, Soriano RN & Machado BH (2006). Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol* 91, 1025-31.
13. Braga VA, Zoccal DB, Soriano RN, Antunes VR, Paton JF, Machado BH & Nalivaiko E (2007). Activation of peripheral chemoreceptors causes positive inotropic effects in a working heart-brainstem preparation of the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 1156-9.
14. Brooks D, Horner RL, Kozar LF, Render-Teixeira CL & Phillipson EA (1997). Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model. *J Clin Invest* 99, 106-9.
15. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL & Semenza GL (2003). Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108, 79-85.
16. Chen L, Einbinder E, Zhang Q, Hasday J, Balke CW & Scharf SM (2005). Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 915-20.

17. Ciriello J & de Oliveira CV (2002). Renal afferents and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 4, 136-42.
18. Cravo SL, Morrison SF & Reis DJ (1991). Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla. *Am J Physiol* 261, R985-94.
19. Dale EA, Ben Mabrouk F & Mitchell GS (2014). Unexpected benefits of intermittent hypoxia: enhanced respiratory and nonrespiratory motor function. *Physiology (Bethesda)* 29, 39-48.
20. Dampney RA & Moon EA (1980). Role of ventrolateral medulla in vasomotor response to cerebral ischemia. *Am J Physiol* 239, H349-58.
21. Davis JO, Freeman RH, Johnson JA & Spielman WS (1974). Agents which block the action of the renin-angiotensin system. *Circ Res* 34, 279-85.
22. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ & O'Donnell CP (2010). Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev* 90, 47-112.
23. DiBona GF & Rios LL (1980). Renal nerves in compensatory renal response to contralateral renal denervation. *Am J Physiol* 238, F26-30.
24. Drorbaugh JE & Fenn WO (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16, 81-7.
25. Easton J & Howe A (1983). The distribution of thoracic glomus tissue (aortic bodies) in the rat. *Cell Tissue Res* 232, 349-56.
26. Eden GJ & Hanson MA (1987). Effects of chronic hypoxia from birth on the ventilatory response to acute hypoxia in the newborn rat. *J Physiol* 392, 11-9.
27. Evans AM (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of Ca²⁺ signalling in O₂-sensing cells. *J Physiol* 574, 113-23.

28. Evans AM, Hardie DG, Peers C, Wyatt CN, Viollet B, Kumar P, Dallas ML, Ross F, Ikematsu N, Jordan HL, Barr BL, Rafferty JN & Ogunbayo O (2009). Ion channel regulation by AMPK: the route of hypoxia-response coupling in the carotid body and pulmonary artery. *Ann N Y Acad Sci* 1177, 89-100.
29. Evans AM, Mustard KJ, Wyatt CN, Peers C, Dipp M, Kumar P, Kinnear NP & Hardie DG (2005). Does AMP-activated protein kinase couple inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by hypoxia to calcium signaling in O₂-sensing cells? *J Biol Chem* 280, 41504-11.
30. Feldman JL, Mitchell GS & Nattie EE (2003). Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 26, 239-66.
31. Fletcher EC, Lesske J, Behm R, Miller CC, 3rd, Stauss H & Unger T (1992). Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *J Appl Physiol* 72, 1978-84.
32. Fletcher EC, Lesske J, Culman J, Miller CC & Unger T (1992). Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation in episodic hypoxia. *Hypertension* 20, 612-9.
33. Fuller DD, Zabka AG, Baker TL & Mitchell GS (2001). Phrenic long-term facilitation requires 5-HT receptor activation during but not following episodic hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 90, 2001-6; discussion 0.
34. Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G & Kinkead R (2004). Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *J Physiol* 554, 543-57.

35. Geraldles V, Goncalves-Rosa N, Liu B, Paton JF & Rocha I (2013). Chronic depression of hypothalamic paraventricular neuronal activity produces sustained hypotension in hypertensive rats. *Exp Physiol*.
36. Goldbart A, Row BW, Kheirandish L, Schurr A, Gozal E, Guo SZ, Payne RS, Cheng Z, Brittan KR & Gozal D (2003). Intermittent hypoxic exposure during light phase induces changes in cAMP response element binding protein activity in the rat CA1 hippocampal region: water maze performance correlates. *Neuroscience* 122, 585-90.
37. Greenberg HE, Sica A, Batson D & Scharf SM (1999). Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol* (1985) 86, 298-305.
38. Guertzenstein PG & Silver A (1974). Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J Physiol* 242, 489-503.
39. Guilleminault C (1987). Obstructive sleep apnea syndrome. A review. *Psychiatr Clin North Am* 10, 607-21.
40. Guyenet PG (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7, 335-46.
41. Guyenet PG, Haselton JR & Sun MK (1989). Sympathoexcitatory neurons of the rostroventrolateral medulla and the origin of the sympathetic vasomotor tone. *Prog Brain Res* 81, 105-16.
42. Heymans C & Bouckaert JJ (1930). Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. *J Physiol* 69, 254-66.

43. Hou S, Heinemann SH & Hoshi T (2009). Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules. *Physiology (Bethesda)* 24, 26-35.
44. Iturriaga R, Andrade DC & Del Rio R (2014). Enhanced carotid body chemosensory activity and the cardiovascular alterations induced by intermittent hypoxia. *Front Physiol* 5, 468.
45. Jansen AS & Loewy AD (1997). Neurons lying in the white matter of the upper cervical spinal cord project to the intermediolateral cell column. *Neuroscience* 77, 889-98.
46. Japundzic N, Grichois ML, Zitoun P, Laude D & Elghozi JL (1990). Spectral analysis of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of autonomic blockers. *J Auton Nerv Syst* 30, 91-100.
47. Jiang X, Zhu D, Okagaki P, Lipsky R, Wu X, Banaudha K, Mearow K, Strauss KI & Marini AM (2003). N-methyl-D-aspartate and TrkB receptor activation in cerebellar granule cells: an in vitro model of preconditioning to stimulate intrinsic survival pathways in neurons. *Ann N Y Acad Sci* 993, 134-45; discussion 59-60.
48. Jordan AS, McSharry DG & Malhotra A (2014). Adult obstructive sleep apnoea. *Lancet* 383, 736-47.
49. Kanagy NL, Walker BR & Nelin LD (2001). Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 37, 511-5.
50. Kasai T & Bradley TD (2011). Obstructive sleep apnea and heart failure: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Am Coll Cardiol* 57, 119-27.
51. Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F & Sato T (2009). Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of

opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect. *J Thorac Cardiovasc Surg* 137, 223-31.

52. Katholi RE, Winternitz SR & Oparil S (1982). Decrease in peripheral sympathetic nervous system activity following renal denervation or unclipping in the one-kidney one-clip Goldblatt hypertensive rat. *J Clin Invest* 69, 55-62.

53. Katholi RE, Winternitz SR & Oparil S (1981). Role of the renal nerves in the pathogenesis of one-kidney renal hypertension in the rat. *Hypertension* 3, 404-9.

54. Kinkead R, Montandon G, Bairam A, Lajeunesse Y & Horner R (2009). Neonatal maternal separation disrupts regulation of sleep and breathing in adult male rats. *Sleep* 32, 1611-20.

55. Kishida KT, Hoeffler CA, Hu D, Pao M, Holland SM & Klann E (2006). Synaptic plasticity deficits and mild memory impairments in mouse models of chronic granulomatous disease. *Mol Cell Biol* 26, 5908-20.

56. Kishida KT & Klann E (2007). Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 9, 233-44.

57. Kumar GK, Rai V, Sharma SD, Ramakrishnan DP, Peng YJ, Souvannakitti D & Prabhakar NR (2006). Chronic intermittent hypoxia induces hypoxia-evoked catecholamine efflux in adult rat adrenal medulla via oxidative stress. *J Physiol* 575, 229-39.

58. Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL & Prabhakar NR (2006). Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biol* 91, 249-86.

59. Lai CJ, Yang CC, Hsu YY, Lin YN & Kuo TB (2006). Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats. *J Appl Physiol* (1985) 100, 1974-82.

60. Lesske J, Fletcher EC, Bao G & Unger T (1997). Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system. *J Hypertens* 15, 1593-603.
61. Logan SD, Pickering AE, Gibson IC, Nolan MF & Spanswick D (1996). Electrotonic coupling between rat sympathetic preganglionic neurones in vitro. *J Physiol* 495 (Pt 2), 491-502.
62. Ludka O, Konecny T & Somers V (2011). Sleep apnea, cardiac arrhythmias, and sudden death. *Tex Heart Inst J* 38, 340-3.
63. Lurie A (2011). Obstructive sleep apnea in adults: epidemiology, clinical presentation, and treatment options. *Adv Cardiol* 46, 1-42.
64. MacFarlane PM & Mitchell GS (2008). Respiratory long-term facilitation following intermittent hypoxia requires reactive oxygen species formation. *Neuroscience* 152, 189-97.
65. MacFarlane PM, Wilkerson JE, Lovett-Barr MR & Mitchell GS (2008). Reactive oxygen species and respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 164, 263-71.
66. Machado BH (2001). Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Ann N Y Acad Sci* 940, 179-96.
67. Machado BH & Salgado HC (1991). Tachycardia during reversal of one-kidney, one-clip hypertension in conscious rats. *Am J Hypertens* 4, 60-3.
68. Mahamed S & Mitchell GS (2007). Is there a link between intermittent hypoxia-induced respiratory plasticity and obstructive sleep apnoea? *Exp Physiol* 92, 27-37.

69. Malliani A, Pagani M, Lombardi F & Cerutti S (1991). Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84, 482-92.
70. Marcus NJ, Li YL, Bird CE, Schultz HD & Morgan BJ (2010). Chronic intermittent hypoxia augments chemoreflex control of sympathetic activity: role of the angiotensin II type 1 receptor. *Respir Physiol Neurobiol* 171, 36-45.
71. Marcus NJ, Philippi NR, Bird CE, Li YL, Schultz HD & Morgan BJ (2012). Effect of AT1 receptor blockade on intermittent hypoxia-induced endothelial dysfunction. *Respir Physiol Neurobiol* 183, 67-74.
72. Marini AM, Jiang X, Wu X, Tian F, Zhu D, Okagaki P & Lipsky RH (2004). Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restor Neurol Neurosci* 22, 121-30.
73. Marini AM, Rabin SJ, Lipsky RH & Mocchetti I (1998). Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate. *J Biol Chem* 273, 29394-9.
74. Martinez EZ & Achcar JA (2014). Trends in epidemiology in the 21st century: time to adopt Bayesian methods. *Cad Saude Publica* 30, 703-14.
75. Mayer CA, Ao J, Di Fiore JM, Martin RJ & MacFarlane PM (2013). Impaired hypoxic ventilatory response following neonatal sustained and subsequent chronic intermittent hypoxia in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 187, 167-75.
76. Mayer CA, Wilson CG & MacFarlane PM (2015). Changes in carotid body and nTS neuronal excitability following neonatal sustained and chronic intermittent hypoxia exposure. *Respir Physiol Neurobiol* 205, 28-36.

77. McGuire M, Zhang Y, White DP & Ling L (2003). Chronic intermittent hypoxia enhances ventilatory long-term facilitation in awake rats. *J Appl Physiol* (1985) 95, 1499-508.
78. Menani JV, Machado BH, Krieger EM & Salgado HC (1988). Tachycardia during the onset of one-kidney, one-clip renal hypertension: role of the renin-angiotensin system and AV3V tissue. *Brain Res* 446, 295-302.
79. Mifflin SW (1992). Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol* 263, R368-75.
80. Montano N, Ruscone TG, Porta A, Lombardi F, Pagani M & Malliani A (1994). Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation* 90, 1826-31.
81. Moraes DJ, da Silva MP, Bonagamba LG, Mecawi AS, Zoccal DB, Antunes-Rodrigues J, Varanda WA & Machado BH (2013). Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory network in rats. *J Neurosci* 33, 19223-37.
82. Mortola JP, Morgan CA & Virgona V (1986). Respiratory adaptation to chronic hypoxia in newborn rats. *J Appl Physiol* (1985) 61, 1329-36.
83. Murphy WR, Coleman TG, Smith TL & Stanek KA (1984). Effects of graded renal artery constriction on blood pressure, renal artery pressure, and plasma renin activity in Goldblatt hypertension. *Hypertension* 6, 68-74.
84. Nanduri J, Makarenko V, Reddy VD, Yuan G, Pawar A, Wang N, Khan SA, Zhang X, Kinsman B, Peng YJ, Kumar GK, Fox AP, Godley LA, Semenza GL & Prabhakar NR (2012). Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2515-20.

85. Nanduri J, Peng YJ, Yuan G, Kumar GK & Prabhakar NR (2015). Hypoxia-inducible factors and hypertension: lessons from sleep apnea syndrome. *J Mol Med (Berl)*.
86. Nolan PC & Waldrop TG (1993). In vivo and in vitro responses of neurons in the ventrolateral medulla to hypoxia. *Brain Res* 630, 101-14.
87. Nurse CA (2005). Neurotransmission and neuromodulation in the chemosensory carotid body. *Auton Neurosci* 120, 1-9.
88. Okamoto K & Aoki K (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27, 282-93.
89. Olea E, Gaytan SP, Obeso A, Gonzalez C & Pasaro R (2012). Interactions between postnatal sustained hypoxia and intermittent hypoxia in the adulthood to alter brainstem structures and respiratory function. *Adv Exp Med Biol* 758, 225-31.
90. Pals DT, Masucci FD, Denning GS, Jr., Sipos F & Fessler DC (1971). Role of the pressor action of angiotensin II in experimental hypertension. *Circ Res* 29, 673-81.
91. Pawar A, Peng YJ, Jacono FJ & Prabhakar NR (2008). Comparative analysis of neonatal and adult rat carotid body responses to chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 104, 1287-94.
92. Pedrosa RP, Drager LF, Gonzaga CC, Sousa MG, de Paula LK, Amaro AC, Amodeo C, Bortolotto LA, Krieger EM, Bradley TD & Lorenzi-Filho G (2011). Obstructive sleep apnea: the most common secondary cause of hypertension associated with resistant hypertension. *Hypertension* 58, 811-7.
93. Peers C, Wyatt CN & Evans AM (2010). Mechanisms for acute oxygen sensing in the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* 174, 292-8.

94. Peng Y, Yuan G, Overholt JL, Kumar GK & Prabhakar NR (2003). Systemic and cellular responses to intermittent hypoxia: evidence for oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Adv Exp Med Biol* 536, 559-64.
95. Peng YJ, Nanduri J, Yuan G, Wang N, Deneris E, Pendyala S, Natarajan V, Kumar GK & Prabhakar NR (2009). NADPH oxidase is required for the sensory plasticity of the carotid body by chronic intermittent hypoxia. *J Neurosci* 29, 4903-10.
96. Peng YJ, Nanduri J, Zhang X, Wang N, Raghuraman G, Seagard J, Kumar GK & Prabhakar NR (2012). Endothelin-1 mediates attenuated carotid baroreceptor activity by intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 112, 187-96.
97. Peng YJ, Overholt JL, Kline D, Kumar GK & Prabhakar NR (2003). Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10073-8.
98. Peng YJ, Yuan G, Ramakrishnan D, Sharma SD, Bosch-Marce M, Kumar GK, Semenza GL & Prabhakar NR (2006). Heterozygous HIF-1alpha deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol* 577, 705-16.
99. Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW & Hla KM (2013). Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol* 177, 1006-14.
100. Prabhakar NR (2011). Sensory plasticity of the carotid body: role of reactive oxygen species and physiological significance. *Respir Physiol Neurobiol* 178, 375-80.
101. Prabhakar NR & Kumar GK (2010). Mechanisms of sympathetic activation and blood pressure elevation by intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 174, 156-61.

102. Prabhakar NR, Kumar GK & Peng YJ (2012). Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 113, 1304-10.
103. Prabhakar NR, Peng YJ, Jacono FJ, Kumar GK & Dick TE (2005). Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32, 447-9.
104. Pronzato C (2010). Chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea. Association, consequences and treatment. *Monaldi Arch Chest Dis* 73, 155-61.
105. Przybylski J (1981). Do arterial chemoreceptors play a role in the pathogenesis of hypertension? *Med Hypotheses* 7, 127-31.
106. Randby A, Namtvedt SK, Einvik G, Hrubos-Strom H, Hagve TA, Somers VK & Omland T (2012). Obstructive Sleep Apnea is Associated with Increased High-Sensitivity Cardiac Troponin T Levels. *Chest* 142, 639-46.
107. Redington KL, Disenhouse T, Strantzas SC, Gladstone R, Wei C, Tropak MB, Dai X, Manlhiot C, Li J & Redington AN (2012). Remote cardioprotection by direct peripheral nerve stimulation and topical capsaicin is mediated by circulating humoral factors. *Basic Res Cardiol* 107, 1-10.
108. Reeves SR, Gozal E, Guo SZ, Sachleben LR, Jr., Brittian KR, Lipton AJ & Gozal D (2003). Effect of long-term intermittent and sustained hypoxia on hypoxic ventilatory and metabolic responses in the adult rat. *J Appl Physiol* (1985) 95, 1767-74.
109. Reeves SR, Mitchell GS & Gozal D (2006). Early postnatal chronic intermittent hypoxia modifies hypoxic respiratory responses and long-term phrenic facilitation in adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R1664-71.

110. Reis DJ, Golanov EV, Ruggiero DA & Sun MK (1994). Sympatho-excitatory neurons of the rostral ventrolateral medulla are oxygen sensors and essential elements in the tonic and reflex control of the systemic and cerebral circulations. *J Hypertens Suppl* 12, S159-80.
111. Ross B, McIntosh M, Rodaros D, Hebert TE & Rohlicek CV (2010). Systemic arterial pressure at maturity in rats following chronic hypoxia in early life. *Am J Hypertens* 23, 1228-33.
112. Ross CA, Ruggiero DA, Park DH, Joh TH, Sved AF, Fernandez-Pardal J, Saavedra JM & Reis DJ (1984). Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. *J Neurosci* 4, 474-94.
113. Roux JC, Pequignot JM, Dumas S, Pascual O, Ghilini G, Pequignot J, Mallet J & Denavit-Saubie M (2000). O₂-sensing after carotid chemodenervation: hypoxic ventilatory responsiveness and upregulation of tyrosine hydroxylase mRNA in brainstem catecholaminergic cells. *Eur J Neurosci* 12, 3181-90.
114. Salgado HC & Machado BH (1990). Baroreceptor resetting facilitates the onset of one-kidney, one clip hypertension. *Braz J Med Biol Res* 23, 1165-70.
115. Sawyer AM, Gooneratne NS, Marcus CL, Ofer D, Richards KC & Weaver TE (2011). A systematic review of CPAP adherence across age groups: clinical and empiric insights for developing CPAP adherence interventions. *Sleep Med Rev* 15, 343-56.
116. Semenza GL (2011). Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 365, 537-47.

117. Serebrovskaya TV, Manukhina EB, Smith ML, Downey HF & Mallet RT (2008). Intermittent hypoxia: cause of or therapy for systemic hypertension? *Exp Biol Med* (Maywood) 233, 627-50.
118. Shatilo VB, Korkushko OV, Ischuk VA, Downey HF & Serebrovskaya TV (2008). Effects of intermittent hypoxia training on exercise performance, hemodynamics, and ventilation in healthy senior men. *High Alt Med Biol* 9, 43-52.
119. Simms AE, Paton JF, Allen AM & Pickering AE (2010). Is augmented central respiratory-sympathetic coupling involved in the generation of hypertension? *Respir Physiol Neurobiol* 174, 89-97.
120. Simms AE, Paton JF, Pickering AE & Allen AM (2009). Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? *J Physiol* 587, 597-610.
121. Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW & Feldman JL (1991). Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254, 726-9.
122. Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, Daniels S, Floras JS, Hunt CE, Olson LJ, Pickering TG, Russell R, Woo M & Young T (2008). Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation* 118, 1080-111.

123. Soukhova-O'Hare GK, Ortines RV, Gu Y, Nozdrachev AD, Prabhu SD & Gozal D (2008). Postnatal intermittent hypoxia and developmental programming of hypertension in spontaneously hypertensive rats: the role of reactive oxygen species and L-Ca²⁺ channels. *Hypertension* 52, 156-62.
124. Souvannakitti D, Kumar GK, Fox A & Prabhakar NR (2009). Neonatal intermittent hypoxia leads to long-lasting facilitation of acute hypoxia-evoked catecholamine secretion from rat chromaffin cells. *J Neurophysiol* 101, 2837-46.
125. Souza GM, Bonagamba LG, Amorim MR, Moraes DJ & Machado BH (2015). Cardiovascular and respiratory responses to chronic intermittent hypoxia in adult female rats. *Exp Physiol* 100, 249-58.
126. Sterni LM, Bamford OS, Wasicko MJ & Carroll JL (1999). Chronic hypoxia abolished the postnatal increase in carotid body type I cell sensitivity to hypoxia. *Am J Physiol* 277, L645-52.
127. Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB & Loewy AD (1989). A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Res* 491, 156-62.
128. Tabakman R, Lecht S, Sephanova S, Arien-Zakay H & Lazarovici P (2004). Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury. *Prog Brain Res* 146, 387-401.
129. Tahawi Z, Orolinova N, Joshua IG, Bader M & Fletcher EC (2001). Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats. *J Appl Physiol* (1985) 90, 2007-13; discussion 0.

130. Terada J & Mitchell GS (2011). Diaphragm long-term facilitation following acute intermittent hypoxia during wakefulness and sleep. *J Appl Physiol* (1985) 110, 1299-310.
131. Thomas L, Gasser B, Bousquet P & Monassier L (2003). Hemodynamic and cardiac anti-hypertrophic actions of clonidine in Goldblatt one-kidney, one-clip rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 41, 203-9.
132. Toney GM, Pedrino GR, Fink GD & Osborn JW (2010). Does enhanced respiratory-sympathetic coupling contribute to peripheral neural mechanisms of angiotensin II-salt hypertension? *Exp Physiol* 95, 587-94.
133. Urena J, Fernandez-Chacon R, Benot AR, Alvarez de Toledo GA & Lopez-Barneo J (1994). Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10208-11.
134. Vizzard MA, Standish A & Ammons WS (1992). Renal afferent input to the ventrolateral medulla of the cat. *Am J Physiol* 263, R412-22.
135. Walton M, Connor B, Lawlor P, Young D, Sirimanne E, Gluckman P, Cole G & Dragunow M (1999). Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Res Brain Res Rev* 29, 137-68.
136. Wilkerson JE, Macfarlane PM, Hoffman MS & Mitchell GS (2007). Respiratory plasticity following intermittent hypoxia: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 35, 1269-72.
137. Wilkerson JE, Satriotomo I, Baker-Herman TL, Watters JJ & Mitchell GS (2008). Okadaic acid-sensitive protein phosphatases constrain phrenic long-term facilitation after sustained hypoxia. *J Neurosci* 28, 2949-58.

138. Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C & Kemp PJ (2004). Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* 306, 2093-7.
139. Wolk R, Shamsuzzaman AS & Somers VK (2003). Obesity, sleep apnea, and hypertension. *Hypertension* 42, 1067-74.
140. Wyatt CN, Mustard KJ, Pearson SA, Dallas ML, Atkinson L, Kumar P, Peers C, Hardie DG & Evans AM (2007). AMP-activated protein kinase mediates carotid body excitation by hypoxia. *J Biol Chem* 282, 8092-8.
141. Yan B, Li L, Harden SW, Gozal D, Lin Y, Wead WB, Wurster RD & Cheng ZJ (2009). Chronic intermittent hypoxia impairs heart rate responses to AMPA and NMDA and induces loss of glutamate receptor neurons in nucleus ambiguus of F344 rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R299-308.
142. Yan B, Soukhova-O'Hare GK, Li L, Lin Y, Gozal D, Wead WB, Wurster RD & Cheng ZJ (2008). Attenuation of heart rate control and neural degeneration in nucleus ambiguus following chronic intermittent hypoxia in young adult Fischer 344 rats. *Neuroscience* 153, 709-20.
143. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S & Badr S (1993). The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 328, 1230-5.
144. Young T, Peppard PE & Gottlieb DJ (2002). Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 1217-39.
145. Zicha J & Kunes J (1999). Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev* 79, 1227-82.

146. Zoccal DB, Bonagamba LG, Oliveira FR, Antunes-Rodrigues J & Machado BH (2007). Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol* 92, 79-85.
147. Zoccal DB, Bonagamba LG, Paton JF & Machado BH (2009). Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Exp Physiol* 94, 972-83.
148. Zoccal DB, Furuya WI, Bassi M, Colombari DS & Colombari E (2014). The nucleus of the solitary tract and the coordination of respiratory and sympathetic activities. *Front Physiol* 5, 238.
149. Zoccal DB, Paton JF & Machado BH (2009). Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36, 1188-96.
150. Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF & Machado BH (2008). Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol* 586, 3253-65.

