**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Fisiologia**

**PAPEL DOS QUIMIORRECEPTORES CAROTÍDEOS NAS
RESPOSTAS HEMODINÂMICAS E RESPIRATÓRIAS À
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO SEIO CAROTÍDEO/NERVO
DO SEIO CAROTÍDEO**

PEDRO LOURENÇO KATAYAMA

**Ribeirão Preto
2018**

PEDRO LOURENÇO KATAYAMA

PAPEL DOS QUIMIORRECEPTORES CAROTÍDEOS NAS
RESPOSTAS HEMODINÂMICAS E RESPIRATÓRIAS À
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO SEIO CAROTÍDEO/NERVO
DO SEIO CAROTÍDEO

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

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Helio Cesar Salgado

Ribeirão Preto

2018

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.

Katayama, Pedro Lourenço

Papel dos quimiorreceptores carotídeos nas respostas hemodinâmicas e respiratórias à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo. Ribeirão Preto, 2018.

169 p.: il., 30 cm

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

Orientador: Salgado, Helio, Cesar

1. Barorreflexo, 2. Quimiorreflexo, 3. Terapia de ativação barorreflexa, 4. Hipertensão arterial, 5. Respiração, 6. ATP.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Pedro Lourenço Katayama

Título: Papel dos quimiorreceptores carotídeos nas respostas hemodinâmicas e respiratórias à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora:

Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

Instituição: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcus Vinicius Simões

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Helio Cesar Salgado (Orientador)

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura: _____

***Dedico esta tese aos meus pais,
Aparecida (in memoriam) e Yuji pelo
amor incondicional e pelo incentivo e
apoio imensuráveis.***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dr. Helio Cesar Salgado pela acolhida em seu laboratório, ensinamentos e oportunidades concedidas.

Ao Professor Dr. Rubens Fazan Junior pelo apoio e contribuições essenciais para o desenvolvimento desta tese.

Ao Professor Dr. Julian Paton pela supervisão e ensinamentos durante a realização de meu estágio de doutorado sanduíche.

Ao Jaci Castania não somente pela colaboração fundamental na realização deste trabalho, mas, também, pelos conselhos e amizade.

À Florence pelo amor, amizade, incentivo e compreensão ao longo destes anos. Obrigado por estar sempre ao meu lado.

Ao meu irmão Henrique pela amizade e apoio.

À minha família, em especial aos meus tios Sidney, Setsuko, Gleides e Paulo por todo o carinho e suporte.

Aos amigos Bernardo Fernandes, Diego Franchi, Fernanda Chaem e Victor Rodrigues Santos pela amizade e excelentes momentos.

Aos docentes do curso de pós-graduação em Fisiologia, pelos ensinamentos e contribuição para minha formação.

Aos técnicos do laboratório, Carlos Alberto Aguiar da Silva e Mauro de Oliveira pela disponibilidade e ensinamentos.

Aos amigos de laboratório, Daniel, Luiz, Renata, João Paulo, Fernanda Brognara, Ana Carolina, Fernanda Rodrigues e Fábio, pela amizade e apoio.

Aos queridos funcionários da secretaria Claudia, Elisa, Fernando e Igor pelo suporte.

Ao técnico de biotério Leonardo Fidelis Filho, pelo cuidado com os animais.

A todos os amigos do departamento de Fisiologia.

**Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP) processos nº 2015/18511-7 e nº 2016/02184-0, da
CAPES e do CNPq**

RESUMO

KATAYAMA, P. L. **Papel dos quimiorreceptores carotídeos nas respostas hemodinâmicas e respiratórias à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo.** 169 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A hipertensão arterial (HA) é um dos fatores de risco mais importantes para a ocorrência de eventos cardíacos e cerebrovasculares, além de estar associada ao desenvolvimento de doenças renais e metabólicas. Recentemente, novas abordagens têm sido utilizadas no tratamento da HA, especialmente em pacientes hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico. Dentre tais abordagens, destaca-se a terapia de ativação barorreflexa (TAB), a qual, por meio de um dispositivo eletrônico cirurgicamente implantável, estimulam-se os barorreceptores carotídeos, causando inibição da atividade simpática e resultando em redução da pressão arterial (PA). Embora os resultados de estudos clínicos utilizando a TAB em pacientes hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico sejam promissores, é necessário um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesta abordagem. Pela proximidade anatômica dos barorreceptores e dos quimiorreceptores carotídeos, bem como de suas respectivas aferências, a TAB poderia estar ativando não somente o barorreflexo, mas, também o quimiorreflexo carotídeo. Nesse sentido, um dos objetivos do presente estudo foi o de avaliar o papel dos quimiorreceptores carotídeos nas respostas hemodinâmicas e respiratórias provocadas pela estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (ESC) em ratos acordados. Ratos *Wistar* adultos jovens foram divididos em 4 grupos experimentais: Controle (CONT); Ratos com inativação dos quimiorreceptores carotídeos (QUIMIO-X); Ratos com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X) e ratos com inativação simultânea de baro- e quimiorreceptores carotídeos (TOTAL-X). As inativações seletivas foram realizadas cirurgicamente. Os ratos pertencentes aos 4 grupos foram instrumentados com um eletrodo bipolar no seio carotídeo/nervo do seio carotídeo esquerdo, e cateteres na artéria e veia femorais para registro da PA e administração de drogas, respectivamente. Os animais foram submetidos à ESC (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequências: 15, 30, 60 e 90 Hz; Duração do estímulo: 20 s). Os resultados mostraram que a ESC causou significativa resposta hipotensora nos ratos do grupo

CONT. O efeito hipotensor da ESC foi maior em animais do grupo QUIMIO-X, indicando que os quimiorreceptores carotídeos foram ativados no grupo CONT, atenuando a resposta hipotensora. O grupo BARO-X apresentou respostas hipertensoras, denotando ativação exclusiva dos quimiorreceptores carotídeos. Em relação às respostas da frequência cardíaca (FC) à ESC, o grupo CONT não apresentou alterações da mesma, enquanto que os grupos QUIMIO-X e BARO-X apresentaram significativa bradicardia. O grupo TOTAL-X não apresentou nenhuma alteração hemodinâmica (PA e FC) durante a ESC. Adicionalmente, as respostas respiratórias (frequência respiratória, f_R ; volume corrente, V_T ; e ventilação minuto, V_E) à ESC (Intensidade: 3 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequências: 15, 30, 60 e 90 Hz; Duração do estímulo: 20 s), foram avaliadas em animais dos grupos CONT e QUIMIO-X. A ESC causou aumento da ventilação no grupo CONT, evidenciado por aumentos significativos da f_R , V_T e V_E . O aumento da ventilação observado durante a ESC foi substancialmente atenuado pela inativação dos quimiorreceptores carotídeos (QUIMIO-X). No sentido de se investigar formas para modulação da atividade dos quimiorreceptores carotídeos, no presente estudo foram avaliados, também, os efeitos do antagonismo de receptores P2X3 sobre a respiração, sensibilidade do quimiorreflexo periférico e ocorrência de apneias em ratos recém-nascidos. Os resultados mostraram que o antagonismo agudo de receptores P2X3 não afetou a respiração basal, mas reduziu a sensibilidade do quimiorreflexo periférico e a ocorrência de apneia. Em conjunto, os resultados do presente estudo mostram que os quimiorreceptores carotídeos influenciam as respostas hemodinâmicas e respiratórias à ESC em ratos acordados. Adicionalmente, o antagonismo de receptores P2X3 pode modular a atividade dos quimiorreceptores carotídeos, reduzindo a sua sensibilidade sem afetar a respiração basal, além de reduzir a ocorrência de apneia em ratos recém-nascidos.

Palavras-chave: Barorreflexo; Quimiorreflexo; Terapia de ativação barorreflexa; Hipertensão arterial; Respiração; ATP.

ABSTRACT

KATAYAMA, P. L. **Role of carotid chemoreceptors in hemodynamic and respiratory responses to electrical stimulation of the carotid sinus/carotid sinus nerve.** 169 p. Thesis (Ph.D.) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Hypertension is one of the main risk factors for heart and cerebrovascular diseases, and also, is related to renal and metabolic disorders. Recently, new approaches have been used to treat hypertension, especially in hypertensive patients resistant to pharmacological treatment. Among these approaches, the baroreflex activation therapy (BAT) can be highlighted. BAT consists in the electrical stimulation of the carotid baroreceptors, inhibiting the sympathetic activity and resulting in blood pressure reduction. Although results from clinical trials have been promising, studies of the mechanisms involved in BAT are still needed. Because of the anatomic proximity between carotid baroreceptors and chemoreceptors, BAT could activate not only the baroreflex but also the carotid chemoreflex. Thus, part of this study was designed to evaluate the role of carotid chemoreceptors in the hemodynamic and respiratory responses to electrical stimulation of the carotid sinus/carotid sinus nerve (ESC) in conscious rats. Male adult *Wistar* rats were divided into 4 experimental groups: Control (CONT), Rats with deactivation of carotid chemoreceptors (CHEMO-X); Rats with removal of carotid baroreceptors (BARO-X); and Rats with simultaneous carotid baro- and chemoreceptors deactivation (TOTAL-X). Selective deactivations were surgically performed. In addition, all rats were instrumented with a bipolar electrode in the left carotid sinus/carotid sinus nerve and femoral artery and vein catheterization to blood pressure (BP) recordings and drug administration, respectively. Animals were subjected to ESC (Intensity: 5V; Pulse width: 1 ms; Frequencies: 15, 30, 60 e 90 Hz, stimulus duration: 20 s). Results showed that ESC caused significant hypotensive response in CONT. The hypotensive effect of ESC was greater in CHEMO-X group, indicating that carotid chemoreceptors were activated in CONT, attenuating the hypotensive response. BARO-X group presented hypertensive responses to ESC, indicating full activation of the carotid chemoreceptors. Regarding heart rate (HR), CONT showed no response, whereas CHEMO-X and BARO-X presented a marked bradycardia. TOTAL-X group did not showed any hemodynamic (BP and HR) response to ESC. Moreover, the respiratory

responses (Respiratory rate, f_R ; tidal volume, V_T ; and minute ventilation V_E) to ESC (Intensity: 3V; Pulse width: 1 ms; Frequencies: 15, 30, 60 e 90 Hz, stimulus duration: 20 s), were analysed in CONT and CHEMO-X animals. ESC significantly increased ventilation in CONT, increasing f_R , V_T e V_E . These respiratory responses elicited by ESC were blunted by carotid chemoreceptors deactivation (CHEMO-X). In order to investigate methods for carotid chemoreceptors modulation, the present study also examined the P2X3 antagonism effects on the respiration, peripheral chemoreflex sensitivity and apnoea occurrence in newborn rats. The results showed that acute P2X3 antagonism did not affected basal respiration but reduced peripheral chemoreflex sensitivity and apnoea occurrence. Taken together, results from the present study show that the carotid chemoreceptors impact hemodynamic and respiratory responses to ESC in conscious rats. Moreover, P2X3 antagonism may be used to modulate carotid chemoreceptors activity, inhibiting its sensitivity without effects over baseline respiration, and also to reduce apnoea occurrence in newborn rats.

Key-words: Baroreflex; Chemoreflex; Baroreflex activation therapy; Hypertension; Respiration; ATP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Posicionamento dos eletrodos nas bifurcações da carótida e gerador de pulsos elétricos do sistema Rheos. A: Desenho esquemático mostrando o posicionamento dos eletrodos ao redor das bifurcações carotídeas e, também, o gerador de pulsos elétricos, o qual é implantado subcutaneamente na região subclávia do paciente. B: Imagem radiográfica de um paciente implantado com o sistema Rheos. Figura retirada de Tordoir et al. (2007). 26

Figura 2. Ilustração do posicionamento do eletrodo bipolar no seio carotídeo/nervo do seio carotídeo esquerdo de rato. Abreviaturas: APA – Artéria faríngea ascendente; BA – Aferências barorreceptoras; CA – Aferências quimiorreceptoras; CB – Corpúsculo carotídeo; CBA – Artéria do corpúsculo carotídeo; CC – Canal carotídeo; CCA – Artéria carótida comum; CS – Seio carotídeo; CSN – Nervo do seio carotídeo; ECA – Artéria carótida externa; GPN – Nervo Glossofaríngeo; ICA – Artéria carótida interna; LA – Artéria lingual; OA – Artéria occipital; PA – Artéria pterigopalatina; PLF – Forame lacerado posterior; SCG – Gânglio cervical superior. Figura extraída de Katayama et al. (2015). 37

Figura 3. Traçados ilustrativos da pressão arterial pulsátil (traçado preto, painel superior), pressão arterial média (traçado branco, painel superior), e frequência cardíaca (painel inferior) de ratos acordados, em condições basais e sob estimulação elétrica do seio carotídeo (5 V; 1 ms; 90 Hz) durante 20 segundos. A: Grupo controle (CONT); B: Grupo com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); C: Grupo com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X); D: Grupo com inativação concomitante dos corpúsculos e dos barorreceptores carotídeos (TOTAL-X). PAP: Pressão arterial pulsátil; FC: Frequência cardíaca; ESC: Estimulação elétrica do seio carotídeo. 50

Figura 4. Respostas da pressão arterial média (Δ PAM) à estimulação elétrica (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequências: 15, 30, 60 e 90 Hz; Duração do estímulo: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados. * P < 0,05 em comparação ao grupo controle (CONT); † P < 0,05 em comparação ao grupo com inativação dos

corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); ‡ P < 0,05 em comparação ao grupo com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X). 52

Figura 5. Respostas da frequência cardíaca (Δ FC) à estimulação elétrica (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequências: 15, 30, 60 e 90 Hz; Duração do estímulo: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados. * P < 0,05 em comparação ao grupo controle (CONT); † P < 0,05 em comparação ao grupo com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); ‡ P < 0,05 em comparação ao grupo com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X). 54

Figura 6. Respostas da pressão arterial média (Δ PAM) às várias frequências de estimulação elétrica (15, 30, 60 e 90 Hz; Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Duração do estímulo: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados. * P < 0,05 em comparação ao grupo controle (CONT); † P < 0,05 em comparação ao grupo com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); ‡ P < 0,05 em comparação ao grupo com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X). 56

Figura 7. Valores individuais das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e das respostas da frequência cardíaca (Δ FC) à estimulação elétrica (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 15 Hz; Duração: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados pertencentes aos grupos: controle (CONT); com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X); com inativação dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X). 58

Figura 8. Valores individuais das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e das respostas da frequência cardíaca (Δ FC) à estimulação elétrica (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 30 Hz; Duração: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados pertencentes aos grupos: controle (CONT); com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X); com inativação dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X). 59

Figura 9. Valores individuais das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e das respostas da frequência cardíaca (Δ FC) à estimulação elétrica (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 60 Hz; Duração: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados pertencentes aos grupos: controle (CONT); com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X); com inativação dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).
.....60

Figura 10. Valores individuais das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e das respostas da frequência cardíaca (Δ FC) à estimulação elétrica (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 90 Hz; Duração: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados pertencentes aos grupos: controle (CONT); com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X); com inativação dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).
.....61

Figura 11. Traçados ilustrativos dos registros pletismográficos (deflexões de voltagem) em condições basais (Basal) e durante a estimulação elétrica do seio carotídeo (ESC) [intensidade de 3 V, largura de pulso 1 ms e frequência de 30 Hz]. A: Grupo controle (CONT); B: Grupo com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X).
.....63

Figura 12. Respostas da frequência respiratória (Δ fR; A), volume corrente (Δ V_T; B) e volume minuto (Δ V_E; C) à estimulação elétrica (Intensidade: 3 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequências: 15, 30, 60 e 90 Hz; Duração do estímulo: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados pertencentes aos grupos controle (CONT) e com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X). * P < 0,05 em comparação ao grupo controle.65

Figura 13. Imunofluorescência ilustrando a co-localização de tirosina hidroxilase (TH; vermelho) e receptores P2X3 (P2X3; verde) no corpúsculo carotídeo de ratos. A barra horizontal equivale a 10 μ m. 67

Figura 14. A: Traçados pletismográficos ilustrativos do período de 1 minuto da respiração de um mesmo rato antes da administração de AF-454 (traçado superior),

10 minutos (traçado intermediário) e 20 minutos (traçado inferior) após a administração de AF-454 (10 mg/kg, s.c.). B: Ocorrência de apneias (número de apneias/10 minutos; n=7) antes da administração de AF-454, 10 minutos e 20 minutos após a administração de AF-454 (10 mg/kg, s.c.). *P < 0,05 – em relação ao período Pré - AF-454. u.a. unidades arbitrárias. 69

Figura 15. A, B, C: Plots de Poincaré demonstrando a variabilidade dos intervalos respiratórios em um mesmo rato antes (A), 10 minutos (B) e 20 minutos após a administração de AF-454 (C). D, E: Dados agrupados da variabilidade de curto prazo (SD1; D) e da variabilidade de prazo (SD2; E) da respiração antes, 10 e 20 minutos após a administração de AF-454. *P < 0,05 – em comparação ao período Pré-AF-454. 73

Figura 16. Respostas da frequência respiratória (Δf_R), volume corrente (ΔV_T) e volume minuto (ΔV_E) à exposição aguda (1 minuto) à hipóxia (10% O₂) antes da administração de AF-454 (Pré - AF-454), 10 e 20 minutos após a administração de AF-454 (10 min pós - AF-454 e 20 min pós - AF-454, respectivamente). **P < 0.01 ou ***P < 0.001 – em comparação ao período Pré - AF-454.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores hemodinâmicos basais dos animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).....48

Tabela 2. Valores respiratórios basais dos animais dos grupos controle (CONT) e com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X).....62

Tabela 3. Parâmetros respiratórios mensurados antes, 10 e 20 minutos após a administração de AF-454, ou veículo, em ratos neonatos. 71

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µm	Micrômetro
AF-454	Antagonista seletivo de receptores P2X3
ATP	Adenosina trifosfato
bpm	Batimentos por minuto
CO ₂	Dióxido de carbono
cpm	Ciclos por minuto
CVLM	Região caudal ventrolateral do bulbo
ESC	Estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo
FC	Frequência cardíaca
f _R	Frequência respiratória
g	grama
HA	Hipertensão arterial
HARTF	Hipertensão arterial resistente ao tratamento farmacológico
Hz	Hertz
i.v.	Intravenoso
K ⁺	Potássio
KCN	Cianeto de potássio
Kg	Kilograma
L	Litro
L-NAME	L-nitro-arginina-metil-éster
mg	Miligrama
min	Minuto
MI	Miligrama
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
ms	Milissegundo
mV	Milivolt
N ₂	Nitrogênio
NA	Núcleo ambíguo
NaCN	Cianeto de sódio
NDA	Nervo depressor aórtico

NTS	Núcleo do trato solitário
O ₂	Oxigênio
P2X2	Receptor ionotrópico do ATP do tipo 2
P2X3	Receptor ionotrópico do ATP do tipo 3
P2Y2	Receptor metabotrópico do ATP do tipo 2
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
RVLM	Região rostral ventrolateral do bulbo
s	Segundo
s.c.	Subcutâneo
SHR	Rato espontaneamente hipertenso
SNC	Sistema nervoso central
SpO ₂	Saturação periférica de oxigênio
TAB	Terapia de ativação barorreflexa
TH	Tirosina hidroxilase
V	Volt
V _E	Volume minuto
V _T	Volume corrente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS.....	32
3. MÉTODOS	34
3.1. Papel dos quimiorreceptores carotídeos nas respostas hemodinâmicas à estimulação elétrica do seio carotídeo em ratos acordados.....	35
3.1.1. Animais	35
3.1.2. Procedimentos cirúrgicos e grupos experimentais	35
3.1.3. Protocolo experimental.....	37
3.1.4. Confirmação da eficácia das cirurgias para inativação dos quimiorreceptores e desnervação dos barorreceptores carotídeos	38
3.1.5. Análise estatística	39
3.2. Papel dos quimiorreceptores carotídeos nas respostas respiratórias à estimulação elétrica do seio carotídeo em ratos acordados.....	39
3.2.1. Animais	39
3.2.2. Procedimentos cirúrgicos e grupos experimentais	40
3.2.3. Protocolo experimental.....	40
3.2.4. Confirmação da eficácia das cirurgias para inativação dos quimiorreceptores carotídeos.....	42
3.2.5. Análise estatística	42
3.3. Efeitos do antagonismo seletivo de receptores P2X3, sobre os parâmetros respiratórios, ocorrência de apneias e sensibilidade do quimiorreflexo periférico em ratos recém-nascidos.....	42
3.3.1. Animais	42
3.3.2. Avaliação dos efeitos do antagonismo de receptores P2X3 sobre os parâmetros respiratórios e ocorrência de apneias	43
3.3.3. Avaliação dos efeitos do antagonismo de receptores P2X3 na sensibilidade do quimiorreflexo	44

3.3.4. Imunofluorescência para localização dos receptores P2X3 no corpúsculo carotídeo	44
3.3.5. Análise estatística	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Respostas hemodinâmicas obtidas com estimulação elétrica do seio carotídeo: papel dos corpúsculos carotídeos	47
4.2. Respostas respiratórias provocadas pela estimulação elétrica do seio carotídeo: papel dos corpúsculos carotídeos	62
4.3. Efeitos do antagonismo dos receptores P2X3 sobre os parâmetros respiratórios, sensibilidade do quimiorreflexo periférico, e ocorrência de apneias em ratos neonatos	66
5. DISCUSSÃO	76
6. CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICE.....	99
ANEXO A – Artigos publicados.....	126
ANEXO B – Artigo aceito para publicação	153

1.INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica, de etiologia multifatorial, caracterizada por níveis sustentados de pressão arterial (PA) sistólica maior ou igual a 140 mmHg, e/ou PA diastólica maior ou igual a 90 mmHg (Malachias et al., 2016). A prevalência de HA é extremamente elevada, acometendo aproximadamente 40% da população com mais de 25 anos idade (Gudsoorkar & Tobe, 2017). Além da alta prevalência, a HA está relacionada com o aumento do risco de eventos cardiovasculares, acidente vascular cerebral, doenças renais (Weber et al., 2014), entre outras comorbidades, constituindo-se como importante problema de saúde pública (Mills et al., 2016). Portanto, é fundamental que os níveis de PA da população sejam controlados adequadamente.

Entretanto, diversos fatores dificultam o tratamento da HA. Chow et al. (2013), por meio de estudo populacional envolvendo mais de 150.000 indivíduos, constataram que quase metade (46,5%) dos hipertensos não tinham conhecimento do seu diagnóstico. Além disso, Burnier (2017) apontou a má adesão ao tratamento, como importante fator contribuinte para as baixas taxas de controle da HA mundialmente. Adicionalmente, Burnier (2017) destacou ser fundamental o desenvolvimento de métodos para monitoração da adesão ao tratamento da HA, para que se atinjam os objetivos de se reduzir o risco cardiovascular populacional. Além dos fatores mencionados, existe uma parcela de pacientes hipertensos – entre 9 a 18% do total da população portadora da doença – que não responde ao tratamento farmacológico, mesmo quando são combinadas três ou mais classes de anti-hipertensivos, incluindo um diurético (Sheppard, Martin, & McManus, 2017). Tais pacientes são classificados como hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico, os quais, pelo fato da PA permanecer constantemente elevada, se encontram em situação de elevado risco cardiovascular (Acelajado et al., 2012; Calhoun et al., 2008).

Assim como na HA essencial - primária - as causas da HA resistente ao tratamento farmacológico (HARTF) ainda não estão bem esclarecidas. Estudos indicam que pacientes com HARTF possuem maior tendência à obesidade, são mais idosos, pertencem à raça negra, e maior prevalência de doenças cardiovasculares e renais, em comparação a pacientes com HA não-resistente (Hwang et al., 2017). Além disso, Hwang et al. (2017) sugerem como potenciais mecanismos envolvidos na fisiopatologia da HARTF: aumento da retenção e sensibilidade ao sódio, aumento da atividade do sistema renina - angiotensina - aldosterona, disfunção endotelial, e

aumento da atividade nervosa simpática. Nesse contexto, cabe destacar que o sistema nervoso simpático foi posicionado no centro da medicina cardiovascular, pois parece ser fator chave na gênese da HA (Esler, 2014). De fato, estudos mais recentes demonstraram que a HA, incluindo a HARTF, é caracterizada por significativo aumento na atividade simpática cardiovascular (Grassi, 2010; Sheppard et al., 2017). Diante disso, tem havido crescente interesse por abordagens terapêuticas anti-hipertensivas que exerçam efeitos inibitórios sobre a hiperatividade simpática (Dibona, 2013; Mancia et al., 1999; Mancia & Grassi, 2014).

Nesse contexto, abordagens intervencionais voltadas para a redução da atividade simpática, sobretudo na HARTF, têm sido propostas como alternativa ao tratamento farmacológico convencional. Dentre essas abordagens destacam-se a ablação do nervo simpático renal, e a terapia de ativação barorreflexa (TAB) (Bhatt et al., 2014; Bisognano et al., 2011; Oparil & Schmieder, 2015; Sheppard et al., 2017). A primeira se baseia no fato de que a hiperatividade simpática renal causa um aumento na liberação de renina, aumento na reabsorção de sódio e água, redução do fluxo renal e da taxa de filtração glomerular (Papademetriou et al., 2014); contribuindo tanto para o desenvolvimento, como a manutenção da HA. Nesse sentido, a ablação do nervo simpático renal resultaria na reversão dos fatores acima mencionados, contribuindo para a redução da PA. Inicialmente, estudos clínicos demonstraram que a ablação do nervo simpático renal reduziu a PA de forma sustentada e com pequena ocorrência de efeitos adversos (Davis et al., 2013). Posteriormente, a publicação dos resultados do estudo epidemiológico SYMPLICITY HTN-3 (Bakris et al., 2014) foram bastante desanimadores mostrando que, com o devido controle epidemiológico, a redução da PA não foi significativa com a abordagem da desnervação renal. Assim, as evidências ainda não são suficientemente robustas para o uso da ablação do nervo simpático renal para o tratamento de pacientes com HARTF, sendo necessários, mais estudos (Bolignano & Coppolino, 2017). A segunda - terapia de ativação barorreflexa (TAB) - baseia-se no uso de dispositivos para estimulação elétrica das aferências barorreceptoras, e é o foco do presente estudo.

O barorreflexo é um dos principais mecanismos de regulação da PA. Elevações da PA, por exemplo, ativam os barorreceptores, os quais são receptores mecanossensíveis localizados no arco aórtico e no seio carotídeo. A ativação dos barorreceptores aumenta a frequência dos impulsos elétricos que são conduzidos ao

sistema nervoso central (SNC) por meio das aferências barorreceptoras. No SNC, é organizada uma resposta contra-regulatória, caracterizada por inibição da atividade do sistema nervoso simpático e ativação da atividade do sistema nervoso parassimpático, no sentido de reestabelecer níveis adequados de PA (Heusser et al., 2010; Krieger, Salgado, & Michelini, 1982). Entretanto, na hipertensão arterial ocorre um fenômeno denominado “adaptação” dos barorreceptores, o qual consiste em um deslocamento da faixa de atividade dos mesmos, de acordo com os novos níveis de PA (Krieger et al., 1982). Dessa forma, o fundamento da TAB é a estimulação direta - elétrica - das aferências barorreceptoras; assim, o aumento na frequência de impulsos conduzidos ao SNC seria interpretado como uma elevação da PA, resultando na modulação central das eferências simpática e parassimpática, resultando em redução da PA (Heusser et al., 2010; Paulis & Unger, 2012; Tordoir et al., 2007).

As primeiras evidências de que o barorreflexo, poderia ser ativado por meio da estimulação elétrica de suas aferências, foram descritas em estudos publicados no final da década de 1950 (Carlsten et al., 1958; Warner, 1958). Tais estudos, conduzidos tanto em cães (Warner, 1958) como em seres humanos (Carlsten et al., 1958), constataram que estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo foi capaz de ativar o barorreflexo, resultando em diminuição da PA e da FC. Posteriormente, Bilgutay & Lillehei (1965) reportaram os efeitos da ativação do barorreflexo em doenças cardiovasculares, por meio da estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo, em 4 grupos de cães: normotensos, com hipertensão neurogênica aguda, hipertensos renais, e arterioscleróticos. Os autores demonstraram que a estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo causou redução da PA em todos os grupos. Adicionalmente, Bilgutay & Lillehei (1965) constataram que a resposta hipotensora à estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo foi mais pronunciada no grupo de animais com hipertensão neurogênica aguda. Corroborando os achados de Bilgutay & Lillehei (1965), os estudos de Griffith & Schwartz (1964) e Neistadt & Schwartz (1967) mostraram que a estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo, de forma crônica, causou redução sustentada da PA de cães hipertensos. A partir de então, pesquisadores passaram a se empenhar no desenvolvimento de dispositivos implantáveis para estimulação elétrica do barorreflexo, possibilitando, assim, a sua aplicação no tratamento de pacientes hipertensos. Nesse sentido, estudos subsequentes, conduzidos em humanos, mostraram que a estimulação elétrica do

nervo do seio carotídeo também foi eficaz em reduzir a PA em pacientes com hipertensão arterial (Parsonnet et al., 1969; Schwartz et al., 1967). Adicionalmente, outro estudo demonstrou que a ativação do barorreflexo, por meio da estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo, melhorou os sintomas e o desempenho físico de pacientes com angina pectoris (Braunwald et al., 1967). Apesar dos resultados animadores, a técnica de estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo foi abandonada no início dos anos 70. Tal fato pode ser atribuído às complicações pós-cirúrgicas, às limitações tecnológicas dos dispositivos, e, também, ao desenvolvimento de drogas anti-hipertensivas mais eficazes e melhor toleradas (Durand et al., 2009; Tordoir et al., 2007).

Nos últimos anos, o interesse na TAB foi renovado. Estudos promissores, conduzidos em cães normotensos e hipertensos, mostraram que a ativação do barorreflexo, por meio da estimulação elétrica do barorreflexo carotídeo, promoveu reduções significativas da PA (Lohmeier et al., 2004; Lohmeier et al., 2005; Lohmeier et al., 2007). Nesses estudos, cães normotensos (Lohmeier et al., 2004), cães com hipertensão arterial induzida por infusão de angiotensina II (Lohmeier et al., 2005), ou cães com hipertensão arterial induzida por obesidade (Lohmeier et al., 2007) foram submetidos à ativação do barorreflexo por um período relativamente prolongado, ou seja, 7 dias. Nos três estudos mencionados observaram-se reduções sustentadas da PA durante a ativação do barorreflexo. Além disso, a concentração de noradrenalina plasmática foi significativamente reduzida, indicando que o efeito hipotensor da ativação do barorreflexo foi devido à inibição do sistema nervoso simpático (Lohmeier et al., 2004; Lohmeier et al., 2005; Lohmeier et al., 2007). Esses achados proveram informações importantes para o desenvolvimento de um dispositivo implantável (sistema *Rheos*) para TAB em pacientes hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico (Illig et al., 2006). O dispositivo consiste, basicamente, em um gerador de pulsos elétricos programável acoplado a dois eletrodos projetados para implante nas bifurcações da carótida, como ilustrado na figura 1 (Tordoir et al., 2007).

Figura 1. Posicionamento dos eletrodos nas bifurcações da carótida e gerador de pulsos elétricos do sistema Rheos. A: Desenho esquemático mostrando o posicionamento dos eletrodos ao redor das bifurcações carotídeas e, também, o gerador de pulsos elétricos, o qual é implantado subcutaneamente na região subclávia do paciente. B: Imagem radiográfica de um paciente implantado com o sistema Rheos. Figura retirada de Tordoir et al. (2007).

Os estudos de Illig et al. (2006) e Tordoir et al. (2007) mostraram que o sistema *Rheos* pode ser implantado de forma segura em pacientes hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico, sem maiores complicações peri- e pós-operatórias. Além disso, os autores mostraram que o sistema *Rheos* foi eficiente em estimular o barorreflexo carotídeo, reduzindo significativamente a PA nestes pacientes, sem evidências de efeitos colaterais. A partir de então, os estudos subsequentes se propuseram a examinar os efeitos crônicos da TAB no tratamento da hipertensão arterial. Scheffers et al. (2010) acompanharam pacientes hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico, implantados com o dispositivo para TAB, por um período de 2 anos. Os autores observaram que a TAB causou significativa redução da PA, e discreta, porém, significativa diminuição da FC; esses efeitos foram mantidos ao longo dos 2 anos do estudo. Corroborando os resultados de

Scheffers et al. (2010), Bisognano et al. (2011) mostraram que a TAB, quando aplicada em pacientes hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico, reduziu de forma sustentada a PA; estes autores sugeriram ser esta abordagem um meio eficiente para o manejo de pacientes hipertensos resistentes à terapêutica farmacológica. Adicionalmente, Wustmann et al. (2009), por meio da análise da variabilidade da frequência cardíaca, mostraram que, paralelamente ao efeito hipotensor, a TAB determinou, em pacientes hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico, em redução da modulação simpática, e aumento da modulação parassimpática cardíaca.

Embora os resultados dos estudos utilizando o sistema *Rheos* para TAB em pacientes hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico tenham sido bastante promissores, restaram, ainda, lacunas a serem preenchidas. Nesse sentido, cabe destacar que o ensaio clínico conduzido por Bisognano et al. (2011) apresentou resultados questionáveis no que diz respeito à eficácia, e à segurança, deste procedimento terapêutico (Bloch & Basile, 2012). Dentre os problemas relatados no próprio estudo de Bisognano et al. (2011) verificaram-se: complicações cirúrgicas, lesões transitórias, ou permanentes, a nervos, complicações respiratórias, problemas de cicatrização; além de pacientes que não responderam à TAB. Dessa forma, os estudos subsequentes ao de Bisognano et al. (2011) procuraram compreender melhor os mecanismos envolvidos na abordagem de TAB, de forma a aprimorá-la, tornando-a viável na prática clínica. Nesse contexto, o presente estudo foi dedicado, em parte, a desenvolver um modelo experimental de TAB, o qual possibilitasse o estudo mais detalhado de seus mecanismos. Assim, no presente estudo, foi desenvolvido um modelo de TAB em ratos acordados (Katayama et al., 2015), o qual reproduziu os efeitos hipotensores observados nos estudos conduzidos em cães (Lohmeier et al., 2004) e humanos (Illig et al., 2006). Adicionalmente, o modelo experimental de TAB, apresentado nesta Tese de Doutorado, possibilitou uma série de procedimentos experimentais, os quais seriam inexecutáveis em seres humanos.

No que diz respeito aos potenciais mecanismos envolvidos na TAB, uma hipótese levantada por Zucker et al. (2007) merece ser destacada. Esses autores alertaram que devido à posição anatômica dos corpúsculos carotídeos, durante a estimulação elétrica do barorreflexo carotídeo, além da ativação do barorreflexo, pode ocorrer a ativação simultânea do quimiorreflexo periférico. Como se sabe, os

quimiorreceptores localizados nos corpúsculos carotídeos são estimulados, principalmente, em condições de hipóxia, e atuam no controle reflexo da respiração e da circulação (Franchini & Krieger, 1993). A ativação dos quimiorreceptores carotídeos aumenta a frequência de impulsos conduzidos ao SNC, por meio das fibras aferentes quimiorreceptoras. O SNC, por sua vez, promove ajustes cardiovasculares e respiratórios, com o objetivo de normalizar a PO_2 do sangue arterial. Tais ajustes são caracterizados por simpato-excitação e aumento da PA; bradicardia; e aumento da ventilação (Braga, Soriano, & Machado, 2006; Costa et al., 2014; Franchini & Krieger, 1993; Freet, Stoner, & Tang, 2013). Portanto, fica evidente um certo antagonismo entre as respostas barorreflexa e quimiorreflexa, especialmente sobre a modulação da atividade eferente simpática. Dessa forma, durante a TAB, a ativação adjacente dos quimiorreceptores carotídeos e suas aferências, poderia influenciar a resposta barorreflexa, ou seja, atenuando a hipotensão, acentuando a bradicardia, e causando aumento da ventilação. Essa hipótese foi investigada por Alnima et al. (2015), os quais examinaram as respostas respiratórias à TAB em pacientes hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico. Embora Alnima et al. (2015) não tenham observado evidências de ativação do quimiorreflexo periférico, baseando-se na ausência alterações respiratórias significativas durante a TAB, esses autores não descartaram, completamente, esta hipótese. Nesse sentido, o presente estudo teve como um de seus objetivos caracterizar o componente quimiorreflexo nas respostas hemodinâmicas e respiratórias observadas durante a estimulação elétrica do seio/nervo do seio carotídeo (ESC) em ratos acordados.

A utilização do modelo experimental de ESC, descrito no presente estudo, possibilitou a inativação seletiva dos barorreceptores, quimiorreceptores, ou ambos, permitindo a avaliação específica de cada componente (barorreflexo, quimiorreflexo ou ambos) nas respostas hemodinâmicas à ESC (Katayama et al., 2015). Dessa forma, as informações obtidas no presente estudo poderão contribuir de forma significativa para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na TAB utilizada no tratamento da HARTF.

Recentemente, a atenção tem sido direcionada ao papel dos quimiorreceptores carotídeos nas doenças caracterizadas por hiperatividade simpática. Estudos conduzidos em modelos experimentais de HA sugeriram, fortemente, que os quimiorreceptores carotídeos são responsáveis, pelo menos em parte, pela simpato-

excitação que ocorre na HA (Abdala et al., 2012; McBryde et al., 2013). Abdala et al. (2012) verificaram que a inativação dos quimiorreceptores carotídeos, por meio da desnervação bilateral dos seios carotídeos, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) jovens, atenuou o desenvolvimento da HA na vida adulta; e que esse fato estava associado à diminuição do tono simpático, em comparação aos SHR submetidos à cirurgia de desnervação fictícia. Adicionalmente, Abdala et al. (2012) demonstraram que a inativação dos quimiorreceptores carotídeos em SHR adultos reduziu a PA e o tono simpático. Corroborando esses resultados, o mesmo grupo de pesquisadores mostrou que a desnervação bilateral dos seios carotídeos em SHR adultos reduziu a atividade do nervo simpático renal, melhorou as funções renal e barorreflexa, e reduziu a infiltração de linfócitos T na aorta e no tronco cerebral (McBryde et al., 2013). Assim, este grupo concluiu que os quimiorreceptores carotídeos possuem papel apreciável, tanto no desenvolvimento, como na manutenção da HA em SHR. Dessa forma, a inativação cirúrgica dos quimiorreceptores carotídeos surge como nova perspectiva no tratamento da HA. Abdala et al. (2012) e McBryde et al. (2013) apontaram a inativação bilateral dos quimiorreceptores carotídeos como alternativa terapêutica no tratamento de pacientes hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico. Entretanto, embora os procedimentos cirúrgicos para inativação dos quimiorreceptores carotídeos pareçam não promover efeitos deletérios, a translação para a aplicação clínica carece, ainda, de cautelosa investigação.

Nesse sentido, Pijacka et al. (2016) mostraram que o antagonismo farmacológico de receptores purinérgicos P2X3 pode modular a função do corpúsculo carotídeo, inibindo a sua atividade em SHR, sem a necessidade de procedimentos cirúrgicos. Os autores demonstraram que o antagonismo dos receptores P2X3 reduziu a hipertonciedade e hiperreflexia do corpúsculo carotídeo, resultando em diminuição da atividade simpática e da PA em SHR. Os receptores P2X3 são subtipos de receptores purinérgicos, os quais podem ser encontrados em diversos tecidos e órgãos, incluindo as células dos corpúsculos carotídeos, onde se situam os quimiorreceptores (Prasad et al., 2001; Song et al., 2012). Como já se encontra bem descrito, o trifosfato de adenosina (ATP) é um neurotransmissor excitatório, essencial, na transdução química que ocorre nos quimiorreceptores carotídeos (Conde et al., 2012); essa participação ocorre, em parte, via receptores P2X3 (Ford et al., 2015; Prasad et al., 2001). Neste sentido, Pijacka et al. (2016)

propuseram que o antagonismo dos receptores P2X3 poderia ser uma nova forma de atenuar a hipertonicidade e a hiperreflexia dos quimiorreceptores carotídeos, resultando em redução da PA e refletindo no tratamento da HA.

Recentemente, os quimiorreceptores carotídeos têm sido considerados estruturas multifuncionais, pois além de sua função clássica de promover ajustes autonômicos e respiratórios em situações de hipóxia, são capazes de responder também a diversos outros estímulos como glicose, hormônios, K^+ , citocinas, temperatura e osmolaridade (Katayama, 2016; Kumar & Prabhakar, 2012). Dessa forma, os quimiorreceptores carotídeos podem estar envolvidos em diversas condições fisiológicas e patológicas, nas quais a modulação de sua atividade por meio do antagonismo dos receptores P2X3 pode ser explorada. Nesse contexto, parte do presente estudo propôs avaliar os efeitos do antagonismo dos receptores P2X3 sobre os parâmetros respiratórios, sensibilidade do quimiorreflexo periférico, e ocorrência de apneias em ratos recém-nascidos.

A apneia da prematuridade ocorre em aproximadamente 85% dos recém-nascidos. E é definida como uma interrupção da respiração por pelo menos 20 segundos, a qual é seguida tanto por redução da SpO_2 para valores menores ou iguais a 80%, e bradicardia por um período de, no mínimo, 4 segundos (Eichenwald et al., 2016; Ren, Ding, & Greer, 2015; Zhao, Gonzalez, & Mu, 2011). A apneia da prematuridade pode ser classificada como: central - caracterizada pela cessação do esforço respiratório; obstrutiva - quando o fluxo respiratório é interrompido, geralmente na faringe; ou mista (Eichenwald et al, 2016). Em curto prazo, a apneia da prematuridade pode levar à hipoperfusão cerebral e, eventualmente, lesão isquêmica cerebral. Porém, cronicamente, a apneia da prematuridade pode ter consequências catastróficas, afetando o desenvolvimento neurológico (Horne et al., 2017; Janvier et al., 2004). Os mecanismos fisiopatológicos da apneia da prematuridade ainda não estão completamente esclarecidos, tornando seu tratamento difícil. Dentre os potenciais mecanismos sugeridos encontram-se a diminuição na sensibilidade ao CO_2 e o aumento na sensibilidade à hipóxia (Martin & Wilson, 2012). O aumento da sensibilidade dos quimiorreceptores carotídeos à hipóxia pode levar à instabilidade respiratória (Dempsey et al., 2014; Younes, 2014). De fato, Nock et al. (2004) observaram que recém-nascidos com maior ocorrência de apneias apresentaram respostas respiratórias à hipóxia mais expressivas, em comparação a recém-nascidos com menor ocorrência de apneias; sugerindo, assim,

uma associação entre maior sensibilidade do quimiorreflexo periférico e maior ocorrência de apneias. Dessa forma, parte do estudo foi dedicada a examinar o papel dos receptores P2X3 na respiração basal, e nas respostas respiratórias à hipóxia em ratos recém-nascidos. Além disso, foi levantada a hipótese de que o antagonismo de receptores P2X3 poderia reduzir a sensibilidade do quimiorreflexo periférico, reduzindo a ocorrência de apneias espontâneas nesses animais.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais da presente tese foram avaliar o papel do corpúsculo carotídeo nas respostas hemodinâmicas e respiratórias provocadas pela estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo carotídeo de ratos adultos e investigar os efeitos da inibição farmacológica do corpúsculo carotídeo na respiração de ratos neonatos. Assim, os objetivos específicos do presente estudo foram:

1. Avaliar o papel dos corpúsculos carotídeos nas respostas hemodinâmicas (pressão arterial e frequência cardíaca) provocadas pela estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo em ratos acordados;
2. Determinar o papel dos corpúsculos carotídeos nas respostas respiratórias (frequência respiratória, volume corrente e volume minuto) causadas pela estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo em ratos acordados;
3. Verificar a localização de receptores P2X3 no corpúsculo carotídeo de ratos recém-nascidos e avaliar os efeitos de sua inibição farmacológica utilizando um antagonista seletivo de receptores P2X3, sobre os parâmetros respiratórios, ocorrência de apneias e sensibilidade do quimiorreflexo periférico.

3. MÉTODOS

Os protocolos experimentais descritos em 3.1 e 3.2 foram realizados no Brasil e se referem, respectivamente, ao cumprimento dos objetivos 1 e 2. Ambos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CETEA – FMRP/USP), sob o número 143/2013. O protocolo experimental 3.3 se refere ao cumprimento do objetivo 3 e foi realizado na Universidade de Bristol (Bristol, Reino Unido), tendo sido aprovado pelo *United Kingdom Home Office Guidelines on Animals (Scientific Procedures) Act of 1986*.

3.1. Papel dos quimiorreceptores carotídeos nas respostas hemodinâmicas à estimulação elétrica do seio carotídeo em ratos acordados

3.1.1. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, adultos jovens (270 – 310 g), fornecidos pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia, em sala com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração.

3.1.2. Procedimentos cirúrgicos e grupos experimentais

Os animais foram submetidos a uma única sessão cirúrgica. A anestesia consistiu de injeção intraperitoneal da mistura de Ketamina (50 mg/Kg, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, BR) e Xilazina (10 mg/Kg, Hertape Calier Saúde animal S/A, Juatuba, MG, BR). Primeiramente, em todos os animais, a artéria e veia femorais do lado esquerdo foram cateterizadas com tubos de polietileno (PE-50 soldado a um PE-10, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), os quais foram exteriorizados na região interscapular para posterior registro da PA e administração de drogas. Em seguida, os animais foram submetidos à cervicotomia

ventral para acesso às carótidas comum, interna e externa as quais foram identificadas por meio de microscópio cirúrgico (modelo MC-M902MFZ, D.F.V. Com. Ind. Ltda, São Paulo, SP, BR). Todos os animais foram submetidos à inativação dos quimiorreceptores carotídeos do lado direito por meio de isolamento e subsequente rompimento da artéria nutridora do corpúsculo carotídeo, de acordo com o procedimento previamente descrito (Franchini & Krieger, 1992).

Em sequência, antes do implante do eletrodo no seio carotídeo esquerdo, os animais foram preparados de acordo com o grupo experimental ao qual seriam alocados, a saber:

- 1) Controle (CONT, n=7): A bifurcação carotídea esquerda foi mantida intacta;
- 2) Inativação dos quimiorreceptores (QUIMIO-X, n=7): Os quimiorreceptores carotídeos esquerdos foram inativados (Franchini & Krieger, 1992);
- 3) Desnervação dos barorreceptores (BARO-X, n=6): Os barorreceptores carotídeos esquerdos foram desnervados por meio da secção das aferências barorreceptoras na região do seio carotídeo;
- 4) Inativação dos quimio- e desnervação dos barorreceptores carotídeos (TOTAL-X, n=7): Os animais foram submetidos simultaneamente aos procedimentos descritos nos itens 2 e 3 acima.

Finalmente, os animais foram instrumentados com um eletrodo bipolar de aço inoxidável, posicionado ao redor do seio carotídeo esquerdo, conforme ilustrado na figura 2. O eletrodo foi fixado por resina (Kwik-Sil, World Precision Instruments Inc., Sarasota, Flórida, USA). As extremidades dos fios dos eletrodos foram exteriorizadas na região interscapular dos ratos e soldadas a pequenas tomadas (GF-6, Microtech, Boothwyn, PA, USA). Em seguida, a incisão na região cervical ventral foi suturada.

Figura 2. Ilustração do posicionamento do eletrodo bipolar no seio carotídeo/nervo do seio carotídeo esquerdo de rato. Abreviaturas: APA – Artéria faríngea ascendente; BA – Aferências barorreceptoras; CA – Aferências quimiorreceptoras; CB – Corpúsculo carotídeo; CBA – Artéria do corpúsculo carotídeo; CC – Canal carotídeo; CCA – Artéria carótida comum; CS – Seio carotídeo; CSN – Nervo do seio carotídeo; ECA – Artéria carótida externa; GPN – Nervo Glossofaríngeo; ICA – Artéria carótida interna; LA – Artéria lingual; OA – Artéria occipital; PA – Artéria pterigopalatina; PLF – Forame lacerado posterior; SCG – Gânglio cervical superior. Figura extraída de Katayama et al. (2015).

3.1.3. Protocolo experimental

O protocolo experimental foi conduzido 24 horas após os procedimentos cirúrgicos, com os animais acordados e em livre movimentação. O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT844; ADInstruments, Sydney, Austrália) acoplado a um conversor analógico-digital (DI-220 Dataq Instruments, Akron, OH, USA). A pressão arterial pulsátil foi, então, continuamente registrada (2 kHz) em um microcomputador (IBM/PC) equipado com o sistema de aquisição de dados LabChart 7 (ADInstruments, Sydney, Austrália). O sinal foi processado pela aplicação de um algoritmo matemático o qual detecta pontos de inflexão, ciclo-a-ciclo, e gera séries temporais de PA média (PAM), PA sistólica (PAS), PA diastólica (PAD), e FC. Para as séries de ESC, foi utilizado um estimulador elétrico (S48 Square Pulse Stimulator; Grass Products/Natus Neurology Incorporated, Middleton,

WI, USA). Embora bastante incomum, os ratos que apresentaram qualquer sinal de desconforto durante a ESC, foram excluídos do estudo. O protocolo consistiu em 20 minutos de registro dos parâmetros hemodinâmicos, em condições basais, seguido de 4 séries de estimulações elétricas (intensidade de 5 V, duração de pulso de 1 ms, e duração de cada estímulo de 20 segundos) com frequências variáveis de 15, 30, 60, e 90 Hz, aplicadas em ordem aleatória, e respeitando-se intervalos mínimos de 5 minutos entre as séries.

3.1.4. Confirmação da eficácia das cirurgias para inativação dos quimiorreceptores e desnervação dos barorreceptores carotídeos

Ao final do protocolo experimental, todos os animais foram submetidos à administração de cianeto de potássio (KCN, 40 µg/i.v., Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) para confirmação da inativação dos quimiorreceptores carotídeos nos grupos QUIMIO-X e TOTAL-X. A inativação dos quimiorreceptores carotídeos foi confirmada pela ausência de respostas hemodinâmicas à administração de KCN. Tal procedimento justifica a realização da inativação dos quimiorreceptores carotídeos do lado direito, realizada em todos os animais.

Adicionalmente, para verificar a eficácia da cirurgia de desnervação dos barorreceptores carotídeos esquerdos nos grupos BARO-X e TOTAL-X, foi utilizada uma adaptação na técnica descrita previamente por Sato et al. (1999). Resumidamente, sob anestesia de Ketamina/Xilazina (como descrito anteriormente), os animais foram submetidos à incisão ventral no pescoço para exposição das carótidas comum, interna, e externa esquerdas. Um fio de nylon foi posicionado ao redor da carótida comum esquerda em sua porção proximal (próximo à bifurcação carotídea), enquanto a sua porção distal foi clampeada com a utilização de um clampe bulldog. Em seguida, fios de nylon foram posicionados ao redor das artérias carótida externa (no nível da bifurcação carotídea), carótida interna e pterigopalatina (na entrada do crânio). Então, adicionou-se solução salina morna à cavidade cirúrgica de forma a imergir totalmente a carótida esquerda. Um tubo de polietileno (PE-50, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) preenchido com solução salina, e conectado a um transdutor de pressão (MLT844, ADInstruments, Sydney, Austrália),

foi inserido na carótida comum esquerda por meio de uma incisão realizada entre as porções clampeada e ligada do vaso. Quando o tubo de polietileno atingiu o nível do fio de nylon na carótida comum, todos os laços pré-posicionados ao redor das artérias carótida externa, carótida interna e pterigopalatina foram amarrados e o clampe bulldog solto. Essa técnica possibilitou o isolamento do seio carotídeo esquerdo e a aplicação de diferentes níveis de pressão por meio do tubo de polietileno conectado ao transdutor de pressão. O teste consistiu em mudanças na pressão do seio carotídeo entre 60 e 180 mmHg, em passos de 20 mmHg com duração de 1 minuto cada passo. Simultaneamente, a PA foi registrada por meio da artéria femoral previamente cateterizada como descrito anteriormente no item 3.1.3. A desnervação dos barorreceptores carotídeos esquerdos foi confirmada pela ausência de respostas hemodinâmicas frente às alterações progressivas na pressão do seio carotídeo esquerdo.

3.1.5. Análise estatística

Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar a distribuição dos dados. Para comparar as respostas da PAM e da FC à estimulação elétrica do seio carotídeo entre os grupos estudados, a cada frequência de estimulação, foi utilizado ANOVA one-way com pós-teste Student Newman-Keuls. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *SigmaStat 3.5 software* (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA) e os gráficos foram gerados por meio do programa *Graphpad Prism 5.0* (Graphpad, San Diego, CA, EUA).

3.2. Papel dos quimiorreceptores carotídeos nas respostas respiratórias à estimulação elétrica do seio carotídeo em ratos acordados

3.2.1. Animais

Idem ao item 3.1.1.

3.2.2. Procedimentos cirúrgicos e grupos experimentais

Idem ao item 3.1.2 com a ressalva de que neste protocolo foram avaliados 2 grupos experimentais:

- 1) Controle (CONT, n=7): A bifurcação carotídea esquerda foi mantida intacta;
- 2) Inativação dos quimiorreceptores (QUIMIO-X, n=7): Os quimiorreceptores carotídeos esquerdos foram inativados;

3.2.3. Protocolo experimental

O protocolo experimental foi o mesmo utilizado para cumprir o primeiro objetivo do projeto (descrito detalhadamente no item 3.1.3), exceto pela intensidade da ESC que neste protocolo foi reduzida para 3 V. Optou-se pela redução da intensidade da ESC, pois constatou-se que a intensidade de 3 V é suficiente para causar respostas hemodinâmicas similares às observadas no protocolo anterior (5 V), porém com a vantagem de um estímulo menos agressivo. Os outros parâmetros e intervalos mínimos de 5 minutos, entre cada série de ESC, foram mantidos. Além disso, para avaliação das respostas respiratórias à ESC todos os experimentos desta etapa do projeto foram realizados com os animais acomodados, individualmente, dentro de uma caixa pletismográfica de acrílico, com volume de 5L, e saída selada para os cateteres vasculares, e para o fio conectado ao estimulador elétrico, permitindo livre movimentação dos animais. A temperatura do ambiente e da câmara foram mantidas em 25 °C. Antes do início dos protocolos experimentais os animais foram mantidos por, aproximadamente, 1 hora dentro na caixa, nas condições supracitadas, para adaptação e aclimação.

Os parâmetros respiratórios foram registrados como deflexões de voltagem (mV) a cada uma das 4 séries de ESC, por períodos contínuos de 60 segundos: 20 segundos antes, 20 segundos durante e 20 segundos após cada série de ESC. No

momento de cada registro, o fluxo de ar através da caixa foi brevemente interrompido, vedando-se todas as portas de entrada e saída. As oscilações de pressão, resultantes dos movimentos respiratórios dos animais, foram detectadas por um transdutor de pressão diferencial contido em um espirômetro (MLT141 spirometer, ADInstruments, Bella Vista, Australia), acoplado a um sistema de aquisição de dados Power Lab (Power Lab 4/30, ML866, ADInstruments, Sydney, Austrália). Os sinais foram salvos por um microcomputador (IBM/PC) e posteriormente analisados utilizando-se o software LabChart 7 (ADInstruments, Sidney, Austrália). A frequência respiratória (f_R) foi calculada pela quantificação dos ciclos respiratórios em função do tempo e expressa em ciclos por minuto (cpm). O volume corrente (V_T) foi obtido utilizando-se a equação abaixo (Drorbaugh & Fenn, 1955):

$$V_T = V_K \times \frac{PT}{PK} \times \frac{TC (PB - PA)}{TC (PB - PA) - TA (PB - PC)}$$

Na qual:

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 do animal;

PB: pressão barométrica;

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

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

Uma calibração de volume foi realizada a cada medida dos parâmetros respiratórios, injetando-se um volume de ar (1 mL) com a utilização de uma seringa graduada. Os valores de V_T foram corrigidos pelo peso do animal e expressos em mL/kg. O volume minuto (V_E) foi calculado pelo produto entre a f_R e o V_T , sendo expresso em mL/kg/min.

3.2.4. Confirmação da eficácia das cirurgias para inativação dos quimiorreceptores carotídeos

Neste protocolo foram avaliados, apenas, os grupos controle (CONT) e grupo com inativação dos quimiorreceptores carotídeos (QUIMIO-X). Portanto, a inativação dos quimiorreceptores carotídeos no grupo QUIMIO-X foi confirmada pela ausência de respostas hemodinâmicas à administração de KCN ao final do protocolo experimental, como descrito anteriormente no item 3.1.4.

3.2.5. Análise estatística

Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar a distribuição normal dos dados. Para comparar as respostas de f_R , V_T e V_E à ESC entre os grupos, nas diferentes frequências de estimulação, foi utilizada a análise de variância para dois fatores (ANOVA *two-way*) com pós-teste de *Tukey*. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *SigmaStat 3.5 software* (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA) e os gráficos foram gerados por meio do programa *Graphpad Prism 5.0* (Graphpad, San Diego, CA, EUA).

3.3. Efeitos do antagonismo seletivo de receptores P2X3, sobre os parâmetros respiratórios, ocorrência de apneias e sensibilidade do quimiorreflexo periférico em ratos recém-nascidos.

3.3.1. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, no dia do nascimento (P0), peso corporal ($5,8 \pm 0,2$ g), obtidos da *University of Bristol Animal Services Unit*.

3.3.2. Avaliação dos efeitos do antagonismo de receptores P2X3 sobre os parâmetros respiratórios e ocorrência de apneias

Todos os experimentos foram conduzidos no mesmo dia do nascimento dos animais (5 ± 1 horas após o nascimento). Para avaliação dos parâmetros respiratórios, foi utilizado um sistema de pletismografia de corpo inteiro (*Emka Technologies, Paris, França*). Foi utilizada uma câmara pletismográfica adaptada, com volume de 45 mL, a qual foi conectada a um transdutor de pressão diferencial. A câmara possuía uma entrada e uma saída de ar, equipadas com um sistema que permitiu o fluxo de ar constante (0,2 mL/min) através da caixa, evitando o acúmulo de CO₂ durante o experimento.

Durante todo o experimento, a câmara pletismográfica foi mantida sobre uma placa térmica, mantida a 35 °C. Os animais foram posicionados dentro da câmara e mantidos por um período de 5 minutos para adaptação. Após 5 minutos, realizou-se o registro dos parâmetros respiratórios basais, por 10 minutos. Em seguida, foram rapidamente retirados e submetidos à administração de um antagonista seletivo de receptores P2X3 (AF-454; 10 mg/kg, s.c.). Um grupo separado de animais recebeu o veículo da droga (Propileno glicol, 50%, s.c.). Após a administração da droga ou veículo, os animais foram novamente posicionados dentro da câmara e registrou-se a respiração por um período adicional de 30 minutos.

Os dados foram adquiridos à uma frequência de amostragem de 1000 Hz e analisados utilizando o programa IOX 2.9.5.28 (*Emka technologies, Paris, France*). Para análise do número de apneias, os registros pletismográficos foram exportados para o programa Spike2 (*CED, Cambridge, UK*). Apneias foram definidas como cessação da respiração por pelo menos 3 ciclos respiratórios (Rieusset et al., 2013). A frequência de apneias foi contada em trechos de 10 minutos, sendo expressa em número de apneias/10 minutos, durante: 1) Registro basal, 2) 10 minutos após administração de AF-454 e 3) 20 minutos após a administração de AF-454. Os mesmos períodos foram utilizados para a análise dos parâmetros respiratórios (f_R , V_T e V_E). Além disso, foram utilizados o *Plot de Poincaré* e a análise das variabilidades de curto prazo (SD1) e de longo prazo (SD2) de 200 intervalos respiratórios consecutivos, como uma medida de estabilidade respiratória (Brennan, Palaniswami, & Kamen, 2001; Peng et al., 2011).

3.3.3. Avaliação dos efeitos do antagonismo de receptores P2X3 na sensibilidade do quimiorreflexo

Adicionalmente, em um grupo separado de animais ($n = 5$), um segundo protocolo experimental foi conduzido para se avaliar as respostas respiratórias à hipóxia ($10\%O_2/N_2$) antes, 10 e 20 minutos após a administração de AF-454. Brevemente, após registro de 5 minutos em condições de normóxia ($21\% O_2 /N_2$), o fluxo de entrada da câmara pletismográfica foi mudado para uma mistura hipóxica ($10\%O_2/N_2$) de forma que a concentração de $10\% O_2$ no interior da câmara foi atingido em aproximadamente 1 minuto. A partir de então, os parâmetros respiratórios (f_R , V_T e V_E) em resposta à hipóxia foram registrados durante 30 segundos. Em seguida, o fluxo de entrada foi novamente mudado para a mistura normóxica ($21\% O_2 /N_2$), a qual foi mantida por pelo menos 5 minutos, para recuperação. Os animais foram submetidos então à administração de AF-454 (10 mg/kg , s.c.) e após 10 e 20 minutos, a resposta respiratória à hipóxia foi novamente avaliada, como descrito anteriormente.

3.3.4. Imunofluorescência para localização dos receptores P2X3 no corpúsculo carotídeo

Os ratos foram eutanasiados por meio de sobredose de anestésico (Ketamina, 60 mg/kg , Vetalar, Zoetis, London, UK). Com o auxílio de um microscópio (*M80, Leica Microsystems*), as bifurcações carotídeas foram extraídas e cuidadosamente dissecadas de modo a remover tecidos adiposos e conjuntivos, preservando os corpúsculos carotídeos intactos. As bifurcações carotídeas foram fixadas em metanol/DMSO em uma proporção de 4:1. O protocolo de imunofluorescência utilizado foi o mesmo descrito previamente por Pijacka et al., (2016). Resumidamente, as bifurcações da carótida foram incubadas em solução de soro de cabra (10%) e saponina (0,1%, *Sigma-Aldrich, UK*), à temperatura de 4°C , *overnight*. Em seguida, foram transferidas para uma solução de soro de cabra (2%) contendo os anticorpos primários anti-P2X3 (1:25; APR026AN0202, produzido em coelho, Alomone, Israel) e anti-tirosina hidroxilase (1:25; F-11, sc-25269, produzido em camundongo, *Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA*), nos quais permaneceram

incubadas à 4° C, *overnight*. As bifurcações carotídeas foram então lavadas em PBS (1X) 4 vezes, por 10 minutos cada lavagem, à temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram incubadas em anticorpos secundários, à temperatura ambiente, por 1 hora. A marcação para P2X3 foi visualizada utilizando um anticorpo secundário anti-coelho (*Alexa Fluor 488, Thermo Fisher Scientific, UK*) e tirosina hidroxilase, com a utilização de um anticorpo secundário anti-camundongo (*Alexa Fluor 594, Thermo Fisher Scientific, UK*). As bifurcações carotídeas foram montadas sobre lâminas utilizando-se um meio de montagem (*Vectashield, H-1000, Vector Laboratories, UK*). As lâminas foram avaliadas e as imagens foram adquiridas por meio de um microscópio (*DFC365FX, Leica Microsystems*).

3.3.5. Análise estatística

Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar a distribuição dos dados. As comparações dos valores médios de f_R , V_T , V_E , SD1 e SD2, nos períodos antes, 10 minutos e 20 minutos após a administração de AF-454, em condições basais ou em resposta à hipóxia foram realizadas por meio do teste ANOVA one-way para medidas repetidas com pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *SigmaStat 3.5 software (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA)* e os gráficos foram gerados por meio do programa *Graphpad Prism 5.0 (Graphpad, San Diego, CA, EUA)*.

4. RESULTADOS

4.1. Respostas hemodinâmicas obtidas com estimulação elétrica do seio carotídeo: papel dos corpúsculos carotídeos

Os parâmetros hemodinâmicos (PAS, PAD, PAM e FC) dos animais pertencentes aos grupos CONT, QUIMIO-X, BARO-X e TOTAL-X, em condições basais, estão apresentados na Tabela 1. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, demonstrando que a inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), a inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e a inativação concomitante dos corpúsculos e dos barorreceptores carotídeos (TOTAL-X) não afeta a PA e a FC de ratos *Wistar* adultos jovens em condições basais.

Tabela 1. Valores hemodinâmicos basais dos animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

	CONT (n = 7)	QUIMIO-X (n = 7)	BARO-X (n = 6)	TOTAL-X (n = 7)
PAS	117 ± 3	122 ± 5	128 ± 3	116 ± 4
PAD	89 ± 2	86 ± 3	90 ± 2	84 ± 2
PAM	103 ± 2	102 ± 3	107 ± 3	99 ± 2
FC	369 ± 10	352 ± 15	343 ± 9	347 ± 8

PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica; PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca.

O padrão das respostas hemodinâmicas causadas pela ESC em ratos acordados, pertencentes aos 4 grupos estudados (CONT, QUIMIO-X, BARO-X e TOTAL-X), pode ser observado nos traçados ilustrativos da Figura 3. A ESC causou respostas hipotensoras nos grupos CONT (3A, painel superior) e QUIMIO-X (3B, painel superior); resposta hipertensiva no grupo BARO-X (3C, painel superior), porém, não afetou a PA no grupo TOTAL-X (3D, painel superior). Em relação às respostas da FC à ESC, os grupos QUIMIO-X e BARO-X apresentaram notável bradicardia (3B e 3C, painéis inferiores, respectivamente); por outro lado, os grupos CONT e TOTAL-X não apresentaram alterações da FC durante a ESC (3A e 3D, painéis inferiores, respectivamente).

Figura 3. Traçados ilustrativos da pressão arterial pulsátil (traçado preto, painel superior), pressão arterial média (traçado branco, painel superior), e frequência cardíaca (painel inferior) de ratos acordados, em condições basais e sob estimulação elétrica do seio carotídeo (5 V; 1 ms; 90 Hz) durante 20 segundos. A: Grupo controle (CONT); B: Grupo com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); C: Grupo com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X); D: Grupo com inativação concomitante dos corpúsculos e dos barorreceptores carotídeos (TOTAL-X). PAP: Pressão arterial pulsátil; FC: Frequência cardíaca; ESC: Estimulação elétrica do seio carotídeo.

Os dados agrupados, demonstrando as respostas da PAM frente às diferentes frequências de ESC (15, 30, 60 e 90 Hz), nos 4 grupos estudados (CONT, QUIMIO-X, BARO-X e TOTAL-X) estão apresentados na Figura 4. Os grupos CONT e QUIMIO-X apresentaram respostas hipotensoras em todas as frequências de ESC, indicando efetiva ativação do barorreflexo em ambos os grupos. Ao contrário, a inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X) resultou em aumentos da PAM em todas as frequências de ESC, denotando ativação exclusiva dos corpúsculos carotídeos. Na ausência dos corpúsculos carotídeos, e dos barorreceptores carotídeos (TOTAL-X), a PAM não foi afetada pela ESC em nenhuma das frequências testadas.

A inativação dos quimiorreceptores carotídeos (QUIMIO-X), possibilitando a ativação exclusiva dos barorreceptores carotídeos, resultou em amplificação das respostas hipotensoras à ESC, em comparação ao grupo CONT, nas frequências de 60 e 90 Hz ($P < 0,05$). Esses dados indicam que os corpúsculos carotídeos são, também, ativados durante a ESC em animais controle (CONT), resultando em atenuação da resposta barorreflexa. As respostas hipertensivas observadas no grupo BARO-X foram, significativamente, diferentes dos grupos CONT e QUIMIO-X, em todas as frequências de estimulação ($P < 0,05$). As respostas do grupo TOTAL-X foram, significativamente, diferentes do grupo QUIMIO-X nas frequências de 15 e 30 Hz ($P < 0,05$); e significativamente diferentes em comparação aos outros 3 grupos nas frequências de 60 e 90 Hz ($P < 0,05$).

Figura 4. Respostas da pressão arterial média (Δ PAM) à estimulação elétrica (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequências: 15, 30, 60 e 90 Hz; Duração do estímulo: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados. * $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle (CONT); † $P < 0,05$ em comparação ao grupo com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); ‡ $P < 0,05$ em comparação ao grupo com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X).

As respostas da FC às diferentes frequências de ESC (15, 30, 60 e 90 Hz), nos 4 grupos estudados (CONT, QUIMIO-X, BARO-X e TOTAL-X) foram, também, avaliadas, e estão representadas na figura 5. Os grupos CONT e TOTAL-X não apresentaram alterações significativas da FC em nenhuma das frequências de ESC utilizadas. Em contrapartida, os grupos QUIMIO-X e BARO-X apresentaram respostas bradicárdicas significativas.

Figura 5. Respostas da frequência cardíaca (Δ FC) à estimulação elétrica (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequências: 15, 30, 60 e 90 Hz; Duração do estímulo: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados. * $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle (CONT); † $P < 0,05$ em comparação ao grupo com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); ‡ $P < 0,05$ em comparação ao grupo com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X).

Os dados incluindo as respostas da PAM às várias frequências de ESC (15, 30, 60 e 90 Hz) em comparação aos respectivos valores basais, nos 4 grupos estudados (CONT, QUIMIO-X, BARO-X e TOTAL-X), estão sumarizados na Figura 6. Observa-se que a ESC causou quedas substanciais na PAM nos grupos CONT e QUIMIO-X; enquanto que nas frequências de 60 e 90 Hz as respostas hipotensoras foram mais pronunciadas no grupo com inativação dos quimiorreceptores carotídeos (QUIMIO-X) em comparação ao grupo CONT ($P < 0,05$). Por outro lado, a ESC aumentou a PAM no grupo com ausência dos barorreceptores (BARO-X), em todas as frequências de estimulação; essas respostas foram significativamente diferentes das respostas dos grupos CONT e QUIMIO-X ($P < 0,05$). Nota-se, também, que a inativação concomitante dos quimiorreceptores e dos barorreceptores carotídeos (TOTAL-X) aboliu as respostas da PAM, em todas as frequências de ESC.

Figura 6. Respostas da pressão arterial média (Δ PAM) às várias frequências de estimulação elétrica (15, 30, 60 e 90 Hz; Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Duração do estímulo: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados. * $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle (CONT); † $P < 0,05$ em comparação ao grupo com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); ‡ $P < 0,05$ em comparação ao grupo com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X).

As respostas hemodinâmicas individuais às diferentes frequências de ESC, dos animais pertencentes aos 4 grupos estudados, estão apresentadas nas figuras 7 (15 Hz), 8 (30 Hz), 9 (60 Hz) e 10 (90 Hz).

15 Hz

Figura 7. Valores individuais das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e das respostas da frequência cardíaca (Δ FC) à estimulação elétrica (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 15 Hz; Duração: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados pertencentes aos grupos: controle (CONT); com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X); com inativação dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

Figura 8. Valores individuais das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e das respostas da frequência cardíaca (Δ FC) à estimulação elétrica (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 30 Hz; Duração: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados pertencentes aos grupos: controle (CONT); com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X); com inativação dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

Figura 9. Valores individuais das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e das respostas da frequência cardíaca (Δ FC) à estimulação elétrica (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 60 Hz; Duração: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados pertencentes aos grupos: controle (CONT); com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X); com inativação dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

Figura 10. Valores individuais das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e das respostas da frequência cardíaca (Δ FC) à estimulação elétrica (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 90 Hz; Duração: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados pertencentes aos grupos: controle (CONT); com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X); com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X); com inativação dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

4.2. Respostas respiratórias provocadas pela estimulação elétrica do seio carotídeo: papel dos corpúsculos carotídeos

Os parâmetros respiratórios (f_R , V_T e V_E) dos animais pertencentes aos grupos CONT e QUIMIO-X, em condições basais, estão apresentados na Tabela 2. Não foram encontradas diferenças entre os dois grupos, demonstrando que a inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), não afeta a respiração de ratos *Wistar* adultos jovens em condições basais.

Tabela 2. Valores respiratórios basais dos animais dos grupos controle (CONT) e com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X).

	CONT (n = 7)	QUIMIO-X (n = 7)
f_R (cpm)	89 ± 9	93 ± 7
V_T (mL/kg)	$9,9 \pm 1$	$8,8 \pm 1$
V_E (mL/kg/min)	894 ± 147	815 ± 60

f_R : Frequência respiratória; V_T : Volume corrente; V_E : Volume minuto.

Além de respostas hemodinâmicas, a ESC causou, também, efeitos sobre os parâmetros respiratórios de ratos acordados, como pode ser observado pelos traçados pletismográficos ilustrados na Figura 11. Em animais do grupo controle (CONT) a ESC aumentou tanto o volume corrente, como pode ser constatado pelo aumento da amplitude do registro pletismográfico, como, também, a frequência respiratória (Figura 11A). Essas respostas foram abolidas pela inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X; Figura 11B) demonstrando que a ativação dos mesmos durante a ESC não afeta somente os parâmetros hemodinâmicos, mas causa, também, aumento da ventilação.

Figura 11. Traçados ilustrativos dos registros pletismográficos (deflexões de voltagem) em condições basais (Basal) e durante a estimulação elétrica do seio carotídeo (ESC) [intensidade de 3 V, largura de pulso 1 ms e frequência de 30 Hz]. A: Grupo controle (CONT); B: Grupo com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X).

Os dados agrupados dos grupos CONT e QUIMIO-X mostrando as alterações da f_R , do V_T e do V_E em resposta às diferentes frequências de ESC (15, 30, 60 e 90 Hz) são apresentados na figura 12. A ESC causou aumentos na f_R em todas as frequências de ESC no grupo CONT. Essas respostas foram significativamente reduzidas ($P < 0,05$) no grupo com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), demonstrando que a ESC leva à ativação dos corpúsculos carotídeos causando aumento na f_R em animais intactos (figura 12A). Em relação às respostas do V_T à ESC, o grupo CONT apresentou aumentos significativos em todas as frequências avaliadas. Por outro lado, a inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X) praticamente aboliu essas respostas, sobretudo nas frequências de 30, 60 e 90 Hz ($P < 0,05$); confirmando o papel dos corpúsculos carotídeos no aumento da ventilação induzido pela ESC em animais controle (CONT), como demonstrado na Figura 12B. Como esperado, a V_E , obtida pelo produto entre f_R e V_T também aumentou em resposta a todas as frequências de ESC nos animais do grupo CONT (Figura 12C). Em concordância com os parâmetros anteriores, os animais do grupo QUIMIO-X apresentaram atenuação das respostas de V_E , em comparação ao grupo CONT ($P < 0,05$) em todas as frequências de ESC.

Figura 12. Respostas da frequência respiratória (ΔfR ; A), volume corrente (ΔV_T ; B) e volume minuto (ΔV_E ; C) à estimulação elétrica (Intensidade: 3 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequências: 15, 30, 60 e 90 Hz; Duração do estímulo: 20 s) do seio carotídeo em ratos acordados pertencentes aos grupos controle (CONT) e com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X). * $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle.

4.3. Efeitos do antagonismo dos receptores P2X3 sobre os parâmetros respiratórios, sensibilidade do quimiorreflexo periférico, e ocorrência de apneias em ratos neonatos

Verificou-se, por meio da técnica de imunofluorescência, que as células glomus ou células do tipo I do corpúsculo carotídeo de ratos (positivas para tirosina hidroxilase) expressam receptores purinérgicos P2X3 como demonstrado na Figura 13.

Figura 13. Imunofluorescência ilustrando a co-localização de tirosina hidroxilase (TH; vermelho) e receptores P2X3 (P2X3; verde) no corpúsculo carotídeo de ratos. A barra horizontal equivale a 10 μm .

O antagonismo agudo dos receptores P2X3 por meio do composto AF-454 não afetou os parâmetros respiratórios (f_R , V_T e V_E) de ratos recém-nascidos como representado pelos traçados da figura 14A e demonstrado na Tabela 3. Entretanto, o antagonismo dos receptores P2X3 reduziu a ocorrência de apneias em ratos recém-nascidos (Figura 14B).

Figura 14. A: Traçados pleetismográficos ilustrativos do período de 1 minuto da respiração de um mesmo rato antes da administração de AF-454 (traçado superior), 10 minutos (traçado intermediário) e 20 minutos (traçado inferior) após a administração de AF-454 (10 mg/kg, s.c.). B: Ocorrência de apneias (número de apneias/10 minutos; n=7) antes da administração de AF-454, 10 minutos e 20 minutos após a administração de AF-454 (10 mg/kg, s.c.). *P < 0,05 – em relação ao período Pré - AF-454. u.a. unidades arbitrárias.

A quantificação dos parâmetros respiratórios (f_R , V_T e V_E) confirmou que o antagonismo agudo dos receptores P2X3 com AF-454 não afetou significativamente a respiração de ratos recém-nascidos (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros respiratórios mensurados antes, 10 e 20 minutos após a administração de AF-454, ou veículo, em ratos neonatos.

	AF-454 (n=7)			Veículo (n=5)		
	Basal	10 min	20 min	Basal	10 min	20 min
f_R (cpm)	104 ± 5	104 ± 5	101 ± 7	99 ± 6	94 ± 4	90 ± 6
V_T (mL/kg)	8.5 ± 0.5	9.1 ± 0.8	9 ± 1	9.5 ± 0.9	10.1 ± 0.8	10.4 ± 1.5
V_E (mL/kg/min)	892 ± 88	945 ± 127	940 ± 152	953 ± 112	984 ± 114	984 ± 172

f_R : Frequência respiratória; V_T : Volume corrente; V_E : Volume minuto.

A administração de AF-454 reduziu a variabilidade respiratória como pode ser verificado na figura 15. Nos painéis A, B e C, os *Plots* de Poincaré sugerem que 10 e 20 minutos após a administração de AF-454 a variabilidade dos intervalos respiratórios é menor do que antes da administração do composto. Além disso, a quantificação da variabilidade de curto prazo (SD1) apresentada no painel D, mostra que o AF-454 reduziu o SD1, significativamente tanto 10 como 20 minutos após sua administração ($P < 0,05$).

Figura 15. A, B, C: Plots de Poincaré demonstrando a variabilidade dos intervalos respiratórios em um mesmo rato antes (A), 10 minutos (B) e 20 minutos após a administração de AF-454 (C). D, E: Dados agrupados da variabilidade de curto prazo (SD1; D) e da variabilidade de prazo (SD2; E) da respiração antes, 10 e 20 minutos após a administração de AF-454. * $P < 0,05$ – em comparação ao período Pré-AF-454.

O antagonismo agudo dos receptores P2X3, praticamente, aboliu as respostas à exposição aguda à hipóxia (10% O₂); reduzindo de forma significativa as alterações da frequência respiratória (Δf_R , Figura 16A) aos 10 e 20 minutos após a administração de AF-454 ($P < 0,001$) e, também, as alterações do volume minuto (ΔV_E , Figura 16C) aos 10 e 20 minutos após a administração de AF-454 ($P < 0,01$). Além disso, o antagonismo agudo dos receptores P2X3 resultou em uma tendência à redução das alterações do volume corrente (ΔV_T , 16B) em resposta à exposição aguda à hipóxia ($P = 0,1$).

Figura 16. Respostas da frequência respiratória (Δf_R), volume corrente (ΔV_T) e volume minuto (ΔV_E) à exposição aguda (1 minuto) à hipóxia (10% O_2) antes da administração de AF-454 (Pré - AF-454), 10 e 20 minutos após a administração de AF-454 (10 min pós - AF-454 e 20 min pós - AF-454, respectivamente). ** $P < 0.01$ ou *** $P < 0.001$ – em comparação ao período Pré - AF-454.

5. DISCUSSÃO

A técnica pioneira de ESC em ratos acordados, desenvolvida no presente estudo, deu origem a um primeiro conjunto de dados, os quais foram publicados na revista científica *Hypertension* (Katayama et al., 2015). O objetivo principal no desenvolvimento desta técnica foi o de mimetizar a abordagem de TAB, utilizada primordialmente no tratamento de pacientes com hipertensão resistente ao tratamento farmacológico (Bisognano et al., 2011; De Leeuw et al., 2017; Tordoir et al., 2007), e, também, no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca (Grassi et al., 2016; Gronda et al., 2014). Embora estes estudos clínicos tenham demonstrado que a TAB seja eficiente quanto à redução da PA de pacientes hipertensos resistentes (Bisognano et al., 2011; De Leeuw et al., 2017; Scheffers et al., 2010; Tordoir et al., 2007), os mecanismos envolvidos nessa abordagem, e suas possíveis limitações, precisam ser melhor explorados. Nesse sentido, a técnica de ESC em ratos acordados surge como um novo modelo experimental, o qual possibilita estudos mais pormenorizados dos mecanismos envolvidos na TAB. De fato, os resultados obtidos no presente estudo, mostraram que a técnica de ESC, em ratos acordados, é eficiente em reduzir a PA em animais controle (Katayama et al., 2015), assim como observado, previamente, em cães (Lohmeier et al., 2004) e seres humanos (Scheffers et al., 2010; Tordoir et al., 2007).

Dentre os achados principais do presente estudo destaca-se que a ESC em ratos acordados ativou não somente o barorreflexo carotídeo, mas, também, o quimiorreflexo carotídeo (Katayama et al., 2015). Essa possibilidade havia sido alertada por Zucker et al. (2007), os quais estudaram os efeitos da ESC em cães com insuficiência cardíaca. Porém, no estudo de Zucker et al. (2007) a possível ativação do quimiorreflexo carotídeo durante a ESC não foi avaliada. Dessa forma, parte do presente estudo foi dedicada a investigar esta hipótese, utilizando-se a ESC em diferentes grupos experimentais:

- 1) Ratos com a bifurcação carotídea intacta (grupo CONT), possibilitando a ativação concomitante do barorreflexo e do quimiorreflexo carotídeos;
- 2) Ratos com inativação dos corpúsculos carotídeos (grupo QUIMIO-X), possibilitando a ativação exclusiva do barorreflexo carotídeo;
- 3) Ratos com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), possibilitando a ativação exclusiva do quimiorreflexo carotídeo;

- 4) Ratos com inativação simultânea dos barorreceptores e quimiorreceptores carotídeos, nos quais a ESC não promoveria a ativação de nenhum dos componentes reflexos.

Assim, ao se avaliar as respostas hemodinâmicas (PA e FC) à ESC em cada grupo experimental, foi possível se estimar a participação individualizada dos barorreceptores carotídeos, dos quimiorreceptores carotídeos, e de ambos, nas alterações de PA e FC causadas pela ESC. Os resultados obtidos mostraram que a ESC em animais intactos (CONT), causou significativa resposta hipotensora. Essa resposta hipotensora foi potencializada, de forma significativa, pela inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), particularmente nas frequências de 60 e 90 Hz. Estes dados indicam que no grupo CONT a ativação simultânea dos quimiorreceptores carotídeos, durante a ESC, atenuou a resposta hipotensora causada pela ativação dos barorreceptores carotídeos. Adicionalmente, a inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X) promoveu significativa resposta hipertensora, mostrando que os corpúsculos carotídeos são ativados durante a ESC em ratos. No que diz respeito às respostas reflexas da FC durante a ESC, o grupo CONT não apresentou alterações da mesma, enquanto que os grupos QUIMIO-X e BARO-X apresentaram significativa bradicardia. O grupo TOTAL-X não apresentou nenhuma alteração hemodinâmica (PA e FC) durante a ESC, ilustrando a importância das aferências baro- e quimiorreceptoras da bifurcação carotídea, na determinação das respostas hemodinâmicas à ESC.

Está bem descrito na literatura que os barorreceptores, quando ativados por exemplo por aumentos na PA, transmitem seus impulsos nervosos por meio de fibras que trafegam pelo nervo depressor aórtico no caso dos barorreceptores aórticos, e pelo nervo de Hering no caso dos barorreceptores carotídeos. O nervo depressor aórtico é uma ramificação do vago e, o nervo de Hering, uma ramificação do glossofaríngeo. Por meio desses nervos, as fibras barorreceptoras terminam no núcleo do trato solitário (NTS), fazendo sinapse com neurônios excitatórios, os quais, por sua vez, se projetam a diferentes regiões com envolvimento autonômico. Na região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM), por exemplo, as projeções provenientes do NTS fazem sinapse com neurônios inibitórios que se projetam à região rostral ventrolateral do bulbo (RVLM), inibindo neurônios pré-simpáticos. Já no núcleo ambíguo (NA), as fibras oriundas do NTS excitam neurônios

parassimpáticos cardíacos. Como resultado desta inibição simpática e excitação parassimpática, a ativação do barorreflexo causa diminuição da PA e da FC (Andresen et al., 2001; Freet et al., 2013; Krieger et al., 1982; Wang et al., 2006).

Por outro lado, a ativação dos quimiorreceptores carotídeos, resulta em simpato-excitação, embora também produza bradicardia, assim como ocorre durante a ativação dos barorreceptores. Os quimiorreceptores carotídeos são estimulados em condições de hipóxia, detectada por células especializadas conhecidas como *glomus* ou tipo I. Ao detectarem quedas na PO_2 , essas células liberam neurotransmissores que excitam fibras aferentes que trafegam pelo nervo de Hering, o qual é uma ramificação do glossofaríngeo, como mencionado anteriormente. Por meio desse nervo, os impulsos alcançam o SNC, especificamente o NTS, onde fazem a primeira sinapse com neurônios excitatórios. Esses neurônios se projetam para diferentes regiões do tronco cerebral promovendo ajustes cardiovasculares e respiratórios. A excitação de neurônios do RVLM, por exemplo, resulta em simpato-excitação e aumento da PA. Por outro lado, e de forma semelhante a que ocorre na ativação do barorreflexo, a excitação de neurônios parassimpáticos cardíacos, no NA, causa bradicardia. Adicionalmente, projeções enviadas a núcleos pontinos e bulbares resulta em aumento da ventilação (Braga et al., 2006; Costa et al., 2014; Franchini & Krieger, 1993; Freet et al., 2013).

Portanto, no presente estudo, embora as respostas de ativação do barorreflexo carotídeo (CONT e QUIMIO-X) e ativação do quimiorreflexo carotídeo (BARO-X) por meio da ESC estejam de acordo com as respostas reflexas fisiológicas descritas previamente, seria esperado que o grupo CONT apresentasse bradicardia. Entretanto, a ausência de resposta bradicárdica durante a ESC em ratos do grupo CONT corroboram os achados do estudo conduzido por Murata et al. (1999). Esses autores verificaram que a resposta bradicárdica reflexa provocada pela estimulação elétrica do nervo depressor aórtico, em ratos anestesiados, era inibida quando os quimiorreceptores carotídeos eram simultaneamente estimulados pela injeção de cianeto de sódio intracarotídea. Os autores concluíram que esse efeito inibitório, exercido pelo quimiorreflexo periférico sobre as respostas da FC durante a ativação do barorreflexo, ocorre centralmente; porém, o mesmo é dependente das aferências dos quimiorreceptores carotídeos (Murata et al., 1999). Corroborando estes achados (Murata et al., 1999), Somers et al. (1992) demonstraram a existência de uma interação entre barorreflexo e quimiorreflexo

periférico na regulação autonômica em humanos. Esses autores observaram que não só a resposta bradicárdica, mas também, a ativação simpática provocadas pela ativação do quimiorreflexo periférico, por meio de apneia voluntária, foram substancialmente atenuadas quando o barorreflexo carotídeo foi simultaneamente ativado pela manobra de sucção do pescoço (Virend Kristen Somers et al., 1992). Essa interação entre barorreflexo e quimiorreflexo periférico descritas por Murata et al. (1999) e Somers et al. (1992), portanto, pode explicar a ausência de bradicardia dos animais do grupo CONT, observada no presente estudo. Embora os mecanismos envolvidos em tal interação não estejam totalmente esclarecidos, a convergência das fibras aferentes dos barorreceptores e dos quimiorreceptores carotídeos em neurônios do NTS pode ser uma explicação plausível (Somers, Mark, & Abboud, 1991).

É interessante ressaltar que estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que a estimulação do barorreflexo aórtico, por meio da estimulação elétrica do nervo depressor aórtico (NDA) em ratos acordados, resultou em hipotensão e bradicardia (De Paula et al., 1999; Durand et al., 2011). É importante notar que nesta abordagem não há influência dos quimiorreceptores carotídeos, o que possibilita a ativação exclusiva do barorreflexo aórtico. O estudo de Durand et al. (2011) avaliou as respostas hemodinâmicas à estimulação elétrica do NDA em ratos normotensos ou com hipertensão arterial induzida por L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME). Além disso, investigaram o papel dos sistemas nervosos simpático e parassimpático nestas respostas hemodinâmicas do barorreflexo. Os autores observaram que as respostas hipotensoras foram maiores nos animais hipertensos, enquanto as respostas bradicárdicas à estimulação elétrica do NDA foram semelhantes em ambos os grupos. Os bloqueios farmacológicos de receptores muscarínicos, com metilatropina e de receptores adrenérgicos β -1 com atenolol, não afetaram as respostas hipotensoras à estimulação elétrica do NDA. Por outro lado, o tratamento com metilatropina atenuou as respostas bradicárdicas em ambos os grupos, enquanto o atenolol reduziu a magnitude das respostas bradicárdicas somente no grupo de animais hipertensos. O bloqueio farmacológico de receptores adrenérgicos α -1 com prazosin atenuou as respostas hipotensoras à estimulação elétrica do NDA em ambos os grupos e não afetou as respostas bradicárdicas nos dois grupos estudados. Por fim, Durand et al. (2011) avaliaram os efeitos do triplo bloqueio farmacológico (metilatropina + atenolol + prazosin) sobre as respostas

hemodinâmicas à estimulação elétrica do NDA. Os resultados mostraram que as respostas bradicárdicas à estimulação elétrica do NDA, em ambos os grupos, foram abolidas após o triplo bloqueio farmacológico. Entretanto, após o triplo bloqueio farmacológico, ambos os grupos ainda apresentaram uma resposta hipotensora residual frente à estimulação elétrica do NDA. Assim, o estudo de Durand et al. (2011) forneceu informações valiosas no que diz respeito aos mecanismos envolvidos nas respostas hemodinâmicas à ativação do barorreflexo por meio da estimulação elétrica do NDA, sugerindo que, nessa abordagem, embora a hipotensão e a bradicardia sejam resultantes de uma inibição simpática e de uma ativação parassimpática, existe o envolvimento de algum outro mecanismo vasodilatador que contribui para a resposta hipotensora.

Os resultados de Durand et al. (2011) relativos aos mecanismos envolvidos nas respostas hemodinâmicas à estimulação elétrica do NDA em ratos acordados estão de acordo com os resultados obtidos no estudo de Lohmeier et al. (2009). Estes autores também sugeriram a existência de outros mecanismos responsáveis pelo efeito hipotensor da TAB, além da inativação de receptores adrenérgicos pós-juncionais. Lohmeier et al. (2009) submeteram cães a um bloqueio adrenérgico farmacológico; os quais foram tratados com prazosin para bloqueio de receptores adrenérgicos do tipo α -1 e, com propranolol, para bloqueio de receptores adrenérgicos dos tipos β -1 e β -2. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais. Em um dos grupos, após 7 dias de tratamento com prazosin e propranolol, os cães foram submetidos à estimulação elétrica do seio carotídeo durante 7 dias, com a manutenção do bloqueio adrenérgico. Em outro grupo, os animais foram submetidos somente ao bloqueio adrenérgico. Os autores verificaram que nos cães submetidos, apenas, ao bloqueio adrenérgico, a PA foi reduzida de forma sustentada ao longo do estudo. Porém, no grupo de cães submetidos ao bloqueio adrenérgico combinado com estimulação elétrica do seio carotídeo, observou-se maior redução da PA, sugerindo que esse efeito adicional, independente de receptores adrenérgicos pós-juncionais, é devido à supressão da atividade simpática central, promovida pela estimulação elétrica do seio carotídeo (Lohmeier et al., 2009).

Assim, coerentemente com os trabalhos relatados acima (Durand et al., 2011; Lohmeier et al., 2009), o presente estudo contribui para o melhor entendimento dos possíveis mecanismos envolvidos na TAB. Enquanto os estudos conduzidos por

Durand et al. (2011) e Lohmeier et al. (2009) proveram informações relativas aos componentes eferentes e centrais do barorreflexo, quando o mesmo é ativado por estimulação elétrica do NDA ou ESC, o presente estudo focou em seus componentes sensores, especificamente, na ativação combinada de barorreceptores e quimiorreceptores carotídeos durante a ESC. Como mencionado anteriormente, Zucker et al. (2007) propuseram a hipótese de que embora tenham observado resposta predominantemente hipotensora e bradicárdica, a ESC em cães poderia estar ativando, simultaneamente, barorreceptores e quimiorreceptores carotídeos. Essa hipótese foi confirmada no presente estudo. As respostas hipotensoras à ESC foram potencializadas pela inativação cirúrgica dos quimiorreceptores carotídeos (QUIMIO-X), demonstrando que os mesmos atenuam a redução da PA à ESC em ratos CONT, provavelmente por um mecanismo simpato-excitatório (Katayama et al., 2015). Além disso, na segunda parte do presente estudo, animais CONT e QUIMIO-X foram submetidos à ESC (Intensidade: 3 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequências: 15, 30, 60 e 90 Hz; Duração de cada estímulo: 20 s) e tiveram os parâmetros respiratórios (f_R , V_T e V_E) mensurados. Foi observado que a ESC em animais CONT causa aumento da ventilação, evidenciado pelo aumento da f_R , do V_T e, conseqüentemente da V_E , coerente com a ativação dos quimiorreceptores carotídeos. Essas respostas respiratórias foram apreciavelmente reduzidas em animais com inativação dos quimiorreceptores carotídeos (QUIMIO-X), confirmando que os mesmos são ativados durante a ESC em animais CONT.

Os resultados do presente estudo não corroboram, por outro lado, o estudo clínico conduzido por Alnima et al. (2015), que teve, também, como objetivo investigar a possível co-ativação dos quimiorreceptores carotídeos durante a TAB em pacientes com hipertensão resistente. Estes autores avaliaram as respostas respiratórias à TAB aguda (2 – 4 minutos) de pacientes hipertensos resistentes à abordagem farmacológica, os quais haviam sido implantados com o sistema *Rheos* (Bisognano et al., 2011; Illig et al., 2006) para TAB. Foram utilizadas diversas combinações de parâmetros de TAB variando-se a frequência de estimulação entre 20 e 90 Hz e a intensidade entre 3 e 6 V, valores estes bem próximos dos parâmetros utilizados no presente estudo. Alnima et al. (2015) constataram que os pacientes não apresentaram nenhuma alteração respiratória significativa durante a TAB em nenhuma das diferentes combinações de parâmetros utilizadas; assim, estes autores sugeriram que a TAB em humanos, utilizando o sistema *Rheos* parece

não causar a ativação dos quimiorreceptores carotídeos. Entretanto, cabe ressaltar que embora estes autores (Alnima et al., 2015) não tenham observado evidências de ativação dos quimiorreceptores carotídeos, os mesmos não descartaram a possibilidade do sistema *Rheos* estar ativando terminações nervosas dos quimiorreceptores carotídeos (Alnima et al., 2015). Para tanto, estes autores mencionaram estudos nos quais a ativação simultânea do barorreflexo inibiu as projeções oriundas dos quimiorreceptores ao NTS (Mifflin, 1993), e, também, as respostas respiratórias provocadas pela ativação dos quimiorreceptores (Heistad et al., 1975). Estes resultados que mostram a interação entre o barorreflexo e o quimiorreflexo periférico, são, assim, corroborados pelos estudos de Murata et al. (1999) e Somers et al. (1992), discutidos previamente.

Em relação à discrepância observada entre os resultados do presente estudo, e os resultados do estudo de Alnima et al. (2015), no que tange às respostas respiratórias à TAB, alguns pontos devem ser levados em consideração. Primeiro, o posicionamento dos eletrodos para ESC, utilizado no presente estudo (Katayama et al., 2015), é diferente do sistema *Rheos* (Tordoir et al., 2007), utilizado no estudo de Alnima et al. (2015). Enquanto no presente estudo, o pequeno eletrodo bipolar foi implantado restritamente ao redor do seio carotídeo, envolvendo, também, o nervo do seio carotídeo (Katayama et al., 2015), o sistema *Rheos* utiliza eletrodos maiores, em formato de luva, os quais envolvem a bifurcação carotídea, e não necessariamente os quimiorreceptores e suas aferências (Tordoir et al., 2007). Portanto, os diferentes tipos de eletrodo poderiam causar padrões distintos de ativação dos barorreceptores e/ou quimiorreceptores carotídeos durante a estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo. Segundo, embora a anatomia vascular, incluindo a bifurcação da carótida, seja similar entre ratos e humanos (Wang-Fischer, 2009), diferenças anatômicas que poderiam explicar a divergência entre os resultados observados no presente estudo e os resultados de Alnima et al. (2015) não podem ser completamente descartadas.

É importante destacar que o modelo animal de ESC desenvolvido no presente estudo, possibilitou o uso abordagens que não seriam possíveis em humanos, contribuindo para uma compreensão mecanística mais profunda. Além da inativação dos quimiorreceptores carotídeos (QUIMIO-X) que permitiu verificar o quanto os mesmos poderiam contribuir para as respostas hemodinâmicas e ventilatórias à ESC; a inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), possibilitou avaliar se a

ESC, realmente, ativa os quimiorreceptores carotídeos. De fato, a ativação exclusiva dos quimiorreceptores carotídeos durante a ESC, no grupo BARO-X, foi confirmada pelas respostas hipertensoras e bradicárdicas, características do quimiorreflexo periférico. Essa capacidade paradoxal do quimiorreflexo periférico em ativar uma descarga simpática para os vasos de resistência causando hipertensão, e, ao mesmo tempo, uma descarga parassimpática para o coração resultando em bradicardia, já está bem descrita, tendo sido observada em animais (Franchini & Krieger, 1993) e humanos (Somers et al., 1992). Franchini & Krieger (1993) demonstraram que a ativação do quimiorreflexo periférico por meio da administração intravenosa de cianeto de potássio (KCN) causou respostas hipertensivas, bradicárdicas e taquipneicas. Adicionalmente, Franchini & Krieger (1993) demonstraram que essas respostas são abolidas pela desnervação sino-aórtica e pela desnervação do carótídea descritas por Krieger, (1964). Em humanos, Somers et al. (1992) demonstraram que a ativação do quimiorreflexo periférico, tanto por meio da manobra de apneia voluntária, como por exposição à hipóxia (10% O₂, 90% N₂), resultaram em aumento da atividade simpática (mensurada por microneurografia do nervo peroneiro), aumento da PA, e redução da FC. Como mencionado anteriormente, a ativação do quimiorreflexo periférico além de causar respostas hemodinâmicas (hipertensão e bradicardia) promove, também, respostas respiratórias (aumento da ventilação).

Com base nos achados do presente estudo e em resultados de estudos prévios, a remoção cirúrgica dos corpúsculos carotídeos pode ser considerada uma estratégia terapêutica no tratamento de diversas doenças, sobretudo as caracterizadas por hiperatividade simpática (Paton et al., 2013). O presente estudo mostrou que a inativação dos corpúsculos carotídeos potencializa os efeitos hipotensores da ESC em ratos (Katayama et al., 2015). Esta observação poderia ter aplicação benéfica na prática clínica, como coadjuvante na TAB em pacientes hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico. Além disso, Abdala et al. (2012) e McBryde et al. (2013) demonstraram que a remoção bilateral dos corpúsculos carotídeos, *per se*, reduz a atividade simpática, e a PA, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Adicionalmente, a destruição criogênica bilateral dos corpúsculos carotídeos, em coelhos com insuficiência cardíaca, reduziu a atividade simpática renal, a ocorrência de arritmias cardíacas, e melhorou a estabilidade respiratória e a função cardíaca (Marcus et al., 2014). Embora os

resultados desses estudos sejam promissores, a translação para a prática clínica carece, ainda, de cautelosa investigação. Nesse sentido, em estudo recente, investigamos o papel dos corpúsculos carotídeos nas respostas cardiovasculares, e respiratórias, a diferentes tipos de estressores, tais como exercício físico (10 m/min durante 10 min), hipóxia (10% O₂) e hipercapnia (7% CO₂) em SHR (Pijacka et al., 2018, no prelo). Os resultados obtidos mostraram que a remoção cirúrgica dos corpúsculos carotídeos aboliu as respostas pressóricas à hipóxia, e potencializou as respostas pressóricas frente à hipercapnia; indicando que os corpúsculos carotídeos são essenciais na regulação da PA nessas condições de estresse em SHR. Essa inabilidade de responder, adequadamente, à hipóxia e à hipercapnia, após a remoção cirúrgica dos corpúsculos carotídeos, pode ter consequências indesejáveis, causando, por exemplo, lesões em órgãos-alvo e alterações indevidas a sistemas fisiológicos (Pijacka et al. 2018, no prelo). Portanto, a remoção cirúrgica dos corpúsculos carotídeos, e suas consequências, necessita ser melhor investigada. Nesse contexto, métodos para modulação da função do corpúsculo carotídeo, sem a necessidade de sua remoção cirúrgica, podem se tornar alternativa desejável.

Nesse sentido, Pijacka et al. (2016) mostraram que o antagonismo farmacológico de receptores purinérgicos P2X3 pode modular a função do corpúsculo carotídeo, inibindo a sua atividade em SHR. Sabe-se que o ATP é um importante neurotransmissor excitatório envolvido no processo de transdução química que ocorre no quimiorreflexo periférico. Em uma situação de hipóxia, as células *glomus* do corpúsculo carotídeo liberam ATP, o qual excita aferências quimiorreceptoras via receptores P2X2 e P2X3. Adicionalmente, o ATP pode ativar receptores P2Y2 em células do tipo II do corpúsculo carotídeo, causando um aumento do Ca²⁺ intracelular, determinando a liberação de ATP adicional, o qual poderia potencializar a sinalização excitatória (Nurse, 2014). Nesse sentido, Pijacka et al. (2016) mostraram que no SHR, o antagonismo de receptores P2X3 reduziu a excitabilidade de neurônios do gânglio petroso, os quais recebem fibras aferentes dos corpúsculos carotídeos, tanto em condições basais, como em situação de estimulação do quimiorreflexo periférico com cianeto de sódio (NaCN). Além disso, os autores demonstraram que essa redução da hipertonicidade e hiper-reflexia do corpúsculo carotídeo, resultaram em diminuição da atividade simpática, e da PA, em SHR. Pijacka et al. (2016), sugerem, portanto, que o antagonismo de receptores P2X3 poderia ser considerado como nova abordagem terapêutica no tratamento da

hipertensão arterial; sobretudo naqueles pacientes que apresentam aumento na atividade do corpúsculo carotídeo e hiperatividade simpática (Pijacka et al., 2016). Entretanto, mais estudos são necessários para o melhor entendimento dos efeitos do antagonismo de receptores P2X3 em outras condições patológicas e, também, em condições fisiológicas. Nesse sentido, no presente estudo, foram avaliados os efeitos do antagonismo agudo de receptores P2X3 sobre a respiração, a ocorrência de apneias, e sobre a sensibilidade do quimiorreflexo em ratos *Wistar* recém-nascidos.

No presente estudo, foi constatado, por meio de imunofluorescência que ratos *Wistar* recém-nascidos (P0) expressam receptores P2X3 no corpúsculo carotídeo, e que estes receptores se encontram co-localizados com células *glomus* (células tipo I); possibilitando uma potencial modulação da função dessas células com a utilização de um antagonista seletivo de receptores P2X3 (AF-454). Em condições basais, a administração do AF-454 não causou nenhum efeito significativo sobre os parâmetros respiratórios avaliados (f_R , V_T e V_E), sugerindo que os receptores P2X3 no corpúsculo carotídeo não contribuem para a respiração basal de ratos recém-nascidos. Por outro lado, o AF-454 praticamente aboliu as respostas respiratórias à hipóxia (10% O_2), indicando redução na sensibilidade do quimiorreflexo periférico. Esses achados, por outro lado, não se coadunam, totalmente, com os resultados observados por Niane et al. (2011). Embora esses autores também tenham sugerido que os receptores P2X3 no corpúsculo carotídeo contribuem para a sensibilidade do quimiorreflexo periférico em ratos recém-nascidos; estes autores (Niane et al., 2011) também sugeriram que estes receptores, agindo no corpúsculo carotídeo, contribuem para a respiração basal destes animais. Estes autores também mostraram que tanto o antagonismo inespecífico de receptores P2X2/P2X3 com suramina, bem como o antagonismo seletivo de receptores P2X3 com A-317491, deprimiram a respiração basal e atenuaram as respostas à hipóxia de ratos recém-nascidos. Uma hipótese para explicar essa discrepância entre os resultados do presente estudo e os resultados de Niane et al. (2011), são as diferentes idades dos animais estudados: P0 no presente estudo e P4, P7, P12 e P21 no estudo de Niane et al. (2011).

Adicionalmente, o presente estudo demonstrou que o antagonismo de receptores P2X3 melhorou a estabilidade respiratória, e reduziu a ocorrência de apneias em ratos recém-nascidos, sugerindo, então, que os corpúsculos carotídeos

podem contribuir para a fisiopatologia da apneia da prematuridade. Embora os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da apneia da prematuridade não estejam completamente esclarecidos, evidências apontam para o aumento na sensibilidade do quimiorreflexo periférico como um destes potenciais mecanismos (Cardot et al., 2007; Martin & Wilson, 2012; Nock et al., 2004). Em estudos conduzidos em humanos, Nock et al. (2004) verificaram que a resposta respiratória à hipóxia moderada (15% O₂) foi mais pronunciada nos recém-nascidos, os quais apresentaram maior ocorrência de apneias; indicando, assim, uma relação entre o aumento da sensibilidade do quimiorreflexo periférico e a ocorrência de apneias em recém-nascidos. Além da hiper-reflexia do corpúsculo carotídeo se constituir em potencial mecanismo envolvido na fisiopatologia da apneia da prematuridade (Nock et al., 2004), Cardot et al. (2007) demonstraram que a inativação dos corpúsculos carotídeos, por meio da exposição à hiperóxia (100% O₂) causou maior redução da ventilação minuto em recém-nascidos com maior ocorrência de apneias. Evidenciando, assim, a relação entre hipertonicidade do corpúsculo carotídeo e ocorrência de apneias.

Por fim, as recentes evidências apresentadas nesta Tese de Doutorado e no estudo de Pijacka et al. (2016), mostram que o antagonismo de receptores P2X3 se constitui em potencial ferramenta, não-invasiva e reversível, para inibição do corpúsculo carotídeo. Esses achados podem contribuir para o desenvolvimento de terapias voltadas para o tratamento de doenças caracterizadas por aumento exagerado da atividade do corpúsculo carotídeo, podendo levar à distúrbios cardiovasculares, respiratórios e metabólicos (Paton et al., 2013). Apesar das evidências promissoras, estudos avaliando os efeitos do antagonismo crônico de receptores P2X3 em condições fisiológicas e outras condições patológicas são, ainda, necessários.

6. CONCLUSÕES

A técnica de ESC em ratos acordados, desenvolvida no presente estudo, demonstrou-se uma ferramenta muito útil, podendo ser utilizada como um modelo experimental para o estudo dos mecanismos envolvidos na TAB. Os resultados obtidos demonstraram que a ESC em ratos acordados, além de ativar o barorreflexo, ativou também o quimiorreflexo carotídeo, o que causou uma atenuação da resposta hipotensora. Adicionalmente, a ativação simultânea de barorreflexo e quimiorreflexo carotídeos durante a ESC, aboliu a resposta bradicárdica. Importaneamente, além das respostas hemodinâmicas, a ESC em ratos acordados causou aumento da ventilação, o qual foi atenuado pela inativação dos corpúsculos carotídeos, confirmando a ativação dos mesmos em animais controle. Esses achados podem fornecer informações importantes para a prática clínica, sobretudo no que diz respeito ao uso de dispositivos para TAB em pacientes com hipertensão resistente ao tratamento farmacológico.

Além disso, no presente estudo, foi demonstrado que o antagonismo farmacológico agudo de receptores P2X3, em ratos recém-nascidos, reduziu a ocorrência de apneias sem afetar os parâmetros respiratórios basais. Adicionalmente, reduziu a sensibilidade do quimiorreflexo, atenuando substancialmente as respostas respiratórias à hipóxia. Esses resultados sugerem que o antagonismo farmacológico de receptores P2X3 pode ser utilizado como uma ferramenta para modulação do corpúsculo carotídeo, diminuindo a sensibilidade do quimiorreflexo sem afetar o controle respiratório em condições basais.

REFERÊNCIAS

- Abdala, A. P., McBryde, F. D., Marina, N., Hendy, E. B., Engelman, Z. J., Fudim, M., ... Paton, J. F. R. (2012). Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. *The Journal of Physiology*, 590(17), 4269–4277.
- Acelajado, M. C., Pisoni, R., Dudenbostel, T., Dell'Italia, L. J., Cartmill, F., Zhang, B., ... Calhoun, D. A. (2012). Refractory hypertension: Definition, prevalence, and patient characteristics. *Journal of Clinical Hypertension*, 14(1), 7–12.
- Alnima, T., Goedhart, E. J. B. M., Seelen, R., Van Der Grinten, C. P. M., De Leeuw, P. W. & Kroon, A. A. (2015). Baroreflex Activation Therapy Lowers Arterial Pressure Without Apparent Stimulation of the Carotid Bodies. *Hypertension*, 65(6), 1217–1222.
- Andresen, M. C., Doyle, M. W., Jin, Y. H. & Bailey, T. W. (2001). Cellular mechanisms of baroreceptor integration at the nucleus tractus solitarius. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 940(0077–8923 (Print)), 132–41.
- Bakris, G. L., Townsend, R. R., Liu, M., Cohen, S. A., D'Agostino, R., Flack, J. M., ... Bhatt, D. L. (2014). Impact of renal denervation on 24-hour ambulatory blood pressure: Results from SYMPLICITY HTN-3. *Journal of the American College of Cardiology*, 64(11), 1071–1078.
- Bhatt, D. L., Kandzari, D. E., O'Neill, W. W., D'Agostino, R., Flack, J. M., Katzen, B. T., ... Bakris, G. L. (2014). A Controlled Trial of Renal Denervation for Resistant Hypertension. *New England Journal of Medicine*, 370(15), 1393–1401.
- Bilgutay, A. M. & Lillehei, C. W. (1965). Treatment of hypertension with an implantable electronic device. *JAMA*, 191, 649–53.
- Bisognano, J. D., Bakris, G., Nadim, M. K., Sanchez, L., Kroon, A. A., Schafer, J., ... Sica, D. A. (2011). Baroreflex activation therapy lowers blood pressure in patients with resistant hypertension: Results from the double-blind, randomized, placebo-controlled rheos pivotal trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(7), 765–773.
- Bloch, M. J. & Basile, J. N. (2012). The Rheos Pivotal Trial Evaluating Baroreflex Activation Therapy Fails to Meet Efficacy and Safety End Points in Resistant Hypertension: Back to the Drawing Board. *Journal of Clinical Hypertension*, 14(3), 184–186.
- Bolignano, D. & Coppolino, G. (2017). Cochrane corner: Renal denervation for resistant hypertension-a broken promise? *Heart*, 103(22), 1753–1756.
- Braga, V. A., Soriano, R. N. & Machado, B. H. (2006). Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Experimental Physiology*, 91(6), 1025–1031.
- Braunwald, E., Epstein, S. E., Glick, G., Wechsler, A. S. & Braunwald, N. S. (1967). Relief of Angina Pectoris by Electrical Stimulation of the Carotid-Sinus Nerves.

- New England Journal of Medicine*, 277(24), 1278–1283.
- Brennan, M., Palaniswami, M. & Kamen, P. (2001). Do existing measures of Poincaré plot geometry reflect nonlinear features of heart rate variability? *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 48(11), 1342–7.
- Burnier, M. (2017). Drug adherence in hypertension. *Pharmacological Research*, 125, 142–149.
- Calhoun, D. A., Jones, D., Textor, S., Goff, D. C., Murphy, T. P., Toto, R. D., ... Carey, R. M. (2008). Resistant Hypertension: Diagnosis, Evaluation, and Treatment: A Scientific Statement From the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*, 117(25), e510–e526.
- Cardot, V., Chardon, K., Tourneux, P., Micallef, S., Stéphan, E., Léké, A., ... Telliez, F. (2007). Ventilatory response to a hyperoxic test is related to the frequency of short apneic episodes in late preterm neonates. *Pediatric Research*, 62(5), 591–596.
- Carlsten, A., Folkow, B., Grimby, G., Hamberger, C. A. & Thulesius, O. (1958). Cardiovascular Effects of Direct Stimulation of the Carotid Sinus Nerve in Man. *Acta Physiologica Scandinavica*, 44(2), 138–145.
- Chow, C. K. (2013). Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension in Rural and Urban Communities in High-, Middle-, and Low-Income Countries.
- Conde, S. V, Monteiro, E. C., Rigual, R., Obeso, A. & Gonzalez, C. (2012). Hypoxic intensity: a determinant for the contribution of ATP and adenosine to the genesis of carotid body chemosensory activity. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 112(12), 2002–10.
- Costa, K. M., Accorsi-Mendonça, D., Moraes, D. J. A. & Machado, B. H. (2014). Evolution and physiology of neural oxygen sensing. *Frontiers in Physiology*, 5 AUG(August), 1–16.
- Davis, M. I., Fillion, K. B., Zhang, D., Eisenberg, M. J., Afilalo, J., Schiffrin, E. L. & Joyal, D. (2013). Effectiveness of renal denervation therapy for resistant hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(3), 231–241.
- De Leeuw, P. W., Bisognano, J. D., Bakris, G. L., Nadim, M. K., Haller, H. & Kroon, A. A. (2017). Sustained Reduction of Blood Pressure with Baroreceptor Activation Therapy: Results of the 6-Year Open Follow-Up. *Hypertension*, 69(5), 836–843.
- De Paula, P., Castania, J. A., Bonagamba, L. G. H., Salgado, H. C. & Machado, B. H. (1999). Hemodynamic responses to electrical stimulation of the aortic depressor nerve in awake rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 277(16), R31–R38.

- Dempsey, J. A., Xie, A., Patz, D. S. & Wang, D. (2014). Physiology in medicine: obstructive sleep apnea pathogenesis and treatment--considerations beyond airway anatomy. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 116(1), 3–12.
- Dibona, G. F. (2013). Sympathetic nervous system and hypertension. *Hypertension*, 61(3), 556–560.
- Drorbaugh, J. E. & Fenn, W. O. (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*, 16(1), 81–7.
- Durand, M. D. T., Castania, J. a, Fazan, R., Salgado, M. C. O. & Salgado, H. C. (2011). Hemodynamic responses to aortic depressor nerve stimulation in conscious L-NAME-induced hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(2), R418-27.
- Durand, M. T., Fazan, R., Salgado, M. C. O. & Salgado, H. C. (2009). Acute and chronic electrical activation of baroreceptor afferents in awake and anesthetized subjects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(1), 53–60.
- Eichenwald, E. C. & Committee on Fetus and Newborn, American Academy of Pediatrics. (2016). Apnea of Prematurity. *Pediatrics*, 137(1), e20153757.
- Esler, M. (2014). Sympathetic nervous system moves toward center stage in cardiovascular medicine from thomas willis to resistant hypertension. *Hypertension*, 63(3), 25–33.
- Ford, A. P., Udem, B. J., Birder, L. A., Grundy, D., Pijacka, W. & Paton, J. F. R. (2015). P2X3 receptors and sensitization of autonomic reflexes. *Autonomic Neuroscience*, 191, 16–24.
- Franchini, K. G. & Krieger, E. M. (1992). Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic-denervated rats. *The American Journal of Physiology*, 262(4 Pt 2), R677-83.
- Franchini, K. G. & Krieger, E. M. (1993). Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 42(1), 63–69.
- Freet, C. S., Stoner, J. F. & Tang, X. (2013). Baroreflex and chemoreflex controls of sympathetic activity following intermittent hypoxia. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 174(1–2), 8–14.
- Grassi, G. (2010). Sympathetic neural activity in hypertension and related diseases. *American Journal of Hypertension*, 23(10), 1052–1060.
- Grassi, G., Brambilla, G. M., Pizzalla, D. P. & Seravalle, G. (2016). Baroreflex Activation Therapy in Congestive Heart Failure: Novel Findings and Future Insights. *Current Hypertension Reports*, 18(8), 1–6.

- Griffith, I. S. & Schwartz, S. I. (1964). Reversal of renal hypertension by electrical stimulation of the carotid sinus nerve. *Surgery*, 56, 232–9.
- Gronda, E., Seravalle, G., Brambilla, G., Costantino, G., Casini, A., Alsheraei, A., ... Grassi, G. (2014). Chronic baroreflex activation effects on sympathetic nerve traffic, baroreflex function, and cardiac haemodynamics in heart failure: A proof-of-concept study. *European Journal of Heart Failure*, 16(9), 977–983.
- Gudsoorkar, P. S. & Tobe, S. W. (2017). Changing concepts in hypertension management. *Journal of Human Hypertension*, 31(12), 763–767.
- Heistad, D., Abboud, F. M., Mark, A. L. & Schmid, P. G. (1975). Effect of baroreceptor activity on ventilatory response to chemoreceptor stimulation. *Journal of Applied Physiology*, 39(3), 411–6.
- Heusser, K., Tank, J., Engeli, S., Diedrich, A., Menne, J., Eckert, S., ... Jordan, J. (2010). Carotid baroreceptor stimulation, sympathetic activity, baroreflex function, and blood pressure in hypertensive patients. *Hypertension*, 55(3), 619–626.
- Horne, R. S. C., Fung, A. C. H., McNeil, S., Fyfe, K. L., Odoi, A. & Wong, F. Y. (2017). The Longitudinal Effects of Persistent Apnea on Cerebral Oxygenation in Infants Born Preterm. *The Journal of Pediatrics*, 182, 79–84.
- Hwang, A. Y., Dietrich, E., Pepine, C. J. & Smith, S. M. (2017). Resistant Hypertension: Mechanisms and Treatment. *Current Hypertension Reports*, 19(7), 1–11.
- Illig, K. A., Levy, M., Sanchez, L., Trachiotis, G. D., Shanley, C., Irwin, E., ... Cody, R. (2006). An implantable carotid sinus stimulator for drug-resistant hypertension: Surgical technique and short-term outcome from the multicenter phase II Rheos feasibility trial. *Journal of Vascular Surgery*, 44(6), 1213–1219.
- Janvier, A., Khairy, M., Kokkotis, A., Cormier, C., Messmer, D. & Barrington, K. J. (2004). Apnea Is Associated with Neurodevelopmental Impairment in Very Low Birth Weight Infants. *Journal of Perinatology*, 24(12), 763–768.
- Katayama, P. L., Castania, J. A., Dias, D. P. M., Patel, K. P., Fazan, R. & Salgado, H. C. (2015). Role of Chemoreceptor Activation in Hemodynamic Responses to Electrical Stimulation of the Carotid Sinus in Conscious Rats. *Hypertension*, 66(3), 598–603.
- Katayama, P. L. (2016). Adrenaline and the carotid body during hypoglycaemia: an amplifying mechanism? *The Journal of Physiology*, 594(24), 7161–7162.
- Krieger, E. M. (1964). Neurogenic hypertension in the rat. *Circulation Research*, 15, 511–21.
- Krieger, E. M., Salgado, H. C. & Michelini, L. C. (1982). Resetting of the baroreceptors. *International Review of Physiology*, 26, 119–46.

- Kumar, P. & Prabhakar, N. R. (2012). Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Comprehensive Physiology*, 2(1), 141–219.
- Lohmeier, T. E., Dwyer, T. M., Hildebrandt, D. A., Irwin, E. D., Rossing, M. A., Serdar, D. J. & Kieval, R. S. (2005). Influence of Prolonged Baroreflex Activation on Arterial Pressure in Angiotensin Hypertension. *Hypertension*, 46(5), 1194–1200.
- Lohmeier, T. E., Dwyer, T. M., Irwin, E. D., Rossing, M. A. & Kieval, R. S. (2007). Prolonged Activation of the Baroreflex Abolishes Obesity-Induced Hypertension. *Hypertension*, 49(6), 1307–1314.
- Lohmeier, T. E., Hildebrandt, D. A., Dwyer, T. M., Iliescu, R., Irwin, E. D., Cates, A. W. & Rossing, M. A. (2009). Prolonged activation of the baroreflex decreases arterial pressure even during chronic adrenergic blockade. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 53(5), 833–8.
- Lohmeier, T. E., Irwin, E. D., Rossing, M. A., Serdar, D. J. & Kieval, R. S. (2004). Prolonged Activation of the Baroreflex Produces Sustained Hypotension. *Hypertension*, 43(2 II), 306–311.
- Malachias, M., Souza, W., Plavnik, F., Rodrigues, C., Brandão, A., Neves, M., ... Moreno Júnior, H. (2016). 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 107(3), 79–83.
- Mancia, G. & Grassi, G. (2014). The autonomic nervous system and hypertension. *Circulation Research*, 114(11), 1804–1814.
- Mancia, G., Grassi, G., Giannattasio, C. & Seravalle, G. (1999). Sympathetic Activation in the Pathogenesis of Hypertension and Progression of Organ Damage. *Hypertension*, 34(4), 724–728.
- Marcus, N. J., Del Rio, R., Schultz, E. P., Xia, X.-H. & Schultz, H. D. (2014). Carotid body denervation improves autonomic and cardiac function and attenuates disordered breathing in congestive heart failure. *The Journal of Physiology*, 592(2), 391–408.
- Martin, R. J. & Wilson, C. G. (2012). Apnea of Prematurity. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 2, pp. 2923–31).
- McBryde, F. D., Abdala, A. P., Hendy, E. B., Pijacka, W., Marvar, P., Moraes, D. J. A., ... Paton, J. F. R. (2013). The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nature Communications*, 4, 1–11.
- Mifflin, S. W. (1993). Inhibition of chemoreceptor inputs to nucleus of tractus solitarius neurons during baroreceptor stimulation. *The American Journal of Physiology*, 265(1 Pt 2), R14–20.
- Mills, K. T., Bundy, J. D., Kelly, T. N., Reed, J. E., Kearney, P. M., Reynolds, K., ... He, J. (2016). Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A

- Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. *Circulation*, 134(6), 441–50.
- Murata, T., Otsu, K., Kobayashi, M. & Nosaka, S. (1999). Inhibition of Baroreflex Vagal Bradycardia by Selective Stimulation of Arterial Chemoreceptors in Rats. *Experimental Physiology*, 84(5), 897–906.
- Neistadt, A. & Schwartz, S. I. (1967). Effects of electrical stimulation of the carotid sinus nerve in reversal of experimentally induced hypertension. *Surgery*, 61(6), 923–31.
- Niane, L. M., Donnelly, D. F., Joseph, V. & Bairam, A. (2011). Ventilatory and carotid body chemoreceptor responses to purinergic P2X receptor antagonists in newborn rats. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 110(1), 83–94.
- Nock, M. L., DiFiore, J. M., Arko, M. K. & Martin, R. J. (2004). Relationship of the ventilatory response to hypoxia with neonatal apnea in preterm infants. *The Journal of Pediatrics*, 144(3), 291–295.
- Nurse, C. A. (2014). Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors. *The Journal of Physiology*, 592(16), 3419–3426.
- Oparil, S. & Schmieder, R. E. (2015). New Approaches in the Treatment of Hypertension. *Circulation Research*, 116(6), 1074–1095.
- Papademetriou, V., Rashidi, A. A., Tsioufis, C. & Doulas, M. (2014). Renal nerve ablation for resistant hypertension: How did we get here, present status, and future directions. *Circulation*, 129(13), 1440–1451.
- Parsonnet, V., Rothfeld, E. L., Raman, K. V. & Myers, G. H. (1969). Electrical stimulation of the carotid sinus nerve. *The Surgical Clinics of North America*, 49(3), 589–96.
- Paton, J. F. R., Sobotka, P. A., Fudim, M., Engleman, Z. J., Hart, E. C. J., McBryde, F. D., ... Nightingale, A. (2013). The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases. *Hypertension*, 61(1), 5–13.
- Paulis, L., Steckelings, U. M. & Unger, T. (2012). Key advances in antihypertensive treatment. *Nature Reviews Cardiology*, 9(5), 276–285.
- Peng, Y.-J., Nanduri, J., Khan, S. A., Yuan, G., Wang, N., Kinsman, B., ... Prabhakar, N. R. (2011). Hypoxia-inducible factor 2 α (HIF-2 α) heterozygous-null mice exhibit exaggerated carotid body sensitivity to hypoxia, breathing instability, and hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 3065–70.
- Pijacka, W., Moraes, D. J. A., Ratcliffe, L. E. K., Nightingale, A. K., Hart, E. C., Da Silva, M. P., ... Paton, J. F. R. (2016). Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nature Medicine*, 22(10), 1151–

1159.

- Pijacka, W., Katayama, P. L., Salgado, H. C., Lincevicius, G. S., Campos, R. R., McBryde, F. D. & Paton, J. F. R. (2018, no prelo). *The Journal of Physiology*.
- Prasad, M., Fearon, I. M., Zhang, M., Laing, M., Vollmer, C. & Nurse, C. A. (2001). Expression of P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat carotid body afferent neurones: role in chemosensory signalling. *The Journal of Physiology*, 537(Pt 3), 667–77.
- Ren, J., Ding, X. & Greer, J. J. (2015). Ampakines enhance weak endogenous respiratory drive and alleviate apnea in perinatal rats. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191(6), 704–10.
- Rieusset, A., Schaller, F., Unmehopa, U., Matarazzo, V., Watrin, F., Linke, M., ... Muscatelli, F. (2013). Stochastic Loss of Silencing of the Imprinted Ndn/NDN Allele, in a Mouse Model and Humans with Prader-Willi Syndrome, Has Functional Consequences. *PLoS Genetics*, 9(9), e1003752.
- Sato, T., Kawada, T., Miyano, H., Shishido, T., Inagaki, M., Yoshimura, R., ... Sunagawa, K. (1999). New simple methods for isolating baroreceptor regions of carotid sinus and aortic depressor nerves in rats. *The American Journal of Physiology*, 276(1 Pt 2), H326-32.
- Scheffers, I. J. M., Kroon, A. A., Schmidli, J., Jordan, J., Tordoir, J. J. M., Mohaupt, M. G., ... De Leeuw, P. W. (2010). Novel baroreflex activation therapy in resistant hypertension: Results of a European multi-center feasibility study. *Journal of the American College of Cardiology*, 56(15), 1254–1258.
- Schwartz, S. I., Griffith, L. S. C., Neistadt, A. & Hagfors, N. (1967). Chronic carotid sinus nerve stimulation in the treatment of essential hypertension. *The American Journal of Surgery*, 114(1), 5–15.
- Sheppard, J. P., Martin, U. & McManus, R. J. (2017). Diagnosis and management of resistant hypertension. *Heart*, 103(16), 1295–1302.
- Somers, V. K., Dyken, M. E., Mark, A. L. & Abboud, F. M. (1992). Parasympathetic hyperresponsiveness and bradyarrhythmias during apnoea in hypertension. *Clinical Autonomic Research*, 2(3), 171–176.
- Somers, V. K., Mark, A. L. & Abboud, F. M. (1991). Interaction of baroreceptor and chemoreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in normal humans. *J Clin Invest*, 87(6), 1953–1957.
- Song, X., Gao, X., Guo, D., Yu, Q., Guo, W., He, C., ... Xiang, Z. (2012). Expression of P2X2 and P2X3 receptors in the rat carotid sinus, aortic arch, vena cava, and heart, as well as petrosal and nodose ganglia. *Purinergic Signalling*, 8(1), 15–22.
- Tordoir, J. H. M., Scheffers, I., Schmidli, J., Savolainen, H., Liebeskind, U., Hansky, B., ... Cody, R. (2007). An Implantable Carotid Sinus Baroreflex Activating

System: Surgical Technique and Short-Term Outcome from a Multi-Center Feasibility Trial for the Treatment of Resistant Hypertension. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 33(4), 414–421.

Wang-Fischer, Y. (2009). *Manual of stroke models in rats*. CRC Press.

Wang, J., Irnaten, M., Neff, R. A., Venkatesan, P., Evans, C., Loewy, A. D., ... Mendelowitz, D. (2006). Synaptic and Neurotransmitter Activation of Cardiac Vagal Neurons in the Nucleus Ambiguus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 940(1), 237–246.

Warner, H. R. (1958). The frequency-dependent nature of blood pressure regulation by the carotid sinus studied with an electric analog. *Circulation Research*, 6(1), 35–40.

Weber, M. A., Schiffrin, E. L., White, W. B., Mann, S., Lindholm, L. H., Kenerson, J. G., ... Harrap, S. B. (2014). Clinical Practice Guidelines for the Management of Hypertension in the Community A Statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *Journal of Hypertension*, 32(1), 3–15.

Wustmann, K., Kucera, J. P., Scheffers, I., Mohaupt, M., Kroon, A. A., De Leeuw, P. W., ... Delacrétaz, E. (2009). Effects of chronic baroreceptor stimulation on the autonomic cardiovascular regulation in patients with drug-resistant arterial hypertension. *Hypertension*, 54(3), 530–536.

Younes, M. (2014). CrossTalk proposal: Elevated loop gain is a consequence of obstructive sleep apnoea. *The Journal of Physiology*, 592(14), 2899–2901.

Zhao, J., Gonzalez, F. & Mu, D. (2011). Apnea of prematurity: from cause to treatment. *European Journal of Pediatrics*, 170(9), 1097–1105.

Zucker, I. H., Hackley, J. F., Cornish, K. G., Hiser, B. A., Anderson, N. R., Kieval, R., ... Rossing, M. A. (2007). Chronic baroreceptor activation enhances survival in dogs with pacing-induced heart failure. *Hypertension*, 50(5), 904–910.

Tabela 1. Valores individuais de pressão arterial sistólica (mmHg) de animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X), em condições basais.

	CONT	QUIMIO-X	BARO-X	TOTAL-X
1	111	127	132	108
2	116	135	128	105
3	113	130	142	113
4	132	103	131	115
5	115	127	120	134
6	123	127	116	128
7	113	107		109
Média	117	122	128	116
EPM	3	5	3	4

Tabela 2. Valores individuais de pressão arterial diastólica (mmHg) de animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X), em condições basais.

	CONT	QUIMIO-X	BARO-X	TOTAL-X
1	83	94	93	84
2	83	93	90	78
3	84	85	93	82
4	99	77	101	87
5	90	88	83	83
6	95	88	83	94
7	89	76		78
Média	89	86	90	84
EPM	2	3	2	2

Tabela 3. Valores individuais de pressão arterial média (mmHg) de animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X), em condições basais.

	CONT	QUIMIO-X	BARO-X	TOTAL-X
1	97	109	111	97
2	97	111	106	92
3	99	104	114	97
4	115	89	115	99
5	103	105	101	104
6	109	104	98	110
7	101	89		92
Média	103	102	107	99
EPM	2	3	3	2

Tabela 4. Valores individuais de frequência cardíaca (bpm) de animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X), em condições basais.

	CONT	QUIMIO-X	BARO-X	TOTAL-X
1	372	433	370	322
2	401	363	345	360
3	317	357	360	373
4	384	314	351	333
5	379	323	321	322
6	357	341	309	367
7	374	331		350
Média	369	352	343	347
EPM	10	15	9	8

Tabela 5. Valores individuais da resposta da pressão arterial média (Δ mmHg) à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 15 Hz; Duração: 20 s) de animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

	CONT	QUIMIO-X	BARO-X	TOTAL-X
1	-6	-26	1	-3
2	-14	-37	20	0
3	-2	-5	1	1
4	-12	-7	1	-2
5	-16	-21	29	-2
6	-20	-9	25	1
7	-20	-22		0
Média	-12,9	-18,1	12,8	-0,7
EPM	3	4	5	1

Tabela 6. Valores individuais da resposta da pressão arterial média (Δ mmHg) à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 30 Hz; Duração: 20 s) de animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

	CONT	QUIMIO-X	BARO-X	TOTAL-X
1	-12	-32	18	0
2	-10	-25	17	-4
3	-9	-10	44	-9
4	-41	-12	20	0
5	-14	-25	19	-3
6	-16	-41	17	0
7	-20	-22		-9
Média	-17,4	-23,9	22,5	-3,6
EPM	4	4	4	2

Tabela 7. Valores individuais da resposta da pressão arterial média (Δ mmHg) à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 60 Hz; Duração: 20 s) de animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

	CONT	QUIMIO-X	BARO-X	TOTAL-X
1	-11	-49	19	-4
2	-21	-66	17	-1
3	-28	-32	23	2
4	-8	-27	10	-3
5	-16	-23	41	-5
6	-20	-43	22	1
7	-27	-21		1
Média	-18,7	-37,3	22	-1,3
EPM	3	6	4	1

Tabela 8. Valores individuais da resposta da pressão arterial média (Δ mmHg) à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 90 Hz; Duração: 20 s) de animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

	CONT	QUIMIO-X	BARO-X	TOTAL-X
1	-6	-33	21	-1
2	-17	-51	2	-1
3	-27	-33	9	1
4	-20	-8	10	-3
5	-23	-27	48	-6
6	-11	-46	27	4
7	-28	-31		-8
Média	-18,8	-32,7	19,5	-2
EPM	3	5	7	2

Tabela 9. Valores individuais da resposta da frequência cardíaca (Δ bpm) à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 15 Hz; Duração: 20 s) de animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

	CONT	QUIMIO-X	BARO-X	TOTAL-X
1	-3	-24	-44	-4
2	9	-82	-77	9
3	-36	-2	1	-32
4	-54	3	-8	-10
5	-25	8	-81	4
6	23	-27	-11	7
7	10	-7		1
Média	-10,9	-18,7	-36,7	-3,6
EPM	11	12	15	5

Tabela 10. Valores individuais da resposta da frequência cardíaca (Δ bpm) à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 30 Hz; Duração: 20 s) de animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

	CONT	QUIMIO-X	BARO-X	TOTAL-X
1	2	-45	-30	8
2	-4	-74	-90	0
3	-22	-18	-20	-36
4	-85	5	-58	1
5	-9	7	-113	-2
6	8	-29	-14	7
7	-2	-17		9
Média	-16	-24,4	-54,2	-1,9
EPM	12	11	16	6

Tabela 11. Valores individuais da resposta da frequência cardíaca (Δ bpm) à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 60 Hz; Duração: 20 s) de animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

	CONT	QUIMIO-X	BARO-X	TOTAL-X
1	2	-59	-45	8
2	2	-64	-47	9
3	7	-7	-5	7
4	-5	-5	-31	-8
5	8	-1	-92	3
6	18	-61	-17	7
7	-16	-21		-5
Média	2,3	-31,1	-39,5	3
EPM	4	11	12	3

Tabela 12. Valores individuais da resposta da frequência cardíaca (Δ bpm) à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (Intensidade: 5 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 90 Hz; Duração: 20 s) de animais dos grupos controle (CONT), com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), com inativação dos barorreceptores carotídeos (BARO-X), e com inativação concomitante dos corpúsculos e barorreceptores carotídeos (TOTAL-X).

	CONT	QUIMIO-X	BARO-X	TOTAL-X
1	14	-37	-61	-2
2	0	-73	-85	-1
3	-9	-15	-5	2
4	-12	5	-66	-7
5	39	-12	-80	6
6	0	-66	-26	20
7	-1	-18		9
Média	4,4	-30,9	-53,8	3,9
EPM	6	11	13	3

Tabela 13. Valores individuais de frequência respiratória (fR; cpm), volume corrente (V_T ; mL/kg) e volume minuto (V_E ; mL/kg/min) de animais dos grupos controle (CONT) e com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X), em condições basais.

	fR		V_T		V_E	
	CONT	QUIMIO-X	CONT	QUIMIO-X	CONT	QUIMIO-X
1	141	72	12,3	9,3	1742	670
2	84	84	7,3	10,5	615	886
3	72	111	10,7	8,9	773	989
4	90	69	8,3	8,6	750	592
5	68	115	11	6,1	747	708
6	94	105	10,3	9,4	972	984
7	71	95	9,3	9,2	658	876
Média	89	93	9,9	8,8	894	815
EPM	9	7	1	1	147	60

Tabela 14. Valores individuais das respostas da frequência respiratória (f_R ; Δ cpm), volume corrente (V_T ; Δ mL/kg) e volume minuto (V_E ; Δ mL/kg/min) à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (Intensidade: 3 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 15 Hz; Duração: 20 s) de animais dos grupos controle (CONT) e com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X).

	f_R		V_T		V_E	
	CONT	QUIMIO-X	CONT	QUIMIO-X	CONT	QUIMIO-X
1	64	30	3,2	0,5	1302	329
2	0	1	5,2	1,1	531	142
3	19	-10	2,6	-0,2	402	-113
4	44	-6	4,8	0	1054	-49
5	18	3	2,6	0,9	406	141
6	26	-15	-0,4	-0,2	222	-155
7	16	-10	0,6	0,6	254	-24
Média	27	-1	2,6	0,4	596	39
EPM	8	6	0,8	0,2	158	65

Tabela 15. Valores individuais das respostas da frequência respiratória (f_R ; Δ cpm), volume corrente (V_T ; Δ mL/kg) e volume minuto (V_E ; Δ mL/kg/min) à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (Intensidade: 3 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 30 Hz; Duração: 20 s) de animais dos grupos controle (CONT) e com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X).

	f_R		V_T		V_E	
	CONT	QUIMIO-X	CONT	QUIMIO-X	CONT	QUIMIO-X
1	81	12	1,2	1,1	1259	210
2	24	-6	5,7	-1	907	-146
3	60	3	5,1	1,8	1312	235
4	54	2	14	0,2	2465	22
5	64	1	1	0,3	835	40
6	14	20	6,5	1,3	1036	346
7	17	-13	1,7	-0,2	316	-147
Média	45	3	5	0,5	1161	80
EPM	10	4	1,7	0,4	250	72

Tabela 16. Valores individuais das respostas da frequência respiratória (f_R ; Δ cpm), volume corrente (V_T ; Δ mL/kg) e volume minuto (V_E ; Δ mL/kg/min) à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (Intensidade: 3 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 60 Hz; Duração: 20 s) de animais dos grupos controle (CONT) e com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X).

	f_R		V_T		V_E	
	CONT	QUIMIO-X	CONT	QUIMIO-X	CONT	QUIMIO-X
1	11	-6	3,6	3,2	659	174
2	23	6	6	-3,5	878	-258
3	12	13	7,2	2,7	798	456
4	50	5	11,9	0,1	2321	57
5	55	-8	4	0,4	1095	3
6	36	10	3,3	1,1	916	204
7	22	7	0	0,4	239	68
Média	30	4	5,1	0,6	986	101
EPM	7	3	1,4	0,8	244	97

Tabela 17. Valores individuais das respostas da frequência respiratória (f_R ; Δ cpm), volume corrente (V_T ; Δ mL/kg) e volume minuto (V_E ; Δ mL/kg/min) à estimulação elétrica do seio carotídeo/nervo do seio carotídeo (Intensidade: 3 V; Largura de pulso: 1 ms; Frequência: 90 Hz; Duração: 20 s) de animais dos grupos controle (CONT) e com inativação dos corpúsculos carotídeos (QUIMIO-X).

	f_R		V_T		V_E	
	CONT	QUIMIO-X	CONT	QUIMIO-X	CONT	QUIMIO-X
1	39	39	4,4	2,5	1199	586
2	24	10	6,9	-1,9	920	-78
3	32	-9	5,2	-0,4	843	-129
4	63	7	8,7	1,3	2146	164
5	9	3	1,3	0,5	202	72
6	24	-23	0,6	2,2	404	-124
7	28	-11	1	0,3	413	-69
Média	31	2	4	0,6	875	60
EPM	6	7	1,2	0,6	249	97

Tabela 18. Valores individuais da ocorrência de apneias (número de apneias/10 minutos) antes da administração de AF-454, 10 minutos e 20 minutos após a administração de AF-454 (10 mg/kg, s.c.).

	Pré AF-454	10 min pós AF-454	20 min pós AF-454
1	6	1	0
2	3	2	2
3	4	4	2
4	1	0	1
5	14	4	2
6	6	3	5
7	10	8	5
Média	6	3	2
EPM	2	1	1

Tabela 19. Valores individuais de frequência respiratória (fR; cpm) mensurados em condições basais, 10 e 20 minutos após a administração de AF-454, ou veículo, em ratos neonatos.

	AF-454			Veículo		
	Basal	10 min	20 min	Basal	10 min	20 min
1	103	109	109	88	96	88
2	113	113	110	110	101	109
3	112	115	111	101	99	94
4	116	117	126	83	79	76
5	78	79	75	111	94	82
6	106	92	87			
7	102	102	92			
Média	104	104	101	99	94	90
EPM	5	5	7	6	4	6

Tabela 20. Valores individuais de volume corrente (V_T ; mL/kg) mensurados em condições basais, 10 e 20 minutos após a administração de AF-454, ou veículo, em ratos neonatos.

	AF-454			Veículo		
	Basal	10 min	20 min	Basal	10 min	20 min
1	7,6	9,5	10,2	10,8	10,9	9
2	9,5	9,4	10,3	12,3	12,1	11,9
3	10,0	9,0	9,5	7,7	9,2	8,1
4	10,3	13,2	13,1	9,2	10,8	15,4
5	7,3	8,5	8,1	7,7	7,5	7,5
6	7,2	5,9	5,9			
7	7,8	8,0	6,2			
Média	8,5	9,1	9	9,5	10,1	10,4
EPM	0,5	0,8	1	0,9	0,8	1,5

Tabela 21. Valores individuais de volume minuto (V_E ; mL/kg/min) mensurados em condições basais, 10 e 20 minutos após a administração de AF-454, ou veículo, em ratos neonatos.

	AF-454			Veículo		
	Basal	10 min	20 min	Basal	10 min	20 min
1	750	1027	1103	920	1077	769
2	992	1081	1147	1383	1380	1534
3	1117	1023	1021	769	923	769
4	1234	1543	1622	772	769	1231
5	562	665	586	923	771	615
6	757	537	507			
7	833	743	593			
Média	892	945	940	953	984	984
EPM	88	127	152	112	114	172

Tabela 22. Valores individuais da variabilidade de curto prazo (SD1; ms) dos intervalos respiratórios antes da administração de AF-454, 10 minutos e 20 minutos após a administração de AF-454 (10 mg/kg, s.c.).

	Pré AF-454	10 min pós AF-454	20 min pós AF-454
1	55	48	56
2	86	68	71
3	98	72	74
4	51	32	48
5	83	82	81
6	116	90	78
7	77	60	69
Média	81	65	68
EPM	9	8	5

Tabela 23. Valores individuais da variabilidade de longo prazo (SD2; ms) dos intervalos respiratórios antes da administração de AF-454, 10 minutos e 20 minutos após a administração de AF-454 (10 mg/kg, s.c.).

	Pré AF-454	10 min pós AF-454	20 min pós AF-454
1	127	182	178
2	131	215	164
3	259	170	204
4	102	175	180
5	250	242	282
6	216	183	166
7	175	188	191
Média	180	194	195
EPM	24	8	15

Tabela 24. Valores individuais das alterações da frequência respiratória (Δ fR; %) em resposta à exposição aguda (1 minuto) à hipóxia (10% O₂) antes da administração de AF-454, 10 minutos e 20 minutos após a administração de AF-454 (10 mg/kg, s.c.).

	Pré AF-454	10 min pós AF-454	20 min pós AF-454
1	35	9	0,3
2	24	4	8
3	36	4	2
4	27	0,5	6
5	38	-10	-10
Média	32	1,5	1,3
EPM	2,7	3,2	3,1

Tabela 25. Valores individuais das alterações do volume corrente (ΔV_T ; %) em resposta à exposição aguda (1 minuto) à hipóxia (10% O₂) antes da administração de AF-454, 10 minutos e 20 minutos após a administração de AF-454 (10 mg/kg, s.c.).

	Pré AF-454	10 min pós AF-454	20 min pós AF-454
1	21	7	9
2	12	5	12
3	55	-6	-14
4	31	31	25
5	12	-29	-6
Média	26,2	1,6	5,2
EPM	8	9,7	6,9

Tabela 26. Valores individuais das alterações do volume minuto (ΔV_E ; %) em resposta à exposição aguda (1 minuto) à hipóxia (10% O₂) antes da administração de AF-454, 10 minutos e 20 minutos após a administração de AF-454 (10 mg/kg, s.c.).

	Pré AF-454	10 min pós AF-454	20 min pós AF-454
1	67	17	9
2	35	7	11
3	113	-5	-6
4	65	27	22
5	32	-37	-15
Média	62,4	1,8	4,2
EPM	14,6	11	6,5

Role of Chemoreceptor Activation in Hemodynamic Responses to Electrical Stimulation of the Carotid Sinus in Conscious Rats

Pedro L. Katayama, Jaci A. Castania, Daniel P.M. Dias, Kaushik P. Patel, Rubens Fazan, Jr and Helio C. Salgado

Hypertension. 2015;66:598-603; originally published online July 20, 2015;
doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05316

Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2015 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://hyper.ahajournals.org/content/66/3/598>

Data Supplement (unedited) at:

<http://hyper.ahajournals.org/content/suppl/2015/07/20/HYPERTENSIONAHA.115.05316.DC1>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Hypertension* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Hypertension* is online at:
<http://hyper.ahajournals.org/subscriptions/>

Role of Chemoreceptor Activation in Hemodynamic Responses to Electrical Stimulation of the Carotid Sinus in Conscious Rats

Pedro L. Katayama, Jaci A. Castania, Daniel P.M. Dias, Kaushik P. Patel, Rubens Fazan Jr, Helio C. Salgado

Abstract—Electric carotid baroreflex activation has been used to treat patients with resistant hypertension. It is hypothesized that, in conscious rats, combined activation of carotid baro- and chemoreceptors attenuates the reflex hypotension. Rats were divided into 4 groups: (1) control group, with unilateral denervation of the right carotid chemoreceptors; (2) chemoreceptor denervation group, with bilateral ligation of the carotid body artery; (3) baroreceptor denervation group, with unilateral denervation of the left carotid baroreceptors and right carotid chemoreceptors; and (4) carotid bifurcation denervation group, with denervation of the left carotid baroreceptors and chemoreceptors, plus denervation of the right carotid chemoreceptors. Animals were subjected to 4 rounds of electric stimulation (5 V, 1 ms), with 15, 30, 60, and 90 Hz applied randomly for 20 s. Electric stimulation caused greater hypotensive responses in the chemoreceptor denervation group than in the control group, at 60 Hz (−37 versus −19 mm Hg) and 90 Hz (−33 versus −19 mm Hg). The baroreceptor denervation group showed hypertensive responses at all frequencies of stimulation. In contrast, the carotid sinus denervation group showed no hemodynamic responses. The control group presented no changes in heart rate, whereas the chemoreceptor denervation group and the baroreceptor denervation group showed bradycardic responses. These data demonstrate that carotid chemoreceptor activation attenuates the reflex hypotension caused by combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve in conscious rats. These findings may provide useful insight for clinical studies using baroreflex activation therapy in resistant hypertension and heart failure. (*Hypertension*. 2015;66:598-603. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05316.) • [Online Data Supplement](#)

Key Words: baroreflex ■ hemodynamics ■ hypertension ■ pressoreceptors ■ sympathetic nervous system

Electric stimulation of the carotid sinus has been used recently in clinical trials to treat hypertensive patients resistant to pharmacological therapy.^{1,2} The rationale for supporting this approach is that electric activation of the carotid baroreflex leads to activation of the cardiac parasympathetic drive and inhibition of sympathetic activity to the heart and peripheral vessels.³ More recently, electric stimulation of the carotid sinus has emerged as a therapeutic tool in the management of heart failure as well.⁴⁻⁶

During electric stimulation of the carotid sinus in patients with resistant hypertension^{1,2} or with heart failure,⁴⁻⁶ the anatomic position of the carotid body may allow undesirable activation of the carotid chemoreceptors, a possibility raised by Zucker et al⁷ and based on studies in dogs with heart failure. It is well known that activation of chemoreceptors produces an increase in arterial pressure (sympathetic activation) and bradycardia (parasympathetic activation), as well as conspicuous ventilatory responses.^{8,9}

Recently, an important role for carotid body chemoreceptors in the pathophysiology of cardiovascular disease has been suggested.^{10,11} Studies of carotid body deafferentation in rabbits¹² and spontaneously hypertensive rats¹⁰ have demonstrated that removal of the carotid bodies is an effective means for sustained sympathoinhibition^{10,12} and may be considered as a therapeutic option, possibly transferable to humans for reduction of sympathetic drive, disordered breathing patterns, and incidence of arrhythmia in heart failure.¹² Therefore, it can be hypothesized that the cardiocirculatory effects triggered by attendant chemoreflex activation during baroreflex activation therapy (BAT)^{13,14} could potentially interfere with the classical hemodynamic response (hypotension and bradycardia) caused by the activation of the baroreflex.¹⁵ Of note, the recent study from Alnima et al,¹⁶ using short-term electric activation settings of 2 and 4 minutes, provided remarkable information for BAT using the Rheos system. These authors observed that this electroceutical therapy in patients with

Received February 8, 2015; first decision March 1, 2015; revision accepted June 25, 2015.

From the Department of Physiology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil (P.L.K., J.A.C., D.P.M.D., R.F., H.C.S.); and Department of Cellular and Integrative Physiology, University of Nebraska Medical Center, Omaha (K.P.P.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://hyper.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05316/-DC1>.

Correspondence to: Helio C. Salgado, Department of Physiology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. E-mail hcsalgado@fmrp.usp.br

© 2015 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05316

resistant hypertension did not stimulate respiration at several electric device activation parameters suggesting that there is no attendant activation of carotid body chemoreceptors during device therapy.¹⁶

In our laboratory, studies on short-term electric stimulation of the aortic depressor nerve in conscious normotensive¹⁷ or hypertensive¹⁸ rats have provided important information on the autonomic regulation of arterial pressure and heart rate (HR) by the aortic baroreflex. In the current study, the methodological procedure for stimulating the aortic depressor nerve in conscious rats^{17,18} was adapted to stimulate the carotid sinus. Thus, simultaneous electric stimulation of the carotid sinus and carotid sinus nerve in conscious rats was combined with surgical procedures for the selective denervation of the carotid chemo-^{8,19} and baroreceptors (unpublished data) to investigate the role played by the peripheral (carotid body) chemoreflex during combined electric activation of the carotid sinus and carotid sinus nerve.

The aim of the current study was to investigate whether the attendant activation of carotid chemoreceptor afferents attenuates the reflex hypotension caused by combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve in conscious rats. To accomplish this, an experimental model with selective denervation of carotid chemo-^{8,19} and baroreceptors (unpublished data) in rats was used. By means of this experimental approach, it was possible to examine the relative contribution of both baroreceptors and chemoreceptors on the hemodynamic parameters of arterial pressure and HR in response to combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve in conscious rats. It is possible that these findings will provide useful insight for the clinical use of electric stimulation of the carotid sinus as a therapeutic tool in patients with resistant hypertension and heart failure.

Methods

All procedures used in this study were reviewed and approved by the Committee of Ethics in Animal Research of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo (Protocol No. 143/2013).

Surgical Procedures and Experimental Groups

The surgical procedures were performed under ketamine/xylazine anesthesia. All rats were implanted with polyethylene catheters into the left femoral artery and vein for arterial pressure recording and drug administration and underwent right side carotid chemoreceptor

denervation as described elsewhere.⁸ Before the implantation of a bipolar stainless steel electrode around the left carotid sinus and the carotid sinus nerve (Figure 1), 27 rats were assigned into 4 experimental groups:

1. Control group (CONT; n=7): Left carotid bifurcation was maintained intact.
2. Chemoreceptor denervation group (CHEMO-X; n=7): Left carotid body denervation was performed by cutting off the carotid body artery.⁸
3. Baroreceptor denervation group (BARO-X; n=6): Left carotid baroreceptor denervation was performed by carefully cutting off the baroreceptor afferents from the carotid sinus.
4. Carotid bifurcation denervation group (TOTAL-X; n=7): Left carotid chemoreceptor and baroreceptor denervation were performed according to the procedures described in items 2 and 3 above.

Detailed surgical procedures are provided in the online-only Data Supplement.

Experimental Protocol

Twenty-four hours after surgical procedures, conscious freely moving rats had the pulsatile arterial pressure recorded during 20 minutes under baseline conditions, followed by successive 20 s long sessions of combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve (voltage: 5 V; pulse width: 1 ms; frequency: 15, 30, 60, and 90 Hz, applied in a random order). At least a 5-minute interval was observed for each period of stimulation. Baseline values of mean arterial pressure (MAP) and HR were collected from a 20-s period which preceded the beginning of each frequency of electric stimulation of the carotid sinus. The maximum responses in MAP and HR to electric stimulations were recorded.

Expanded Methods section is provided in the online-only Data Supplement.

Results

Basal Hemodynamics

Baseline values of systolic arterial pressure, diastolic arterial pressure, MAP, and HR from all groups are shown in the Table. The hemodynamic parameters were not statistically different among all groups.

Hemodynamic Responses to Combined Electric Stimulation of the Left Carotid Sinus and the Carotid Sinus Nerve

Typical traces of the responses of pulsatile arterial pressure, MAP (white line; top), and HR (bottom) to 20-s combined

Figure 1. Schematic drawing of the position of the bipolar electrodes on left carotid sinus of the rat. APA indicates ascending pharyngeal artery; BA, baroreceptor afferents; CA, chemoreceptor afferents; CB, carotid body; CBA, carotid body artery; CC, carotid canal; CCA, common carotid artery; CS, carotid sinus; CSN, carotid sinus nerve; ECA, external carotid artery; GPN, glossopharyngeal nerve; ICA, internal carotid artery; LA, lingual artery; OA, occipital artery; PA, pterygopalatine artery; PLF, posterior lateral foramen; and SCG, superior cervical ganglion. Adapted from Sapru and Krieger²⁰ with permission of the publisher. Copyright © 1977, The American Physiological Society. Authorization for this adaptation has been obtained both from the owner of the copyright in the original work and from the owner of copyright in the translation or adaptation.

Table. Baseline Values of Systolic (mm Hg), Diastolic (mm Hg), and Mean Arterial Pressure (mm Hg) and Heart Rate (bpm)

Variables	CONT (n=7)	CHEMO-X (n=7)	BARO-X (n=6)	TOTAL-X (n=7)
SAP	117±3	122±5	128±3	116±4
DAP	89±2	86±3	90±2	84±2
MAP	103±2	102±3	107±3	99±2
HR	369±10	352±15	343±9	347±8

Data are expressed as mean±SEM. BARO-X indicates denervated carotid baroreceptor; CHEMO-X, denervated carotid body; CONT, control; DAP, diastolic arterial pressure; HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure; SAP, systolic arterial pressure; and TOTAL-X, denervated carotid body plus denervated carotid baroreceptor.

electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve in conscious rats are displayed in Figure 2. CONT and CHEMO-X rats exhibited hypotensive responses, whereas the BARO-X rat exhibited a hypertensive response. No change in arterial pressure was observed in the TOTAL-X rats. The HR recordings show that CHEMO-X and BARO-X rats displayed marked bradycardia, whereas the CONT and TOTAL-X rats presented no change in HR.

The responses of MAP to combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve with 15, 30, 60, and 90 Hz from all groups are shown in Figure 3. At all frequencies, CONT and CHEMO-X groups exhibited a hypotensive response. In contrast, the BARO-X group exhibited a hypertensive response under all frequencies of stimulation. The TOTAL-X group showed no changes in MAP with any frequency of stimulation. Figure S1 in the online-only Data Supplement shows the MAP responses versus the frequencies of stimulation for all groups studied.

The HR responses to combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve with 15, 30, 60, and 90 Hz from all groups are shown in Figure 4. The CONT and TOTAL-X groups showed no changes in HR with any frequency of stimulation. The CHEMO-X and BARO-X groups displayed a trend toward bradycardic responses; however, the BARO-X group displayed significant bradycardia with stimulation at 30, 60, and 90 Hz, whereas the CHEMO-X group displayed bradycardia only on stimulation with 60 or 90 Hz. Figure S2 shows the individual hemodynamic responses to combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve with different frequencies (Hz) for all groups studied.

Discussion

The major new finding obtained from conscious rats was the clear-cut demonstration that chemoreceptors, as well as baroreceptors, were transiently activated during combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve in conscious rats. The results have shown that when the carotid bifurcation was intact (ie, in the CONT group), combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve elicited a significant hypotensive response. This finding is in line with results obtained in dogs^{21,22} and drug-resistant

hypertensive patients.^{1,2} Nevertheless, unlike the results seen in dogs²³ and drug-resistant hypertensive patients,⁴ HR did not significantly decrease in intact conscious rats (the CONT group).

It is of interest to note that bilateral carotid body denervation (as in the CHEMO-X group) hampered the hemodynamic influences of the carotid chemoreceptors during combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve in conscious rats. This procedure led to an augmented hypotensive response, at frequencies of 60 and 90 Hz, indicating that carotid chemoreceptor activation attenuated the hypotensive response elicited by the carotid baroreceptors in intact rats (ie, the CONT group). In addition, carotid baroreceptor denervation alone (ie, the BARO-X group) led to a significant hypertensive response, combined with marked bradycardia, after electric stimulation of the carotid sinus. This finding provides support for the hypothesis that carotid chemoreceptors were also activated during combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve. When the carotid sinus was electrically stimulated in the absence of carotid chemoreceptors and carotid baroreceptors (ie, the TOTAL-X group), no changes in hemodynamic

Figure 2. A to D, Representative traces showing pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (white line; top), and heart rate (HR; bottom) responses to combined electric stimulation (5 V; 1 ms; 90 Hz) of the carotid sinus and carotid sinus nerve in conscious rats during 20 s. BARO-X indicates denervated carotid baroreceptor; CHEMO-X, denervated carotid body; CONT, control; ES, electric stimulation; and TOTAL-X, denervated carotid body plus denervated carotid baroreceptor.

Figure 3. A to D, Changes in mean arterial pressure (Δ MAP) in response to combined electric stimulation (5 V; 1 ms; 15, 30, 60, and 90 Hz) of the carotid sinus and carotid sinus nerve in conscious rats during 20 s. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * P <0.05 compared with the CONT group; † P <0.05 compared with the CHEMO-X group; ‡ P <0.05 compared with the BARO-X group. BARO-X indicates denervated carotid baroreceptor; CHEMO-X, denervated carotid body; CONT, control; and TOTAL-X, denervated carotid body plus denervated carotid baroreceptor.

(MAP and HR) responses were observed. This finding provides additional support for the role played by the afferents from chemo- and baroreceptors when activated during combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve.

About the reflex bradycardia, the CONT group showed no bradycardic response to combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve, whereas the chemoreceptor-denervated rats (the CHEMO-X group) showed consistent bradycardia. It is well known that baroreflex activation leads to vagally mediated bradycardia.¹⁵ In addition,

as previously indicated, peripheral chemoreflex activation also leads to bradycardia involving the parasympathetic drive.^{8,19} Nevertheless, the lack of conspicuous bradycardia after combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve in rats from the CONT group is consistent with data from a previous report by Murata et al.²⁴ These authors demonstrated that carotid chemoreceptor activation through intracarotid injection of sodium cyanide inhibited the baroreflex vagal bradycardia elicited by electric stimulation of the aortic depressor nerve in anesthetized rats. They concluded that a mechanism dependent on afferent

Figure 4. A to D, Changes in heart rate (Δ HR) in response to combined electric stimulation (5 V; 1 ms; 15, 30, 60, and 90 Hz) of the carotid sinus and carotid sinus nerve in conscious rats during 20 s. Data are expressed as mean $\pm$ SEM; * P <0.05 compared with the CONT group; † P <0.05 compared with the CHEMO-X group; ‡ P <0.05 compared with the BARO-X group. BARO-X indicates denervated carotid baroreceptor; CHEMO-X, denervated carotid body; CONT, control; and TOTAL-X, denervated carotid body plus denervated carotid baroreceptor.

inputs from the carotid chemoreceptors blunted the baroreceptor function.²⁴

It is interesting that the absence of carotid baroreceptors (ie, in the BARO-X group) seems to enable full electric activation of the carotid chemoreceptors, because under these conditions, in addition to the already mentioned hypertensive responses, a significant bradycardia was observed at frequencies of 30, 60, and 90 Hz. The interplay of baro- and chemoreceptor control of autonomic function has been investigated under both experimental^{25–27} and clinical^{9,28,29} research conditions. Somerset al⁹ provided direct evidence in humans of the unique ability of the chemoreflex to concurrently activate the parasympathetic drive to the heart and the sympathetic discharge to resistance vessels. Therefore, the remarkable bradycardia elicited by the activation of the chemoreflex in the absence of the baroreflex in conscious rats corroborates the hypothesis of a convergence of baroreceptor and peripheral chemoreceptor afferents on the medulla.^{24,28}

Of note, the current study did not investigate the respiratory function during the combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve in conscious rats. Nevertheless, Alnima et al¹⁶ demonstrated that a short-term (2–4 minutes) protocol for carotid BAT in patients with resistant hypertension caused no change in end-tidal carbon dioxide, partial pressure of carbon dioxide, breath duration, and breathing frequency, combined with highly significant decrease in mean arterial pressure during electric activation. These authors concluded that carotid BAT using the Rheos system involved no appreciable attendant activation of carotid body chemoreceptors during the device therapy.¹⁶ Certainly, this is not the case concerning the approach used in the current study in conscious rats, which deserves a thorough investigation of the respiratory changes because of the direct activation of the carotid chemoreflex.

In conclusion, combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve in conscious rats produced a significant hypotensive response, which was potentiated by carotid body denervation. These findings demonstrated that concomitant carotid chemoreceptor activation blunts carotid baroreflex-mediated hypotension. Moreover, combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve in the absence of the carotid baroreceptors, but with intact carotid chemoreceptors, caused hypertension and bradycardia; this observation provides support for the hypothesis that carotid chemoreceptors are concomitantly activated by combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve. Finally, the absence of chemo- and baroreceptor afferents hampered any reflex hemodynamic response (MAP and HR) elicited by unilateral combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve in conscious rats.

Perspectives

Combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve in conscious rats is a useful experimental model that, from the translational point of view, may

bring important insights into the mechanisms underlying BAT. Using this experimental model, the present study shows that combined electric stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve concomitantly activates both carotid baroreceptors and chemoreceptors, indicating that attendant carotid chemoreceptor activation blunted the hypotensive response in conscious rats. Nevertheless, it is of note that recent study of Alnima et al¹⁶ indicates no relevant carotid body coactivation with Rheos system in patients with resistant hypertension, probably because their pulse generator is implanted at the surface of each carotid sinus wall without reaching the nearby located carotid body chemoreceptors.¹⁶

Sources of Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Disclosures

None.

References

1. Bisognano JD, Bakris G, Nadim MK, Sanchez L, Kroon AA, Schafer J, de Leeuw PW, Sica DA. Baroreflex activation therapy lowers blood pressure in patients with resistant hypertension: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled rheos pivotal trial. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:765–773. doi: 10.1016/j.jacc.2011.06.008.
2. De Leeuw PW, Kroon AA, Scheffers I. Baroreflex hypertension therapy with a chronically implanted system: preliminary efficacy and safety results from the Rheos DEBuT-HT study in patients with resistant hypertension. *J Hypertens*. 2006;24:S300–301.
3. Heusser K, Tank J, Engeli S, Diedrich A, Menne J, Eckert S, Peters T, Sweep FC, Haller H, Pichlmaier AM, Luft FC, Jordan J. Carotid baroreceptor stimulation, sympathetic activity, baroreflex function, and blood pressure in hypertensive patients. *Hypertension*. 2010;55:619–626. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.140665.
4. Alnima T, de Leeuw PW, Kroon AA. Baroreflex activation therapy for the treatment of drug-resistant hypertension: new developments. *Cardiol Res Pract*. 2012;2012:587194. doi: 10.1155/2012/587194.
5. DiBona GF. Sympathetic nervous system and hypertension. *Hypertension*. 2013;61:556–560. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00633.
6. Doumas M, Faselis C, Kokkinos P, Anyfanti P, Tsioufis C, Papademetriou V. Carotid baroreceptor stimulation: a promising approach for the management of resistant hypertension and heart failure. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014;12:30–37.
7. Zucker IH, Hackley JF, Cornish KG, Hiser BA, Anderson NR, Kieval R, Irwin ED, Serdar DJ, Peuler JD, Rossing MA. Chronic baroreceptor activation enhances survival in dogs with pacing-induced heart failure. *Hypertension*. 2007;50:904–910. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.095216.
8. Franchini KG, Krieger EM. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv Syst*. 1993;42:63–69.
9. Somers VK, Dyken ME, Mark AL, Abboud FM. Parasympathetic hyperresponsiveness and bradyarrhythmias during apnoea in hypertension. *Clin Auton Res*. 1992;2:171–176.
10. McBryde FD, Abdala AP, Hendy EB, Pijacka W, Marvar P, Moraes DJ, Sobotka PA, Paton JF. The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nat Commun*. 2013;4:2395. doi: 10.1038/ncomms3395.
11. Paton JF, Sobotka PA, Fudim M, Engelman ZJ, Engleman ZJ, Hart EC, McBryde FD, Abdala AP, Marina N, Gourine AV, Lobo M, Patel N, Burchell A, Ratcliffe L, Nightingale A. The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases. *Hypertension*. 2013;61:5–13. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00064.
12. Marcus NJ, Del Rio R, Schultz EP, Xia XH, Schultz HD. Carotid body denervation improves autonomic and cardiac function and attenuates

- disordered breathing in congestive heart failure. *J Physiol.* 2014;592(pt 2):391–408. doi: 10.1113/jphysiol.2013.266221.
13. de Leeuw PW, Alnima T, Lovett E, Sica D, Bisognano J, Haller H, Kroon AA. Bilateral or unilateral stimulation for baroreflex activation therapy. *Hypertension.* 2015;65:187–192. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04492.
  14. Jordan J, Heusser K, Brinkmann J, Tank J. Electrical carotid sinus stimulation in treatment resistant arterial hypertension. *Auton Neurosci.* 2012;172:31–36. doi: 10.1016/j.autneu.2012.10.009.
  15. Krieger EM, Salgado HC, Michelini LC. Resetting of the baroreceptors. *Int Rev Physiol.* 1982;26:119–146.
  16. Alnima T, Goedhart EJ, Seelen R, van der Grinten CP, de Leeuw PW, Kroon AA. Baroreflex activation therapy lowers arterial pressure without apparent stimulation of the carotid bodies. *Hypertension.* 2015;65:1217–1222. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04354.
  17. De Paula PM, Castania JA, Bonagamba LG, Salgado HC, Machado BH. Hemodynamic responses to electrical stimulation of the aortic depressor nerve in awake rats. *Am J Physiol.* 1999;277(1 pt 2):R31–R38.
  18. Durand Mde T, Castania JA, Fazan R Jr, Salgado MC, Salgado HC. Hemodynamic responses to aortic depressor nerve stimulation in conscious L-NAME-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;300:R418–R427. doi: 10.1152/ajpregu.00463.2010.
  19. Franchini KG, Krieger EM. Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic-denervated rats. *Am J Physiol.* 1992;262(4 pt 2):R677–R683.
  20. Sapru HN, Krieger AJ. Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1977;42:344–348.
  21. Lohmeier TE, Irwin ED, Rossing MA, Sendar DJ, Kieval RS. Prolonged activation of the baroreflex produces sustained hypotension. *Hypertension.* 2004;43:306–311. doi: 10.1161/01.HYP.0000111837.73693.9b.
  22. Sabbah HN, Ilisar I, Zaretsky A, Rastogi S, Wang M, Gupta RC. Vagus nerve stimulation in experimental heart failure. *Heart Fail Rev.* 2011;16:171–178. doi: 10.1007/s10741-010-9209-z.
  23. Hildebrandt DA, Irwin ED, Cates AW, Lohmeier TE. Regulation of renin secretion and arterial pressure during prolonged baroreflex activation: influence of salt intake. *Hypertension.* 2014;64:604–609. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03788.
  24. Murata T, Otsu K, Kobayashi M, Nosaka S. Inhibition of baroreflex vagal bradycardia by selective stimulation of arterial chemoreceptors in rats. *Exp Physiol.* 1999;84:897–906.
  25. Heistad D, Abboud FM, Mark AL, Schmid PG. Effect of baroreceptor activity on ventilatory response to chemoreceptor stimulation. *J Appl Physiol.* 1975;39:411–416.
  26. Mancia G. Influence of carotid baroreceptors on vascular responses to carotid chemoreceptor stimulation in the dog. *Circ Res.* 1975;36:270–276.
  27. Oikawa S, Hirakawa H, Kusakabe T, Nakashima Y, Hayashida Y. Autonomic cardiovascular responses to hypercapnia in conscious rats: the roles of the chemo- and baroreceptors. *Auton Neurosci.* 2005;117:105–114. doi: 10.1016/j.autneu.2004.11.009.
  28. Somers VK, Mark AL, Abboud FM. Interaction of baroreceptor and chemoreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in normal humans. *J Clin Invest.* 1991;87:1953–1957. doi: 10.1172/JCI115221.
  29. Timmers HJ, Wieling W, Karemaker JM, Lenders JW. Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans. *J Physiol.* 2003;553(pt 1):3–11. doi: 10.1113/jphysiol.2003.052415.

Novelty and Significance

What Is New?

- Baroreflex activation therapy applied to resistant hypertension and heart failure has been developed recently aiming to inhibit sympathetic over-activity and increase parasympathetic tone in patients with resistant hypertension and heart failure. Although this clinical approach takes into account the carotid baroreflex activation, it is possible that some other mechanism, for instance, the peripheral chemoreflex, may be involved in this device-based therapeutical approach. Therefore, it was examined, in conscious rats, the role played by the activation of the peripheral chemoreceptors concomitant with the electric activation of the carotid baroreflex.

What Is Relevant?

- Despite that baroreflex activation therapy has shown promising results for resistant hypertension and heart failure therapy, the mechanisms

involved in this clinical approach still deserve thorough investigation. Because clinically it is not easy to assess all mechanisms involved in baroreflex activation therapy, an experimental model with selective denervation of carotid chemo- and baroreceptors in rats may bring new insights for better understanding these mechanisms.

Summary

This study demonstrates that carotid chemoreceptor activation attenuates the hypotensive response caused by electric stimulation of the carotid baroreflex in conscious rats. Accordingly, this finding may provide useful insight for clinical studies using baroreflex activation therapy in resistant hypertension and heart failure.

The role of chemoreceptor activation in hemodynamic responses to electrical stimulation of the carotid sinus in conscious rats

Pedro L. Katayama¹, Jaci A. Castania¹, Daniel P. M. Dias¹, Kaushik P. Patel², Rubens Fazan Jr.¹, Helio C. Salgado¹

¹ Department of Physiology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

² Department of Cellular & Integrative Physiology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA

Corresponding author:

Helio C. Salgado, MD, PhD, Department of Physiology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; e-mail: hcsalgado@fmrp.usp.br; telephone: +55 16 3315 3201; fax: +55 16 3315 0221

Data Supplement

Methods

Animals

The experiments were conducted on male Wistar rats (270–310 g) from the Central Animal Facility of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Rats were individually housed with unrestricted access to food and tap water and maintained in a light controlled (12:12 h light–dark cycle) environment. All procedures used in this study were reviewed and approved by the Committee of Ethics in Animal Research of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo (Protocol N. 143/2013).

Surgical procedures

Rats were anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (50 mg/kg and 10 mg/kg, respectively) given intraperitoneally and then were subjected to a single surgical procedure. Polyethylene catheters (PE-50 attached to PE-10, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) were implanted in the left femoral artery and vein. Catheters were tunneled subcutaneously and exteriorized on the back of the nape. Then, the animals underwent a midline ventral neck incision, followed by exposure of the right common carotid artery and right carotid bifurcation. The right carotid body artery was carefully isolated under microscope magnification, tied, and cut distally to the ligation, according to the carotid chemoreceptor denervation procedures previously described by Franchini and Krieger.¹ Next, the left common carotid artery and left carotid bifurcation were exposed, and different procedures were carried out depending on the experimental protocol. CHEMO-X rats were subjected to the left carotid chemoreceptor denervation. BARO-X rats were subjected to the left carotid baroreceptor denervation by carefully cutting baroreceptor afferents in the carotid sinus region via a modification of the surgical technique described by Krieger.² TOTAL-X rats underwent both procedures described above.

Finally, all rats were implanted with a bipolar stainless steel electrode (0.008 inch bare, 0.011 inch Teflon coated; A-M Systems, Sequim, WA, USA) placed around the left carotid sinus including carotid sinus nerve, after the superior cervical ganglion was slightly shifted to expose the carotid sinus (Figure 1). Electrode leads consisted of 2 mm-long hooks separated by 2 mm. Next, the leads were carefully covered with silicone elastomer (Kwik-Sil; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) to insure proper insulation. A 30 s period was allowed for complete polymerization of the silicone elastomer. The open ends of the wires were exteriorized on the back of the nape and soldered to a small plug (GF-6, Microtech, Boothwyn, PA, USA) and the ventral neck skin incision was sutured.

Experimental protocol

Twenty-four hours after surgical procedures, conscious, freely moving rats had the arterial catheter connected to a pressure transducer (MLT844; ADInstruments, Sydney, Australia), coupled to an analogical-to-digital interface (DI-220 Dataq Instruments, Akron, OH, USA). The pulsatile arterial pressure was continuously sampled (2 kHz) by an IBM PC equipped with a LabChart (ADInstruments, Sydney, Australia) that processed the signal by applying an algorithm to detect cycle-to-cycle inflection points and generated beat-by-beat time series of mean arterial pressure (MAP) and HR. An electrical stimulator (S48 Square Pulse Stimulator; Grass Products/Natus Neurology Incorporated, Middleton, WI, USA) was used to stimulate the carotid sinus. Rats that showed any sign of distress during the electrical stimulation were excluded from the study. Pulsatile arterial pressure was recorded during 20 min under baseline conditions, followed by successive 20 s long sessions of electrical stimulation of the carotid sinus (pulse width: 1 ms; voltage: 5 V at 15 Hz, 30 Hz, 60 Hz,

and 90 Hz, applied in a random order. At least a 5 min interval was observed for each period of stimulation. Baseline values of MAP and HR were collected from a 20 s period which preceded the beginning of each frequency of electrical stimulation of the carotid sinus. The maximum responses in MAP and HR to electrical stimulations were recorded.

Test for efficacy of chemoreceptor and baroreceptor denervation

Following the completion of all electrical stimulation protocols, rats from all groups were subjected to KCN (40 μ g; IV) administration in order to test the efficacy of carotid body denervation surgery in CHEMO-X and TOTAL-X rats. Carotid chemoreceptors denervation was confirmed by the absence of hemodynamic responses to intravenous KCN administration. Additionally, to test the effectiveness of the selective left carotid baroreceptor denervation in BARO-X and TOTAL-X rats, a technique described by Sato and colleagues³ was adapted and carried out. Briefly, under ketamine/xylazine anesthesia, BARO-X and TOTAL-X rats were subjected to a midline ventral neck incision to identify and expose the left external and internal carotid, occipital, and carotid body arteries. The left common carotid artery was ligated proximally, and the distal portion was clamped with a bulldog spring clamp. Then, the left common carotid artery was immersed in a warm saline bath. In the present study, instead of using ball bearings for embolization of internal carotid and pterygopalatine arteries at the entrance at the skull, nylon monofilaments sutures were tied around both vessels. Polyethylene tubing (PE-50, Becton Dickinson) filled with saline and connected to a fluid-filled dome pressure transducer (MLT844, ADInstruments, Sydney, Australia) was inserted into the common carotid artery through an incision in the vascular wall made between the clamped and the ligated portions of the vessel. Next, when the polyethylene tubing reached the suture level, the threads were tied, and the bulldog spring clamp was released, allowing changes (increase and decrease) in the left carotid sinus pressure. The test consisted of changes in the left carotid sinus pressure between 60 mmHg and 180 mmHg, in 20 mmHg steps with 1 min duration. During this procedure, the pulsatile arterial pressure was continuously recorded. The absence of the left carotid baroreceptors in both groups was confirmed by a lack of hemodynamic responses to progressive changes in the left carotid sinus pressure.

Statistical analysis

Results are presented as mean $\pm$ standard error of the mean. The Kolmogorov–Smirnov test was applied to assess the normality of data distribution. Comparison between the mean values of MAP and HR before and after each session of electrical stimulation of the carotid sinus was performed by means of the paired *t*-test. MAP and HR responses to electrical stimulation of the carotid sinus, at each stimulation frequency, were compared among groups by one-way ANOVA followed by the post-hoc Newman–Keuls test. The significance level was set at $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using SigmaStat 3.5 software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

Results

Efficacy of the denervation of the carotid bodies and/or carotid baroreceptors

Intravenous administration of KCN caused no hemodynamic responses (Δ MAP and Δ HR) in CHEMO-X and TOTAL-X groups; this observation confirmed that the chemoreceptors had been denervated. The CONT and BARO-X groups exhibited hypertensive (20 ± 6 mmHg and 28 ± 8 mmHg, respectively) and bradycardic (-54 ± 13 bpm and -54 ± 13 bpm, respectively) responses following KCN administration. The absence of the left carotid baroreceptors in both the BARO-X and TOTAL-X groups was confirmed under anesthesia by the lack of hemodynamic (Δ MAP and Δ HR) responses to progressive increases in left carotid sinus pressure.

References

1. Franchini KG, Krieger EM. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv Syst.* 1993;42:63-69.
2. Krieger EM. Neurogenic hypertension in the rat. *Circ Res.* 1964;15:511-521.
3. Sato T, Kawada T, Miyano H, Shishido T, Inagaki M, Yoshimura R, Tatewaki T, Sugimachi M, Alexander J, Sunagawa K. New simple methods for isolating baroreceptor regions of carotid sinus and aortic depressor nerves in rats. *Am J Physiol.* 1999;276:H326-332.

Supplemental Figures and Legends

Figure S1. Frequencies of electrical stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve versus mean arterial pressure (MAP) response. Groups: control, CONT; denervated carotid body, CHEMO-X; denervated carotid baroreceptor, BARO-X; denervated carotid body plus denervated carotid baroreceptor, TOTAL-X. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean; *P<0.05 compared to CONT group; †P<0.05 compared to CHEMO-X group; ‡P<0.05 compared to BARO-X group.

Figure S2. Individual hemodynamic responses to combined electrical stimulation of the carotid sinus and the carotid sinus nerve with different frequencies (Hz). Groups: control (CONT, n=7); chemoreceptor denervated (CHEMO-X, n=7); baroreceptor denervated (BARO-X, n=6); total denervated (TOTAL-X, n=7). 15 Hz: panel A; 30 Hz: panel B; 60 Hz: panel C; 90 Hz: panel D. Δ MAP: change in mean arterial pressure; Δ HR: change in heart rate.

JOURNAL CLUB

Adrenaline and the carotid body during hypoglycaemia: an amplifying mechanism?

Pedro Lourenço Katayama

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

Email: katayamapl@gmail.com

The moment-to-moment regulation of metabolism is essential to life. It optimises conditions to keep cells working efficiently even when faced with a variety of metabolic challenges that occur constantly in both physiological and pathological situations. To respond adequately to these challenges, a well-orchestrated adjustment at the molecular, cellular, tissue and system levels is necessary. Quite recently the carotid body has been considered as a multifunctional structure. Besides its well-established role in promoting autonomic and ventilatory adjustments to changes in O_2 , CO_2 and/or pH in arterial blood, there is a growing body of scientific evidence revealing that the carotid body can respond to other stimuli such as glucose, hormones, K^+ , osmolarity, proinflammatory cytokines and temperature (Kumar & Prabhakar, 2012). Because of this unique ability to accurately monitor the chemical composition of arterial blood, the carotid body may be involved in numerous physiological and pathological processes such as hypertension and heart failure. Currently, considerable attention has been paid to elucidate the role of the carotid body in the regulation of metabolism. More specifically, some studies have shown that the carotid body is essential in maintaining body homeostasis during metabolic challenges such as hypoglycaemia.

In a recent study published in *The Journal of Physiology*, Thompson *et al.* (2016) highlighted that the carotid body plays an important role in a counter-regulatory response to hypoglycaemia. The authors showed that carotid body activation is crucial to match ventilation to the hypermetabolic state induced by hypoglycaemia, avoiding an increase in P_{aCO_2} and consequently acidosis. Using an impressive range of *in vivo* functional studies, the new discovery was that the carotid

body-mediated ventilatory adjustments to hypoglycaemia were adrenaline dependent and mediated by β -adrenoceptors. In anaesthetised Wistar rats, they showed that insulin-induced hypoglycaemia increased ventilation and CO_2 sensitivity. Both effects were abolished by either adrenalectomy or propranolol administration, strongly suggesting that these adjustments during hypoglycaemia depend on adrenaline and its β -adrenoceptors. The other arm of the study was to verify the effect of adrenaline itself on ventilation and CO_2 sensitivity. Through intravenous adrenaline infusion, Thompson *et al.* (2016) found that adrenaline mirrored the effects caused by hypoglycaemia, increasing both ventilation and CO_2 sensitivity. However, when adrenaline was infused after bilateral carotid sinus nerve section, the rise in minute ventilation was significantly attenuated and P_{aCO_2} was found to be higher compared with control, denoting a clear ventilation–metabolism mismatch. This protocol revealed that the carotid body mediates the ventilatory changes during adrenaline infusion. It is important to note that, to exclude a possible effect of blood pressure changes on ventilation, the authors carefully chose an adrenaline dose that did not affect arterial blood pressure levels. Finally, through a Ca^{2+} imaging experiment, the authors demonstrated that the hypercapnia-induced increase in intracellular Ca^{2+} in isolated carotid body type I cells is potentiated by adrenaline, supporting the notion that this hormone is able to stimulate the carotid body directly.

The data presented by Thompson *et al.* (2016) bring new insights into the mechanisms by which the carotid body can participate in the regulation of metabolism. It is noteworthy to highlight the evidence of the important role of adrenaline in stimulating the carotid body-mediated hyperventilation during hypoglycaemia. This finding could answer a question raised by Bin Jaliah *et al.* (2004); in their study, Bin Jaliah *et al.* (2004) concluded that the carotid body-mediated hyperventilation during hypoglycaemia depends on another stimulus rather than low glucose and insulin, suggesting that this effect could be triggered by some other factor related to hypermetabolism. On the other hand, and in disagreement with these results, Ribeiro

et al. (2013) concluded that insulin is the factor activating the carotid body-mediated hyperventilation during hypoglycaemia, since insulin increased ventilation even during a euglycaemic clamp and because this ventilatory response was abolished after carotid sinus nerve bilateral resection. The latter results support the hypothesis that insulin could be the first stimulus to the carotid body during hypoglycaemia, triggering a rise in sympathetic outflow. This heightened sympathetic activity could then activate the sympathoadrenal axis, increasing adrenaline release. Adrenaline, in turn, can finally stimulate the carotid body to promote the ventilatory adjustments during hypoglycaemia and further amplify the reflex increase in sympathetic activity. Thus, it is possible that the carotid body could respond in a temporally dispersed fashion during hypoglycaemia. However, further studies are needed to test this proposal.

Another notable contribution of the study of Thompson *et al.* (2016) is that their results point towards the existence of a bidirectional link between adrenaline and carotid body. It is well known, as eluded to above, that carotid body activation increases adrenaline release through the sympathoadrenal axis. However, the effects of adrenaline on carotid body function are mostly unexplored and warrant further investigation. It could be possible that bidirectional crosstalk between adrenaline and the carotid body is engaged in the regulation of other physiological and pathological conditions. For example, there are numerous studies demonstrating the involvement of the carotid body in sympathetically mediated conditions such as hypertension, heart failure, sleep apnoea and more recently metabolic disorders (Paton *et al.* 2013). In all cases, carotid body hypertonicity importantly contributes to a heightened sympathetic outflow. Because of this, there is a growing interest in both experimental and clinical scenarios to better understand the mechanisms that lead to carotid body hypertonicity and hyperreflexia in order to find ways to modulate these activities. The recent study by Thompson *et al.* (2016) further contributes to our understanding of the mechanisms involved in carotid body aberrant signalling since they showed that adrenaline can

stimulate the carotid body during hypoglycaemia. It could be that adrenaline is a contributor to the hypertonicity and hyperreflexia generated by the carotid body in chronic conditions of hypertension and the metabolic syndrome. Thus, it is plausible that there is a positive feedback interaction between adrenaline and the carotid body.

Despite all the evidence presented, the mechanisms involved in stimulation of the carotid body by adrenaline remain to be determined. A few older studies hypothesised that adrenaline can affect carotid body function via β -adrenoceptor activation. Mir *et al.* (1983) found that subcutaneous injection of adrenaline or β -adrenoceptor agonists such as isoprenaline and salbutamol increased the cAMP levels in the carotid body of rats. Also, the authors showed that the isoprenaline-induced increase in cAMP content in the rat carotid body was blocked either by propranolol, a non-specific β -adrenoceptor antagonist, or by a selective β_2 -adrenoceptor antagonist. On the other hand, betaxolol, a selective β_1 -adrenoceptor antagonist failed to block the increase in carotid body cAMP levels, suggesting that the carotid body response to isoprenaline depends on β_2 -adrenoceptors. The data presented by Thompson *et al.* (2016) point in the same direction, showing that carotid body stimulation by adrenaline occurs through activation of β -adrenoceptors located in the carotid body type I cells. First, β -adrenoceptor blockade by propranolol abolished the carotid body-mediated responses to adrenaline *in vivo*. Second, adrenaline potentiated the hypercapnia-induced increase in intracellular Ca^{2+} in isolated carotid body type I cells, suggesting the

presence of β -adrenoceptors in these cells. Acting on Gs protein-coupled β -adrenoceptors, adrenaline stimulates the intracellular generation of cAMP, a ubiquitous second messenger. The cAMP signalling pathway has been described as playing an important role in carotid body transduction function. Altogether, this information should direct future investigations exploring the relationship between adrenaline, β -adrenoceptors and cAMP signalling in the context of the carotid body function under physiological and patho-physiological states.

In conclusion, the findings reported by Thompson *et al.* (2016) provide an important contribution to further our understanding of the multiple integrative control mechanisms underlying carotid body activity and its role in the counter-regulatory responses to hypoglycaemia. Importantly, the authors revealed that adrenaline is an essential trigger for the ventilatory adjustments mediated by the carotid body during hypoglycaemia. These findings could be extended and investigated in other pathological conditions characterised by carotid body hypertonicity and hyperreflexia. Some therapeutic methods have been suggested to reduce carotid body activity in pathological conditions, including surgical, pharmacological and electroceutical approaches. Perhaps, adrenaline could emerge as a new potential target to modulate the carotid body in some specific conditions.

References

- Bin-Jalil I, Maskell PD & Kumar P (2004). Indirect sensing of insulin-induced hypoglycaemia by the carotid body in the rat. *J Physiol* **556**, 255–266.

- Kumar P & Prabhakar NR (2012). Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr Physiol* **2**, 141–219.
- Mir AK, Pallot DJ & Nahorski SR (1983). Biogenic amine-stimulated cyclic adenosine 3',5'-monophosphate formation in the rat carotid body. *J Neurochem* **41**, 663–669.
- Paton JF, Sobotka PA, Fudim M, Engleman ZJ, Hart EC, McBryde FD, Abdala AP, Marina N, Gourine AV, Lobo M, Patel N, Burchell A, Ratcliffe L & Nightingale A (2013). The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases. *Hypertension* **61**, 5–13.
- Ribeiro MJ, Sacramento JF, Gonzalez C, Guarino MP, Monteiro EC & Conde SV (2013). Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets. *Diabetes* **62**, 2905–2916.
- Thompson EL, Ray CJ, Holmes AP, Pye RL, Wyatt CN, Coney AM & Kumar P (2016). Adrenaline release evokes hyperpnoea and an increase in ventilatory CO_2 sensitivity during hypoglycaemia: a role for the carotid body. *J Physiol* **594**, 4439–4452.

Additional information

Competing interests

None declared.

Funding

The author is supported by a scholarship from São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Acknowledgements

The author would like to thank Professor Helio Cesar Salgado and Professor Julian F. R. Paton for their helpful insights in the preparation of this paper.

Correlation between RR, inter-systolic and inter-diastolic intervals and their differences for the analysis of spontaneous heart rate variability

D P M Dias, L E V Silva, P L Katayama, C A A Silva,
H C Salgado and R Fazan Jr

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

E-mail: rfazan@usp.br

Received 30 September 2015, revised 22 May 2016

Accepted for publication 24 May 2016

Published 22 June 2016

Abstract

Analysis of heart rate variability (HRV) is performed through interbeat interval time series derived from either electrocardiographic or arterial pressure (AP) recordings. However, little attention has been given to the reliability of calculating the time series from different sources, i.e. electrocardiogram (ECG) or pulse intervals (PI). Therefore, the present study aimed to evaluate the correlation between interbeat interval time series obtained from RR, inter-systolic (SS) and inter-diastolic (DD) intervals, as well as their impact on indices of HRV calculated from series of RR or PI. Conscious rats previously instrumented with subcutaneous electrodes and a catheter into the femoral artery were subjected to simultaneous ECG and AP recording for 5 min. Correlation and Bland–Altman plots between RR and PI were evaluated. Moreover, HRV was analyzed in time (mean cardiac interval, SDNN and RMSSD) and frequency domain (power in LF and HF spectral bands) as well as by nonlinear approaches (symbolic dynamics and sample entropy). First, RR showed a stronger correlation with PI calculated by DD than SS. Second, most HRV indices showed similar results when calculated with RR or DD series, but not with SS series. Considering RR interval as the gold standard for the calculation of cardiac cycle, when using PI inter diastolic intervals are the better choice to study HRV. These findings are quite relevant, especially when AP recording is used for HRV analysis.

Keywords: arterial pressure, diastolic, electrocardiogram,
heart rate variability, pulse interval, systolic

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

1. Introduction

The analysis of heart rate variability (HRV) has emerged as a valuable and reliable tool to assess cardiac autonomic modulation in either physiological or pathophysiological condition (Malik *et al* 1996, Sassi *et al* 2015). However, several methodological issues involved in data sampling and processing may lead to inaccuracy. Calculation of time intervals between successive R waves (RR) from the electrocardiogram (ECG) is the most used approach employed to generate beat-by-beat series of cardiac intervals (tachograms) and is considered the 'gold standard' procedure for HRV analysis (Russoniello *et al* 2013, Schäfer and Vagedes 2013). Nevertheless, especially in studies with experimental animals, the analysis of HRV is usually performed with pulse intervals (PI) time series, i.e. successive intervals between waves of systolic or diastolic arterial pressure (AP).

Both ECG and AP recordings require mathematical algorithms that detect inflection points and identify each cardiac cycle to calculate the time length between two successive beats. Most computer software process AP recordings and detect the highest values (systolic pressure) of cardiac cycles, measuring PI as the time length between them. Nevertheless, few studies used the lowest point (diastolic pressure) for the generation of beat-by-beat time series of PI.

A recent study by Chen *et al* (2013) compared HRV indices calculated from time series obtained using the ECG or photoplethysmographic measurement of AP in human beings. It was seen that the HRV results obtained from RR intervals correlate better with results from PI derived from inter-diastolic (DD), instead of inter-systolic (SS) intervals, suggesting that the DD intervals are more appropriate for HRV analysis. However, the study of Chen *et al* (2013) was carried out in human beings using an indirect method of AP recording.

The aim of the present study was to examine the correlation and agreement between RR and PI time series, following computation of time intervals between adjacent systolic or diastolic values, in conscious rats. Moreover, we assessed linear and nonlinear indices of HRV using series of RR, SS and DD intervals. It is expected that the findings of the current study will contribute to future studies using PI as a surrogate of RR for HRV analysis, especially in the experimental field.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiments were performed on male Wistar rats ($N = 9$; 270–310 g) that were individually housed and provided with food and water *ad libitum*. Rats were maintained in a light controlled (12:12 h light-dark cycle) environment. All procedures used in this study were reviewed and approved by the Committee of Ethics in Animal Research of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo (Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil).

2.2. Surgical procedures

Rats were anesthetized with a ketamine/xylazine mixture (ketamine, 50 mg kg⁻¹; xylazine, 10 mg kg⁻¹, ip) and subjected to a single surgical session. The animals were instrumented with subcutaneous ECG electrodes (lead I) and a polyethylene catheter (PE-50 and PE-10, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) was introduced into the left femoral artery. Both the

ECG electrode and the arterial catheter were tunneled subcutaneously and exteriorized at the back of the neck.

2.3. Data acquisition

Twenty-four hours after surgical procedures, simultaneous recordings of ECG and AP were carried out during 40 min on conscious freely moving rats. ECG electrodes were connected to a bioelectric amplifier (Animal BioAmp FE136, ADInstruments, Bella Vista, Australia) and the arterial catheter was connected to a pressure transducer (MLT844, ADInstruments, Bella Vista, Australia) attached to a blood pressure amplifier (Bridge Amp FE221, ADInstruments, Bella Vista, Australia). Both signals (ECG and AP) were simultaneously sampled (2 kHz) by an IBM/PC coupled to an analog-to-digital interface (ML866 PowerLab 4/30, ADInstruments, Bella Vista, Australia). ECG and AP signals were processed using a computer software (LabChart Pro v7.3.7, ADInstruments, Bella Vista, Australia) that employs algorithms to detect cycle-to-cycle inflection points in ECG and AP tracings. Following automatic detection of inflection points, all recordings were inspected by a well-experienced researcher and detection values were adjusted, as needed, to ensure proper detection of all cardiac cycles. RR intervals were obtained by measuring the time interval between adjacent R waves in the ECG while the processing of AP signals provided beat-by-beat series of PI values that were generated by measuring the time interval between successive systolic or diastolic values.

2.4. HRV analysis

HRV analysis was performed using linear and nonlinear approaches. Beat-by-beat time series of successive RR, SS and DD values were extracted from stable (free of artifacts or transients) periods of approximately 5 min (372 ± 42 s), chosen following visual inspection. They had the mean, standard deviation (SDNN) and root mean square of the successive differences (RMSSD) calculated. RR and PI variability was analyzed in the frequency domain by means of spectral analysis using open access custom computer software (CardioSeries v2.4, www.danielpenteadocom.com). Briefly, original beat-by-beat time series were converted to equally spaced series using cubic spline interpolation (10 Hz) and were divided into half-overlapping sequential sets of 512 data points (Welch periodogram). All segments of interpolated data (RR, SS and DD) were visually inspected by a well-experienced researcher in cardiovascular variability analysis looking for transients that could affect the calculation of the power spectral density (PSD). To attenuate side effects, a Hanning window was used and the spectrum of each segment was calculated using a fast Fourier transform (FFT) algorithm for discrete time series. Finally, the spectra were integrated in low- (LF: 0.20–0.75 Hz) and high-frequency (HF: 0.75–3.0 Hz) bands and results are expressed in absolute (ms^2) and normalized (nu) units. The LF/HF ratio was also calculated for assessment of the sympathovagal balance.

The variability of RR and PI series was also evaluated by two distinct nonlinear approaches: sample entropy (SampEn) and symbolic dynamics. Plugins for the computer software JBioS (Duque *et al* 2013) were used for this purpose. SampEn is essentially a measurement of regularity (or predictability) of time series so that it increases with increasing irregularity. SampEn parameters were set to $m = 2$ and $r = 15\%$ of signal standard deviation. Its calculation is described in details elsewhere (Pincus and Goldberger 1994, Richman and Moorman 2000). Symbolic dynamics, on the other hand, is a nonlinear approach to assess cardiac autonomic modulation. Symbolic dynamics was first described by Porta *et al* (2001) and is based on the transformation of beat-by-beat time series of cardiac interval values into a sequence of symbols. The symbols are grouped into four families, and the rates of occurrence of each of these

Figure 1. Illustrative representation of RR, SS and DD intervals. Left Panel: R waves, systolic and diastolic pressures marked, representing the cardiac intervals. Right Panel: tachograms generated from each recording.

families are evaluated. Briefly, RR and PI series, calculated by either SS or DD, were divided into half-overlapping segments of 300 points. Next, each segment was uniformly spread over six levels (from 0 to 5), and sequences of three consecutive values (patterns) were created. All possible patterns (i.e. 216) were grouped without any loss into four families referred to as: (1) patterns with no variation (0 V: all three symbols are equal); (2) patterns with one variation (1 V: two consecutive symbols are equal and the remaining symbol is different); (3) patterns with two like variations (2LV: all three symbols form an ascending or descending ramp) and (4) patterns with two unlike variations (2UV: all three symbols are spread over a peak or valley shaped curve). Finally, the median value of all segments is computed. Studies with pharmacological blockade (Guzzetti *et al* 2005), autonomic tests (Porta *et al* 2007) and disease models (Tobaldini *et al* 2009) indicated that 0V and 2UV indexes are capable of assessing cardiac sympathetic and parasympathetic modulation, respectively.

2.5. Statistical analysis

The results are presented as mean $\pm$ standard error of the mean. Pearson's correlation coefficient was applied to assess the correlation between the series of RR, SS and DD intervals whereas Bland–Altman (BA) plots (Bland and Altman 1986) were used to evaluate the agreement between RR interval and PI. For HRV indexes, the Friedman nonparametric two-way analysis of variance was employed with post-hoc test of Wilcoxon with Bonferroni's correction. Significant differences were considered when $P < 0.05$.

3. Results

Figure 1 illustrates the RR, SS and DD intervals (left panel), and respective tachograms (right panel). At a first glance, the results appear similar for RR, SS and DD intervals.

However, the scatter plots from figure 2 reveal that the PI calculated from DD intervals provides more precise correlation and agreement with the cardiac intervals measured by the ECG (RR), when compared to the PI derived from SS intervals. The average difference between

Figure 2. Scatter plots (upper panels) and Bland–Altman plots (lower panels) of RR versus SS (first column) and RR versus DD (second column) intervals. Bland–Altman plots show the regression line of differences (solid) and 95% prediction intervals (dashed lines).

Table 1. Pearson's correlation coefficient between cardiac intervals.

	Pearson correlation
RR × DD	0.972 ± 0.006
RR × SS	0.956 ± 0.010^a
SS × DD	0.953 ± 0.009^a

Correlations are significant in all cases.

^a $P < 0.05$ compared to RR × DD.

RR and DD was $4.1 \times 10^{-4} \pm 1.25$ ms whereas the average difference between RR and SS was $8.9 \times 10^{-4} \pm 1.62$ ms (mean $\pm$ standard deviation). Moreover, the regression line estimated from BA plots of RR versus SS intervals has both coefficients (y-intercept and slope) statistically different from zero ($P < 0.001$). In contrast, the coefficients of the regression line estimated from BA plots of RR versus DD intervals are not statistically different from zero ($P = 0.27$).

Table 1 shows the Pearson's correlation coefficients between RR, SS and DD intervals. Although RR showed high correlation with PI calculated by either SS or DD, the statistical

Table 2. Time domain HRV parameters.

	Mean (ms)	SDNN (ms)	RMSSD (ms)
RR	165 ± 5	6.4 ± 0.8	2.8 ± 0.3
SS	165 ± 5	6.6 ± 0.8 ^a	3.8 ± 0.3 ^a
DD	165 ± 5	6.4 ± 0.8 ^b	2.9 ± 0.3 ^b

^a $P < 0.05$ versus RR.

^b $P < 0.05$ versus SS.

Table 3. Frequency domain HRV parameters.

	LF abs (ms ²)	HF abs (ms ²)	LF (nu)	HF (nu)	LF/HF
RR	1.3 ± 0.4	2.6 ± 0.4	27 ± 5	73 ± 5	0.5 ± 0.1
SS	1.3 ± 0.4	4.0 ± 0.6 ^a	21 ± 5 ^a	79 ± 5 ^a	0.3 ± 0.1 ^a
DD	1.4 ± 0.5	2.6 ± 0.5 ^b	28 ± 6 ^b	72 ± 6 ^b	0.5 ± 0.1 ^b

^a $P < 0.05$ versus RR.

^b $P < 0.05$ versus SS.

Figure 3. Symbolic analysis of RR, SS and DD intervals. ^aRR is significantly different from SS; ^bSS is significantly different from DD; $P < 0.05$.

analysis revealed that the correlation between RR and DD is significantly greater than the others.

Tables 2 and 3 show the time and frequency domain of HRV parameters obtained from RR and PI (calculated from SS and DD intervals). SDNN and RMSSD were found to be different between either RR and SS intervals or SS and DD intervals. Except for the power of the LF_{abs} band, differences were observed for all other parameters, i.e. between RR and SS and between SS and DD intervals.

The results of nonlinear analysis of HRV are shown in figures 3 and 4. The occurrence of 2UV pattern was found higher in SS when compared to RR and DD (figure 3). Moreover, SS exhibited lower occurrence of 0V pattern when compared to DD (figure 3).

Finally, SampEn was found higher in SS as compared to RR and DD (figure 4).

Figure 4. Sample entropy of RR, SS and DD intervals. ^aRR is significantly different from SS; ^bSS is significantly different from DD; $P < 0.05$.

4. Discussion

We performed simultaneous recordings of ECG and AP, in conscious rats, for examining the correlation among beat-by-beat time series obtained from RR and PI intervals; the later calculated either by SS or DD periods. Even though tachograms constructed with RR or PI (SS or DD) seemed similar, the correlation and agreement between RR and PI was weaker when PI was calculated from SS interval, as compared to DD. While a proportional bias was identified between RR and SS intervals, as both the intercept and the slope of the regression line of its BA plot are different from zero, no bias was detected between RR and DD intervals. It means that RR and DD intervals may be used interchangeably. Moreover, most of HRV indices were found different when obtained from time series of SS intervals, compared to HRV indices derived from time series of DD or RR intervals. Overall, the analysis of HRV obtained from SS overestimated global variability, cardiac parasympathetic modulation and complexity of heart rate dynamics.

Although RR has been considered the gold standard for HRV analysis (Russoniello *et al* 2013, Schäfer and Vagedes 2013), PI series are commonly used for this purpose (Di Rienzo *et al* 1996, Honzíková *et al* 2003, Silva *et al* 2015). Nevertheless, the literature is scarce on assessing the reliability of PI series for the study of HRV, and little attention is paid to the fact that the PI can be extracted from both SS and DD intervals. Chen *et al* (2013) addressed this issue comparing HRV indices obtained from RR with HRV indices calculated from valley-to-valley (VV) and peak-to-peak (PP) intervals, using beat-by-beat series obtained from photoplethysmographic recordings of AP in humans. Their results showed that RR correlates better with VV than PP and that VV is more reliable than PP for HRV analysis.

Despite the fact that the current study was performed in rats and the method for PI acquisition (direct measurement of AP) contrasts with the study conducted by Chen *et al* (2013), the findings of both studies are corroborative. Although many researchers use peak (systolic) detection from the AP to calculate cardiac intervals, our results show that PI derived from DD interval is more reliable for HRV analysis. The time-domain analysis revealed that the overall variability (SDNN) was found similar when calculated with RR or DD intervals, but was higher when calculated from SS intervals. Moreover, RMSSD (i.e. an index of

parasympathetic modulation of the heart) was also found higher when calculated using SS intervals. Regarding spectral analysis, data obtained from SS intervals overestimated the cardiac parasympathetic modulation as shown by the HF power expressed both in absolute (ms^2) and normalized units (nu), while underestimated cardiac sympathetic modulation reflected by normalized (nu) LF power. As a consequence, the sympathovagal balance was found lower when obtained from SS intervals. It is noteworthy that all HRV indexes obtained from RR and DD were found similar. Spectral analysis was also performed using three other interpolation procedures (nearest, linear and cubic Hermit method; data not shown) and results were the same as cubic spline.

Concerning nonlinear methods, the results obtained following symbolic dynamics analysis are consistent with those from spectral analysis. Symbolic dynamics analysis performed using SS intervals also overestimated parasympathetic modulation as demonstrated by the higher occurrence of patterns in 2UV family in comparison to the analysis with RR or DD intervals. Conversely, the occurrence of patterns in 0V family (i.e. an index of cardiac sympathetic modulation) was found lower when symbolic analysis was carried out using SS intervals. SampEn of SS series was higher than SampEn of RR or DD, demonstrating that entropy is also overestimated on beat-by-beat time series obtained from SS intervals.

Several critical factors should be considered for better understanding of the findings of the current study. It is well known that myocardial contractility affect the slope of the rising pressure during the systolic phase (O'Rourke *et al* 2001) and minor changes in cardiac contractility or artifacts into AP recording system could influence the shape of AP pulse, resulting in displacement of the systolic peak. On the other hand, the diastolic valley is a much sharper inflection point seen at the beginning of the systolic ejection phase. Furthermore, Chen *et al* (2013) suggested that better consistency between VV and RR than between PP and RR may be due in part to questionable accuracy of peak detection. The authors associate this fact to the reflected waves that may be higher than the incident peaks resulting in false peak detection while valleys are much less affected by reflected waves.

Besides the issues concerning heart contractility and the effects of reflected waves on the reliability of data obtained following PP detection, the characteristics of the studied subjects should also be taken into account when analyzing HRV using RR or PI intervals. Liu *et al* (2013) demonstrated that overweight subjects have pronounced difference in HRV indices obtained from RR and PP (i.e. derived from plethysmographic signals) intervals. However, further studies should be carried out on investigating how physical characteristics and health status of the subjects could influence HRV indices obtained following processing of RR or PI time series.

Finally, the quality of the data from ECG and AP should be considered since the accuracy of the signal plays a role in the generation of beat-by-beat time series.

5. Conclusion

In conclusion, it was demonstrated that PI series of rats calculated from SS intervals are not similar to those derived from RR and DD intervals. Additionally, several HRV indices calculated from SS time series are different when compared to HRV indices obtained using RR or DD intervals. Therefore, the generation of beat-by-beat time series from PI data obtained from DD intervals seems to be a better choice for HRV analysis, serving as a surrogate to RR. Further studies are necessary for better understanding of the physiological mechanisms that could explain these findings as well as to verify if those differences between PI series still remain during physiological and pathophysiological stimuli.

References

- Bland J M and Altman D G 1986 Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement *Lancet* **1** 307–10
- Chen X, Chen T, Luo F and Li J 2013 Comparison of valley-to-valley and peak-to-peak intervals from photoplethysmographic signals to obtain heart rate variability in the sitting position *Proc. 6th Int. Conf. on Biomedical Engineering and Informatics (BMEI)* pp 214–8
- Di Rienzo M, Castiglioni P, Parati G, Mancia G and Pedotti A 1996 Effects of sino-aortic denervation on spectral characteristics of blood pressure and pulse interval variability: a wide-band approach *Med. Biol. Eng. Comput.* **34** 133–41
- Duque J J, Silva L E V and Murta L O 2013 Open architecture software platform for biomedical signal analysis *Proc. 35th Annual Int. Conf. of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)* pp 2084–7
- Guzzetti S, Borroni E, Garbelli P E, Ceriani E, Bella P D, Montano N, Cogliati C, Somers V K, Malliani A and Porta A 2005 Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation *Circulation* **112** 465–70
- Honzíková N, Krtická A, Nováková Z and Závodná E 2003 A dampening effect of pulse interval variability on blood pressure variations with respect to primary variability in blood pressure during exercise *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* **52** 299–309
- Liu A-B, Wu H-T, Liu C-C, Hsu C-H and Chen D-Y 2013 The factors influence compatibility of pulse–pulse intervals with R–R intervals *Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* **2013** 2068–71
- Malik M, Bigger J T, Camm A J, Kleiger R E, Malliani A, Moss A J and Schwartz P J 1996 Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use *Circulation* **93** 1043–65
- O’Rourke M F, Pauca A and Jiang X J 2001 Pulse wave analysis *Br. J. Clin. Pharmacol.* **51** 507–22
- Pincus S M and Goldberger A L 1994 Physiological time-series analysis: what does regularity quantify? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **266** H1643–56 (PMID: 8184944)
- Porta A, Guzzetti S, Montano N, Furlan R, Pagani M, Malliani A and Cerutti S 2001 Entropy, entropy rate, and pattern classification as tools to typify complexity in short heart period variability series *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **48** 1282–91
- Porta A, Tobaldini E, Guzzetti S, Furlan R, Montano N and Gneccchi-Ruscione T 2007 Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293** H702–8
- Richman J S and Moorman J R 2000 Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278** H2039–49 (PMID: 10843903)
- Russoniello C V, Zhirmov Y N, Pougatchev V I and Gribkov E N 2013 Heart rate variability and biological age: implications for health and gaming *Cyberpsychol. Behav. Soc. Netw.* **16** 302–8
- Sassi R, Cerutti S, Lombardi F, Malik M, Huikuri H V, Peng C-K, Schmidt G and Yamamoto Y 2015 Advances in heart rate variability signal analysis: joint position statement by the e-Cardiology ESC Working Group and the European Heart Rhythm Association co-endorsed by the Asia Pacific Heart Rhythm Society *Europace* **17** 1341–53
- Schäfer A and Vagedes J 2013 How accurate is pulse rate variability as an estimate of heart rate variability? A review on studies comparing photoplethysmographic technology with an electrocardiogram *Int. J. Cardiol.* **166** 15–29
- Silva L E V, Rodrigues F L, de Oliveira M, Salgado H C and Fazan R 2015 Heart rate complexity in sinoaortic-denervated mice *Exp. Physiol.* **100** 156–63
- Tobaldini E, Porta A, Wei S-G, Zhang Z-H, Francis J, Casali K R, Weiss R M, Felder R B and Montano N 2009 Symbolic analysis detects alterations of cardiac autonomic modulation in congestive heart failure rats *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **150** 21–6

JOURNAL CLUB

Baroreflex-mediated sympathetic overactivation induced by mental stress in post-traumatic stress disorder depends on the type of stressor

Luiz Eduardo Virgilio Silva^{1,2}
and Pedro Lourenço Katayama¹

¹Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

²Department of Computer Science, Institute of Mathematics and Computer Science, University of São Paulo, SP, Brazil

Email: luizeduardo@usp.br

Sympathetic overactivation has long been recognized as a deleterious condition, involved in the physiopathology of several diseases. The overactivity of the sympathetic nervous system (SNS) may be the consequence of different conditions and an intriguing question that still remains is whether diseases, such as hypertension and heart failure, are induced by increased SNS or increased SNS is a consequence of the disease progression. A reasonable assumption is that both statements can be correct, i.e. diseases might induce and be empowered by increased SNS.

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is an example of a pathological condition associated to increased risk of cardiovascular events and hypertension. Previous studies have suggested that PTSD subjects present heightened sympathetic activity which could lead to this increased risk of cardiovascular disease. However, what is triggering the SNS overactivation in these subjects remains unclear. The arterial baroreflex, being strictly related to the regulation of SNS activity, might play a key role in the autonomic imbalance towards SNS overactivation. Thus, the assessment of baroreflex function could bring elucidative information on the sources of augmented SNS activity. For that reason, the baroreflex sensitivity (BRS) is broadly used as a marker of baroreflex functioning, so that decreased BRS points to an impaired baroreflex.

Recently in *The Journal of Physiology*, Park *et al.* (2017) published an interesting study contributing to our understanding of the mechanisms involved in increased

cardiovascular risk in PTSD subjects. The authors tested the hypothesis that military war veterans with PTSD present greater SNS and haemodynamic reactivity in response not only to mental stress related to their trauma (virtual reality combat exposure; VRCE) but also to non-trauma-related mental stress (mental arithmetic; MA) when compared to matched control subjects. Park *et al.* (2017) also hypothesized that a baroreflex dysfunction might play a role in SNS overactivation during mental stress in PTSD subjects, increasing their risk of cardiovascular diseases and hypertension. In their study, for the first time, muscle sympathetic nerve activity (MSNA) was directly assessed in PTSD subjects during rest and mental stress conditions. The authors found that in response to VRCE, PTSD subjects showed significant increases in MSNA (quantified both as bursts frequency and total activity) and in heart rate when compared to matched control subjects. During MA, PTSD subjects presented greater increases in MSNA bursts frequency and in diastolic blood pressure in the first minute of the test. These data suggest that, although in a different pattern of response, PTSD leads to increased SNS and haemodynamic responses to mental stressors independently of whether they are related or unrelated to the trauma. Additionally, Park *et al.* (2017) assessed MSNA during a cold pressor test (CPT) that elicits a non-baroreflex-mediated SNS activation. The authors found that the increases in MSNA, blood pressure and heart rate were not different between PTSD and control subjects suggesting that the SNS overactivity in PTSD is restricted to mental stress conditions and, importantly, is baroreflex-mediated.

In order to confirm the influence of the baroreflex on the increased SNS and haemodynamic responses to mental stress in PTSD subjects, the authors assessed sympathetic and cardiac BRS at rest and during VRCE. Both sympathetic and cardiac BRS were found to be decreased in PTSD subjects at rest when compared to control subjects. However, during VRCE only cardiac BRS was reduced in PTSD subjects. Although further tests conducted with bigger samples are still needed, these results strongly suggest that baroreflex dysfunction is an underlying mechanism

triggering SNS increased reactivity to mental stress in PTSD. Finally, Park *et al.* (2017) found that baseline highly sensitivity C-reactive protein (hsCRP) is increased in PTSD in comparison to control subjects, proposing that inflammation could be a potential mechanism leading to baroreflex dysfunction and increased SNS responses to mental stress.

The data presented by Park *et al.* (2017) bring clear-cut evidence that baroreflex dysfunction plays an important role in PTSD as in many other diseases where there is an autonomic imbalance. In PTSD, an impaired baroreflex seems to be triggering the overactivation of the SNS in response to mental stress, which in turn increases the risk of cardiovascular events and other diseases, such as hypertension. In the majority of analyses of the baroreflex, it is common to find its function evaluated solely by BRS. In fact, BRS is a valuable index of baroreflex function as it measures the magnitude of the responses elicited by the baroreflex when there is a 1 mmHg change in arterial pressure. However, another meaningful index of baroreflex function that is usually overlooked is the baroreflex effectiveness index (BEI), which can bring additional information, complementary to BRS. While BRS is related to the magnitude of the baroreflex responses, the BEI measures how much of the stimuli is being transduced into a response. In other words, BEI is the percentage of change in arterial pressure that is effectively transmitted through the neural pathways to a reflex response (changing, for example, heart rate or MSNA) (Di Rienzo *et al.* 2001).

To illustrate the importance of BEI, it was recently shown that in rats with early heart failure, the BRS of renal sympathetic nerve activity is not altered, compared to controls. However, the BEI of rats with early heart failure is half the BEI of controls, indicating that although the sensitivity is the same, the effectiveness of the baroreflex to respond to changes in arterial pressure is affected (Lataro *et al.* 2017). We believe that subjects with PTSD might have a decreased BEI, compared to controls, as not only decreased sensitivity (BRS) but also the failure to respond to some of the pressure stimuli (BEI) may be associated to SNS overactivity during mental stress.

On the one hand the BEI could add value and consolidate the findings presented by BRS. On the other hand the BEI could be elucidative and clarify whether or not the baroreflex is impaired even when BRS is not altered. This could be the case, for example, when subjects were submitted to combat-related mental stress (VRCE) in the study of Park *et al.* (2017), where sympathetic BRS was not found to be different between PTSD and controls. Possibly, BRS and BEI are indices related to distinct pathways within the neural baroreflex regulatory system, and as such, they are important in the understanding of the associated diseases.

It is also worth noting the probable involvement of the limbic system during VRCE-induced responses shown in the study of Park *et al.* (2017). VRCE evoked traumatic memories in PTSD subjects, activating limbic regions such as hippocampus and amygdala, directly involved in fear/trauma-related information processing. These regions were found to modulate the hypothalamus–pituitary axis and the autonomic nervous system by sending projections to the hypothalamus and to other preautonomic areas (Ulrich-Lai & Herman, 2009), affecting SNS output and/or its regulation by the baroreflex. Thus, this could help to explain the significant increase in MSNA and heart rate that was observed in PTSD but not in control subjects during VRCE in the study of Park *et al.* (2017). Additionally, the assumption that the different mental stressors – VRCE and MA – recruited different brain regions should be taken into consideration. It is likely that MA, instead of the limbic system, predominantly activated cortical regions such as the prefrontal and parietal cortices, affecting the SNS output and regulation in a different manner. This

could be another potential explanation of the different patterns of response caused by VRCE and MA in the study of Park *et al.*

In conclusion, Park *et al.*'s study represents a step forward in understanding the mechanisms involved in the higher cardiovascular risk in PTSD. The data presented by the authors showed that a decreased BRS contributes to an SNS hyperactivation during different mental stress situations. Also, they suggested that chronic inflammation could be one possible factor causing BRS impairment and could contribute to increasing the central SNS output. In addition to their findings, we suggest that useful and complementary information could be extracted from the BEI, which provides a different view of the baroreflex function by measuring whether the changes in arterial pressure are, in fact, transduced into reflex homeostatic responses. Moreover, we have highlighted the potential role played by different brain regions in generating and modulating the SNS activity during the different types of mental stress (VRCE and MA). Considering all of these potential mechanisms, future studies should be directed to investigating what is triggering the decreased BRS and the exacerbated sympathetic reactivity in response to distinct mental stressors in PTSD subjects. The findings will contribute to the development of therapeutic strategies targeting the primary causes of cardiovascular risk in PTSD.

References

- Di Rienzo M, Parati G, Castiglioni P, Tordi R, Mancia G & Pedotti A (2001). Baroreflex effectiveness index: an additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**, R744–R751.

Lataro RM, Silva L EV, Silva CAA, Salgado HC & Fazan R (2017). Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in early heart failure assessed by the sequence method. *J Physiol* **595**, 3319–3330.

Park J, Marvar PJ, Liao P, Kankam ML, Norrholm SD, Downey RM, McCullough SA, Le N-A & Rothbaum BO (2017). Baroreflex dysfunction and augmented sympathetic nerve responses during mental stress in veterans with post-traumatic stress disorder. *J Physiol* **595**, 4893–4908.

Ulrich-Lai YM & Herman JP (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* **10**, 397–409.

Additional information

Competing interests

None.

Author contributions

Both authors have approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Funding

The authors are supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Acknowledgements

The authors thank Prof. Rubens Fazan Jr and Prof. Helio C. Salgado for their support.

Variable role of carotid bodies in cardiovascular responses to exercise, hypoxia and hypercapnia in spontaneously hypertensive rats

Wioletta Pijacka¹ , Pedro L. Katayama^{1,2}, Helio C. Salgado², Gisele S. Lincevicius^{1,3}, Ruy R. Campos³, Fiona D. McBryde⁴ and Julian F.R. Paton^{1,4}

¹Bristol CardioNomics Group, School of Physiology, Pharmacology and Neuroscience, Medical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, BS8 1TD, UK

²Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

³Cardiovascular Division – Department of Physiology, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Brazil

⁴Cardiovascular Autonomic Research Cluster, Department of Physiology, Faculty of Medical and Health Sciences, University of Auckland, Private Bag 92019, Auckland, 1142, New Zealand

Edited by: Harold Schultz & Frank Powell

Key points

- Carotid bodies play a critical role in maintaining arterial pressure during hypoxia and this has important implications when considering resection therapy of the carotid body in disease states such as hypertension.
- Curbing hypertension in patients whether resting or under stress remains a major global health challenge.
- We demonstrated previously the benefits of removing carotid body afferent input into the brain for both alleviating sympathetic overdrive and reducing blood pressure in neurogenic hypertension.
- We describe a new approach in rats for selective ablation of the carotid bodies that spares the functional integrity of the carotid sinus baroreceptors, and demonstrate the importance of the carotid bodies in the haemodynamic response to forced exercise, hypoxia and hypercapnia in conditions of hypertension.
- Selective ablation reduced blood pressure in hypertensive rats and re-set baroreceptor reflex function accordingly; the increases in blood pressure seen during exercise, hypoxia and hypercapnia were unaffected, abolished and augmented, respectively, after selective carotid body removal.
- The data suggest that carotid body ablation may trigger potential cardiovascular risks particularly during hypoxia and hypercapnia and that suppression rather than obliteration of their activity may be a more effective and safer route to pursue.

Wioletta Pijacka is working as a Senior Research Associate at the University of Bristol. Her work has focused on identifying new therapeutic targets for blood pressure control. More specifically, she is interested in the role of the carotid body in the pathological increase of sympathetic activity leading to high blood pressure by using animal models of neurogenic and renovascular hypertension. She recently characterised the role of a purinergic receptor in this pathology. Here she presents a new approach for the selective resection of the carotid body that spares the carotid sinus baroreceptors and reduces blood pressure in hypertensive rats.

Abstract The carotid body has recently emerged as a promising therapeutic target for treating cardiovascular disease, but the potential impact of carotid body removal on the dynamic cardiovascular responses to acute stressors such as exercise, hypoxia and hypercapnia in hypertension is an important safety consideration that has not been studied. We first validated a novel surgical approach to selectively resect the carotid bodies bilaterally (CBR) sparing the carotid sinus baroreflex. Second, we evaluated the impact of CBR on the cardiovascular responses to exercise, hypoxia and hypercapnia in conscious, chronically instrumented spontaneously hypertensive (SH) rats. The results confirm that our CBR technique successfully and selectively abolished the chemoreflex, whilst preserving carotid baroreflex function. CBR produced a sustained fall in arterial pressure in the SH rat of ~ 20 mmHg that persisted across both dark and light phases ($P < 0.001$), with baroreflex function curves resetting around lower arterial pressure levels. The cardiovascular and respiratory responses to moderate forced exercise were similar between CBR and Sham rats. In contrast, CBR abolished the pressor response to hypoxia seen in Sham animals, although the increases in heart rate and respiration were similar between Sham and CBR groups. Both the pressor and the respiratory responses to 7% hypercapnia were augmented after CBR ($P < 0.05$) compared to sham. Our finding that the carotid bodies play a critical role in maintaining arterial pressure during hypoxia has important implications when considering resection therapy of the carotid body in disease states such as hypertension as well as heart failure with sleep apnoea.

(Received 27 October 2017; accepted after revision 29 December 2017; first published online 5 January 2018)

Corresponding author J. F. R. Paton: Cardiovascular Autonomic Research Cluster, Department of Physiology, Faculty of Medical & Health Sciences, University of Auckland, Park Road, Grafton, Auckland 1142, New Zealand. Email: J.Paton@Auckland.ac.NZ

Introduction

The carotid bodies have recently emerged as a promising therapeutic target for treating hypertension (Paton *et al.* 2013; Ratcliffe *et al.* 2014; Narkiewicz *et al.* 2016; Pijacka *et al.* 2016) and other cardiovascular diseases such as heart failure (Schultz & Marcus, 2012; Niewinski *et al.* 2013, 2017; Andrade *et al.* 2015), where the peripheral chemoreceptors exhibit increases in both sensitivity and tonic activity (Abdala *et al.* 2012; McBryde *et al.* 2013; Pijacka *et al.* 2016). We, and others, suggest that abnormal chemoreflex activity drives a long-term increase in sympathetic over-activity, resulting in a chronic, neutrally mediated hypertension (Sinski *et al.* 2012; McBryde *et al.* 2013; Moraes *et al.* 2015; Pijacka *et al.* 2016). However, the role that the carotid bodies play in mediating the dynamic cardiovascular response to acute stressors such as exercise, hypoxia and hypercapnia has not previously been studied under conditions of hypertension and may have important clinical implications especially if the carotid bodies are targeted surgically.

Exercise presents a major challenge to the cardiovascular system, where a pronounced functional hyperaemia in skeletal muscle vasculature, and subsequent fall in total peripheral resistance (TPR), must be countered by an opposing sympathetically mediated vasoconstriction to maintain or increase arterial pressure in order to avoid compromising organ perfusion (Mitchell *et al.* 1983). The pressor response to exercise is mediated by activation of the sympathetic nervous system, and has been shown to be augmented in hypertension (Smith *et al.* 2006;

Delaney *et al.* 2010). However, in hypertensive patients, exercise tolerance has been shown to be reduced by up to 30% *vs.* age-matched normotensive patients (Lim *et al.* 1996); this may be a consequence of poor skeletal muscle blood flow due to intense vasoconstriction and/or reduced sympatholysis mediated by release of local metabolites. With the evidence that carotid bodies become more active in exercise (Linton & Band, 1985; Jacobi *et al.* 1989; Ward, 1994; Paterson, 1996; Chu *et al.* 2007), they may play an essential role in ensuring that arterial pressure is maintained. Given their tonic activity and sensitisation in hypertension (see above) the carotid body reflex vasoconstrictor response may be exaggerated during exercise and offset sympatholysis. We have directly addressed this idea.

The classical stimulant for the carotid bodies is hypoxia. However, hypoxia also reduces vascular smooth muscle tone, causing a lowering of TPR and reduction in arterial pressure (Kulandavelu *et al.* 2015). The hypoxia-induced reduction in TPR may be opposed by homeostatic-reflexes that increase sympathetic outflow to maintain arterial pressure and preserve organ blood flow; the peripheral chemoreceptors participate in such mediation (Marshall & Metcalfe, 1988; Itskovitz *et al.* 1991; Stein *et al.* 1999). Importantly, if the carotid bodies are to be a clinically viable treatment target for cardiovascular disease, an understanding of the ability of the cardiovascular system to cope with hypoxia is highly pertinent, especially given the high prevalence of sleep apnoea in patients with cardiovascular diseases.

Hypoxia alone rarely occurs without concomitant hypercapnia, which also stimulates peripheral chemoreceptors (Pepper *et al.* 1996; Vidruk *et al.* 2001). However, hypercapnia also stimulates central chemoreceptors to drive hyperventilation, increased blood pressure and elevated sympathetic activity (Kanbar *et al.* 2010; Takakura & Moreira, 2011). To study the effect of hypercapnia on the carotid body without co-activation of central chemoreceptors, previous studies have either isolated the carotid body circulation from the cerebral circulation or assessed responses before and after carotid body denervation. The evidence suggests that hypercapnic stimulation of the carotid bodies in rats triggers hyperpnoea (Fiamma *et al.* 2013), but the sympathoexcitatory and pressor responses evoked by hypercapnia remained unchanged after denervation of carotid bodies in conscious rats, suggesting they play little role in mediating these cardiovascular responses (Oikawa *et al.* 2005; Sabino *et al.* 2013). We have re-assessed this here to ensure that appropriate cardiovascular adjustment can be made during hypercapnia after selective carotid body resection.

Based on the cited studies described above, we tested the hypothesis that selective carotid body resection in hypertensive rats would lead to an inability to maintain control of arterial pressure during the stressors of both exercise and hypoxia but not hypercapnia.

Methods

Ethical approval

All procedures were carried out in accordance with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986, under licence to the Home Office. All investigators understand the ethical principles under which the *Journal of Physiology* operates, and their work complies with the animal ethics checklist described by Grundy (2015). Experiments were conducted on 16–20 week old male spontaneously hypertensive (SH) rats bred within the University of Bristol Animal Services Unit and housed with a 12/12 h light (07.00–18.00 h)/dark (19.00–06.00 h) period and *ad libitum* access to food and water. In total 29 rats were used.

Validation of selective carotid body resection in the terminally anaesthetised SH rat

These experiments were performed to establish and validate our selective carotid body removal procedure. Rats ($n = 11$) were anaesthetised with intramuscular injections of ketamine (60 mg kg⁻¹; Vetalar, Zoetis, London, UK) and medetomidine hydrochloride (250 µg kg⁻¹; Domitor, Elanco Animal Health, Basingstoke, UK). Anaesthetic depth was assessed by the withdrawal reflex following a pinch to the tail or a hind paw and an additional 1/6 of an initial dose of ketamine/medetomidine hydrochloride

given as needed. The femoral vein was catheterised to allow venous access for drug infusions, and arterial pressure was measured via radio-telemetry (see below). Through a midline neck incision, the common carotid arteries were cleared, and 3.0 silk suture was used to allow easy retraction and improve access to the carotid bifurcation. In all animals the aortic depressor nerves were identified, as described previously (Pickering *et al.* 2008) and sectioned bilaterally (ADNX). Following a 30 min recovery period to record a stable baseline, the chemoreflex was tested with an i.v. bolus infusion of sodium cyanide (100 µl; 0.04%), and baroreflex function assessed using i.v. infusions of vaso-active drugs phenylephrine (0.1 mg ml⁻¹, i.v.) and sodium nitroprusside (0.1 mg ml⁻¹, i.v.) (Sigma-Aldrich Co., Poole, UK) to produce ramp changes in arterial pressure, as described previously (Abdala *et al.* 2012; McBryde *et al.* 2013; Lincevicius *et al.* 2015). Animals were then randomly divided into two groups – Time Control and Carotid Body Resection (CBR). In the CBR group, the carotid body on each side was visualised using a modular routine stereo microscope Leica M80 and surgically removed under $\times 25$ magnification, using fine surgical forceps, with care taken to preserve fine branches of the carotid sinus nerve. Chemo- and baro-reflex testing was repeated to verify that CBR was successful as reflected by an elimination of the chemoreflex-evoked pressor response and preserving of the carotid baroreflex response. Finally, we cut the carotid sinus nerves bilaterally (CSNX) to complete a full sino-aortic denervation. Baroreflex testing was then repeated to verify that the prior ADNX procedure had been performed successfully. In the Time Control group, only ADNX was performed followed by baro- and chemo-receptor reflex testing at time intervals matching those of the study protocols.

Recovery surgical protocols

Rats were implanted with radio-telemetry devices (PA-C40; DSI, St. Paul, MN, USA) to record arterial pressure, and a chronic femoral vein catheter as described previously (Waki *et al.* 2006; McBryde *et al.* 2013; Pijacka *et al.* 2016). Briefly, under ketamine/medetomidine anaesthesia as described above, the arterial pressure catheter tip was inserted into the abdominal aorta below the level of the renal arteries, and secured in place. Non-steroidal anti-inflammatory pain relief was administered pre- and post-operatively (0.004 ml/100 g of Metacam, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany). Animals were given at least 7 days of recovery before recording baseline. Femoral venous catheters were flushed with 0.9% saline/100 U heparin every second day to maintain their patency.

CBR was carried out under anaesthesia as described above. Like the non-recovery protocol, the common carotid arteries were accessed through a midline neck

incision. A 3.0 silk suture was used to retract the common carotid artery to improve visualisation and access to the bifurcation of the common carotid artery. Each common carotid artery was separated from the sternohyoid muscle and the carotid artery bifurcation was gently pulled away from the superior cervical ganglion; this allowed visualisation of the carotid body and the carotid sinus nerves. Using fine surgical forceps and under $\times 25$ magnification the carotid body was surgically removed with care taken to preserve fine branches of the carotid sinus nerve.

Experimental protocol for conscious SH rat experimentation

After recovery from implantation surgery, blood pressure was recorded continuously (Spike2 version 8, CED, Cambridge, UK) for 1 week before (Baseline) and 2 weeks after both Sham ($n = 9$) and CBR ($n = 9$) surgeries. Data represent a weekly average for light (07.00–18.00 h) and dark (19.00–06.00 h) phases. On separate days, the cardiovascular responses to baroreflex and chemoreflex activation, moderate exercise (10 m min^{-1}), hypoxia (10% O_2 , N_2) and hypercapnia (7% CO_2 , 93% O_2) were tested before and 2 weeks after Sham or CBR.

Baroreflex and chemoreflex tests

Bradycardic and tachycardic reflex responses were produced by ramp changes in arterial pressure as described above. A four-parameter sigmoidal regression function was fitted to produce baroreflex function curves, using purpose-written scripts in Spike2. The chemoreflex was tested as above.

Spontaneous baroreflex sensitivity and spectral analysis

Spontaneous baroreflex sensitivity (BRS) and spectral analysis parameter settings were used as described previously (Waki *et al.* 2006), and applied using the open access software CardioSeries v2.4 (www.danielpenteado.com). For BRS sequences, a series of at least four consecutive heart beats where there was a defined increase or decrease in systolic arterial pressure followed by a baroreflex response in pulse interval were used to fit linear regression curves; $r^2 > 0.8$. The spontaneous BRS is presented as the slope (ms mmHg^{-1}) of the linear regression analysis between systolic blood pressure and pulse interval. For heart rate and systolic blood pressure spectral analysis, beat-by-beat series of pulse intervals and systolic blood pressure were converted to evenly spaced series using cubic spline interpolation (10 Hz) and divided into half-overlapping sequential sets of 512 data points (Welch periodogram). Segments with trans-

ients that could affect the calculation of power spectral density were excluded. A Hanning window was used to attenuate side effects and the spectrum of each stationary segment was calculated using a fast Fourier transform (FFT) algorithm for discrete time series. The spectra of pulse intervals were integrated in low-frequency (LF; 0.2–0.75 Hz) and high-frequency (HF; 0.75–3 Hz) bands and the results are expressed as normalised units (nu) as described previously (Burr, 2007). The spectra of systolic arterial pressure were integrated only in low-frequency (LF; 0.2–0.75 Hz) bands and the results are expressed in absolute (mmHg^2) units. The LF/HF ratio was calculated to assess sympatho-vagal balance.

Exercise test

The cardiovascular responses to forced moderate exercise were assessed in a purpose-built motorised wheel. Rats were exercised for a total of 10 min, in a pattern consistent with voluntary exercise patterns: 40 s run/20 s break, at a speed of 10 m min^{-1} (Leasure & Jones, 2008) during their active phase, 19.00–21.00 h. Because it has been previously reported that chronic exercise training decreases resting blood pressure in the SH rat (Burger *et al.* 1998; Graham & Rush, 2004; Gu *et al.* 2015), we decided not to train our experimental animals. Rats were thus not previously exposed to the exercise wheel, so the exercise probably includes an element of stress.

Hypoxia and hypercapnia tests

Hypoxia and hypercapnia experiments were carried out in the afternoon between 12.00 and 16.00 h. Before experiments began, each rat was given at least 1 h to acclimatise to the chamber. The responses to hypoxia (10% oxygen, balance nitrogen, BOC) and hypercapnia (7% CO_2 , 93% O_2 , BOC) were tested in a normobaric chamber on the same animals on separate days. Baseline blood pressure, heart rate and respiratory rate were recorded during the delivery of humidified atmospheric air (21% O_2/N_2) followed by 15 min of exposure to either hypoxia or hypercapnia at a rate of 8 l min^{-1} . Note, as shown herein and reported previously, hyperoxia fails to attenuate the response of the carotid bodies to hypercapnia in a variety of species including rat (Carroll & Bureau, 1988; Pepper *et al.* 1995; Rodman *et al.* 2001); hence, 7% CO_2 was mixed with 93% oxygen.

Histology

On completion of the experimental protocol, animals were terminally anaesthetised with an overdose of sodium pentobarbital (100 mg kg^{-1}) and the carotid bifurcations were removed and fixed (4% paraformaldehyde for 24 h, then stored in 30% sucrose/0.05% sodium azide). Using

a cryostat, sections 10 μm thick were cut and mounted on Superfrost Plus slides, then stained with haematoxylin and eosin. Briefly, slides were stained with Ehrlich's haematoxylin for 3 min, washed, de-stained in 1% acid alcohol for 20 s, washed and then counterstained with eosin for 10 s. Slides were then progressively dehydrated (70, 90 and 100% ethanol), immersed in xylene (3×5 min each) and covered with coverslips using a mounting medium. Images were obtained using a light microscope and ImageJ software.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using SPSS (IBM SPSS version 23) and GraphPad v 6.0, and baroreflex curve and sigmoidal regression were performed in Spike2 software (version 8, CED) using purpose-written scripts provided by CED. Responses during exercise, hypoxia and hypercapnia were analysed by two-way ANOVA with repeated measures on two factors (time and intervention, before and after surgery). *Post hoc* tests used are reported in the corresponding figure legends. The factor analysed by the *post hoc* test is 'Intervention' and the data are compared at each time point before and after surgery within either the Sham or CBR group. Exercise, hypoxia and hypercapnia responses were also analysed by the area under the curve (AUC) method, which compared the area under the curve between before and after surgery. The statistical test performed is indicated in the figure legend. Data are presented as mean $\pm$ SEM, with a significance level of $P < 0.05$.

Results

Successful removal of the carotid bodies was confirmed using histochemistry on the carotid bifurcations removed from CBR rats; data were compared with sham rats (Fig. 1). Figure 1 shows an absence of glomus cells after CBR. An absence of the carotid body was found in all 15 rats that underwent CBR surgery. Carotid bodies were always found in sham rats ($n = 14$).

Physiological validation of selective carotid body resection – anaesthetised rats

Eleven (5 Time Control; 6 CBR) anaesthetised male SH rats were used to confirm selective carotid body resection (CBR). The systolic blood pressure (SBP) response to chemoreflex activation was present, but significantly lower under anaesthesia than in the same rat when conscious (ΔSBP , Anaesthetized: 8 ± 2 mmHg vs. Conscious: 86 ± 8 mmHg; $P < 0.001$); however, a similar degree of bradycardia was observed (ΔHR , Anaesthetized: -99 ± 13 bpm vs. Conscious: -132 ± 12 bpm; $P > 0.05$).

Chemoreflex testing was performed during the baseline period after resection of the aortic depressor nerves (ADNX) and repeated after carotid body resection (CBR) or a sham procedure in the Time Control group. CBR abolished the chemoreflex response seen as a loss of the increase in SBP ($P < 0.05$; Fig. 2B) and an absence of bradycardia ($P < 0.05$; Fig. 2A). The Time Control group showed an increase in the SBP response over time ($P < 0.05$), which may reflect an increased sensitivity to repeated chemoreflex stimulation. However, the heart rate response was similar.

Baroreceptor reflex gain was preserved after combined ADNX and CBR (Fig. 2C and D; n.s.). At the end of the experiment, rats in the CBR group underwent bilateral carotid sinus nerve denervation (CNSX), after which the heart rate baroreceptor reflex was completely abolished, confirming complete sino-aortic denervation (Fig. 2E).

Baseline changes in blood pressure after selective resection of the carotid bodies in conscious SH rats

Eighteen (9 Sham; 9 CBR) male SH rats were used to study the effect of the selective CBR on cardiovascular and respiratory parameters in conscious freely moving animals. Data are presented in Fig. 3 for both dark and light phases at baseline – week 0 (W0), 1 week (W1) and 2 weeks (W2) after CBR. A significant reduction in SBP was observed in the CBR group relative to baseline during both light and dark phases ($P < 0.001$; Fig. 3). Reductions in diastolic blood pressure (DBP) ($P < 0.001$), heart rate ($P < 0.001$) and respiratory rate ($P < 0.001$) also occurred

Figure 1. Histological confirmation of carotid body resection A, sham surgery with intact carotid body; B, carotid body resection (CBR) with absence of the peripheral chemoreceptor. Eosin and haematoxylin staining of representative images. CC, common carotid artery; IC, internal carotid artery; EC, external carotid artery; CB, carotid body. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Figure 2. Assessment of chemoreflex and baroreflex sensitivity before and after progressive and selective chemo- and baro-reflex denervation in anaesthetized SH rats

A and B, chemoreflex-induced changes in (A) heart rate (HR) and (B) systolic blood pressure (SBP) by i.v. bolus infusion of sodium cyanide (0.04% NaCN) were abolished after carotid body resection (CBR) ($P < 0.05$). C, the cardiac baroreceptor reflex was preserved after CBR in the absence of aortic depressor nerves (ADNX); D and E, representative images illustrating the individual response to phenylephrine (PH) and sodium nitroprusside (SNP) in the time control and CBR group. CSNX resulted in abolishment of the baroreceptor reflex in the CBR group. Data were analysed by two-way ANOVA with Sidak *post hoc* test. Sham $n = 5$, CBR = 6, $*P < 0.05$. Data are presented as mean $\pm$ SEM.

Figure 3. Blood pressure and heart rate change after selective carotid body resection in conscious rats

Cardiovascular responses to CBR in conscious SH rats. Temporal responses in systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), respiratory rate (RR) and heart rate (HR) are presented during light and dark phase. Data represent maximal response to the CBR or sham surgery recorded within the first (W1) and second (W2) week after treatment. W0, baseline. Data were analysed by two-way ANOVA with Tukey *post hoc* test; $n = 9$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Data are presented as mean $\pm$ SEM.

in both light and dark phases (Fig. 3). Sham operated rats showed increases, when compared to baseline, in SBP ($P < 0.05$) and DBP ($P < 0.05$) recorded in the light phase (only) and an increase in respiratory rate (RR) in both phases ($P < 0.05$, Fig. 3).

Chemoreflex and baroreflex responses before and after selective carotid body resection in conscious rats

The arterial chemoreflex-mediated pressor/bradycardia response, tested 2 weeks after surgery, was abolished after selective CBR (Δ SBP: before 79 ± 10 mmHg vs. after 9 ± 17 mmHg; Δ HR: before -130 ± 17 bpm vs. after -4 ± 4 bpm, $P < 0.001$; whereas the responses in the Sham operated animals remained (Δ SBP: before 92 ± 13 mmHg vs. after 84 ± 12 mmHg, Δ HR: before -134 ± 20 bpm vs. after -130 ± 17 bpm, n.s.; Fig. 4A).

Spontaneous baroreflex gain (sBRG) did not change after CBR (0.9 ± 0.09 ms mmHg $^{-1}$ vs. 1.2 ± 0.29 ms mmHg $^{-1}$; n.s.) or in sham rats (1.1 ± 0.17 ms mmHg $^{-1}$ vs. 1.1 ± 0.1 ms mmHg $^{-1}$; n.s.; Fig. 4B). Sigmoidal baroreflex function curves showed no

significant difference after CBR but a leftwards resetting of the operating points to the lower level of arterial pressure (Fig. 4B, right).

Spectral analysis of pulse interval and SBP after CBR in conscious rats

Spectral analysis of the pulse interval (Fig. 5) showed that CBR was associated with a reduction in LF power (30.4 ± 1 nu vs. 23.2 ± 2 nu; $P < 0.05$) and an increase in HF power (69.6 ± 1 nu vs. 76.8 ± 2 nu; $P < 0.05$) resulting in a marked reduction in the LF/HF ratio (0.48 ± 0.03 vs. 0.33 ± 0.03 ; $P < 0.05$). Sham did not elicit significant changes in LF power (25.5 ± 2 nu vs. 30.2 ± 4 nu; n.s.), HF power (from 74.5 ± 2 nu to 70.3 ± 3 nu; n.s.) and LF/HF ratio (0.38 ± 0.04 nu vs. 0.5 ± 0.08 nu; n.s.). These results suggest that CBR leads to an improvement in cardiac sympatho-vagal balance. Regarding SBP spectral analysis, we observed a significant reduction in the LF component of SBP in the CBR group (5.3 ± 0.9 mmHg ^{2} vs. 1.9 ± 0.6 mmHg ^{2} ; $P < 0.05$) but not in the Sham group (2.3 ± 0.5 mmHg ^{2} vs. 3.2 ± 1.3 mmHg ^{2} ; n.s.), suggesting

Figure 4. Chemo- and baro-reflex function after selective carotid body resection (CBR) in the conscious SH rat

A, chemoreflex testing in the Sham and CBR groups. Surgical, selective, bilateral resection of the carotid bodies (CBR) abolished the chemoreflex response to 0.04% NaCN (SBP, systolic blood pressure; HR, heart rate; $n = 7$; $P < 0.001$). B, Sham (left) and CBR (right) group baroreflex test. The cardiac baroreflex function curve was shifted leftwards over lower pressure ranges after CBR in SH rats (right, $P < 0.05$). Data were analysed by two-way ANOVA with Sidak post hoc test (A) and paired t test ($n = 6$, B); * $P < 0.05$. Data are presented as mean $\pm$ SEM.

a reduction in sympathetic vasomotor tone after CBR.

Exercise before and after selective resection of the carotid bodies

Sham and CBR rats did not show any differences in the ability to exercise; all groups showed an increase in blood pressure, heart rate and respiration ($P < 0.001$, Fig. 6A and B). Our exercise challenge produced similar increases in blood pressure, heart rate and respiratory rates in sham and CBR rats (n.s.; Fig. 6A and B). AUC analyses similarly showed that heart rate and respiration responses

to exercise were not different between sham and CBR rats (n.s.; Fig. 6A and B) but the pressor response in the Sham group increased after surgery (SBP, $P < 0.05$, Fig. 6A).

Hypoxic challenge before and after selective resection of the carotid bodies

Two-way ANOVA show that exposure to hypoxia (10% oxygen) produced a pressor response in sham animals, and in the CBR group before resection of carotid bodies, accompanied by an increase in heart rate and respiration (Fig. 7A and B, $P < 0.001$). In contrast, CBR abolished the pressor response (SBP; $P < 0.05$) whereas responses in heart rate and respiratory rate were similar to before CBR animals (HR, RR; n.s.).

Following the sham surgery, animals showed an increase in the pressor response to hypoxia (SBP; $P < 0.05$) but responses in heart rate and respiratory rate were similar to before Sham (n.s.).

Statistical analyses of the AUCs confirmed these results. Interestingly, AUC analyses also showed that the respiratory rate decreased after CBR ($P < 0.001$).

Hypercapnia challenge before and after selective resection of the carotid bodies

Exposure to 7% CO₂/93% O₂ resulted in an increase in SBP, heart rate and respiratory rate in all groups ($P < 0.001$, Fig. 8A and B). The SBP response to hypercapnia was augmented after CBR ($P < 0.01$, Fig. 8B). The responses in the Sham group did not differ before and after surgery (n.s., Fig. 8A). Analyses performed on AUC confirmed these responses. Additionally, it identified that respiratory rate increased after CBR ($P < 0.01$).

Discussion

We demonstrate for the first time that the carotid bodies can be surgically resected while preserving carotid sinus baroreflex function in the SH rat for at least 2 weeks. We have carefully validated our surgical approach to confirm both that: (i) the carotid bodies were removed, (ii) carotid sinus baroreceptor function was preserved and not dissimilar to sham animals, and (iii) carotid chemoreceptor reflex function was abolished. Chronic blood pressure recordings indicated that selective CBR produced a sustained and significant reduction in arterial pressure in the SH rat across both light and dark phases; the magnitude of this reduction was consistent with our previously reported findings where the carotid sinus nerves were denervated bilaterally (Franchini & Krieger, 1992; Abdala *et al.* 2012; McBryde *et al.* 2013), and involved reductions in sympathetic drive to both the heart and the vasculature, as measured indirectly with spectral analysis.

Figure 5. Effect of carotid body resection (CBR) on cardiac sympatho-vagal balance in conscious SH rats

Sympatho-vagal balance was unaffected in the Sham group (n.s.). CBR decreased LF (nu), increased HF (nu) and decreased the LF/HF ratio. CBR also reduced the LF spectra of SBP, suggesting sympatho-inhibition. SBP, $P < 0.05$. Data were analysed by two-way ANOVA with Sidak *post hoc* test ($n = 6$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Data are presented as the mean $\pm$ SEM.

In these hypertensive rats, we also revealed an essential role of the carotid chemoreflex in mediating the pressor response to hypoxia. Notably, the pronounced pressor response to hypoxia was absent after CBR. In contrast, we found that the cardiovascular response to exercise was unchanged after CBR, suggesting either that the carotid bodies do not play a critical role in mediating this response, or that compensation by alternative pathways

occurred. Finally, the pressor response to hypercapnia was augmented after CBR.

Our ability to selectively remove the carotid bodies is an important advance, as previous techniques by ourselves and others (Abdala *et al.* 2012; Del Rio *et al.* 2013; McBryde *et al.* 2013; Marcus *et al.* 2014; Iturriaga *et al.*, 2015a; Pijacka *et al.* 2016) have relied on stripping the carotid sinus of all nerves, thus removing baro-receptive as well

Figure 6. Exercise challenges before and after selective carotid body resection (CBR) or sham surgery

Exercise produced similar increases in systolic blood pressure (SBP), heart rate (HR) and respiratory rates (RR) in Sham (A) and CBR (B) rats over time ($P < 0.001$). Neither Sham nor CBR influenced the rat's ability to exercise (n.s.). Data were analysed by two-way ANOVA with Sidak *post hoc* test comparing before vs. after surgery at each time point ($n = 7$). Additionally, the AUC (top right corner of each graph) showed that the pressor response in the Sham group increased after surgery ($*P < 0.05$). Data are presented as mean $\pm$ SEM.

as chemo-receptive afferents. Impressively, despite the bilateral denervation of the carotid sinus baroreceptors found in our previously published studies, a functional baroreflex was observed to be maintained in these animals, presumably via compensation from the aortic depressor baroreceptor pathway (Abdala *et al.* 2012; McBryde *et al.*

2013). Our current results extend this previous work, showing for the first time that following specific CBR when a fully functional baroreflex is maintained (i.e. carotid sinus and aortic), with a leftward shift resetting around the lower level of arterial pressure, a substantial anti-hypertensive response persists.

Figure 7. Hypoxia challenge before and after selective carotid body resection (CBR) or sham surgery

Exposure to 10% oxygen increased systolic blood pressure (SBP), heart rate (HR) and respiratory rate (RR) in (A) Sham group and (B) CBR group before surgery ($P < 0.001$). However, CBR abolished ($P < 0.05$) and Sham surgery further exacerbated ($P < 0.05$) the pressor response. CBR did not alter the response to hypoxia either in HR or in RR (n.s.). Data were analysed by two-way ANOVA with Sidak *post hoc* test comparing before vs. after surgery at each time point ($*P < 0.05$; $n = 7$). Moreover, the AUC (top right corner of each graph) confirmed the SBP responses and identified that the RR decreased after CBR (** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$). Data are presented as mean $\pm$ SEM.

Given the evidence of raised carotid body activity during exercise (Jacobi *et al.* 1989; Ward, 1994) and improved exercise tolerance after CBR in humans (Niewinski *et al.* 2017), we were surprised to find no difference in the cardiovascular response after CBR. Although the cardio-

vascular responses were not reported, Lugliani *et al.* (1971) showed that the respiratory responses to moderate steady-state exercise were not affected by CBR, consistent with our finding that the cardiovascular responses to exercise are not reliant on input from the carotid bodies,

Figure 8. Hypercapnia challenge before and after selective carotid body resection (CBR) or sham surgery

Exposure to 7% CO₂/93% O₂ produced a pressor response in all animals, accompanied by an increase in heart rate and respiration ($P < 0.001$). After CBR the pressor response was augmented relative to the before CBR group ($P < 0.01$). CBR did not alter the response in heart rate (HR) to hypercapnia and the respiratory rates (RR; n.s.). Data were analysed by two-way ANOVA with Sidak *post hoc* test comparing before vs. after surgery at each time point ($*P < 0.05$; $n = 7$). Moreover, the analysis on AUC (top right corner of each graph) confirmed the CBR effect on SBP. Additionally, it showed that RR increased after CBR ($**P < 0.01$ and $***P < 0.001$). Data are presented as mean $\pm$ SEM.

at least in the SH rat. However, we acknowledge that the exercise protocol we used was not without environmental stress as the animals were forced to run in an enclosed motorised running wheel. Furthermore, we chose not to condition the animals to the running wheel, as carotid body sensitivity is reduced with exercise training (Burger *et al.* 1998; Graham & Rush, 2004; Gu *et al.* 2015). Thus, the absence of an effect of CBR on the blood pressure and heart rate responses during exercise in our study may include a stress component. Therefore, the effect of CBR on blood pressure control during exercise in SH rats remains equivocal.

Our observation that CBR blunts the ventilatory response and reverses the pressor response to hypoxia is consistent with recent studies in human patients with heart failure, who underwent bilateral CBR (Niewinski *et al.* 2014). In keeping with our current results, Niewinski *et al.* (2014) showed that CBR reduced the respiratory and arterial pressure responses to hypoxia, whilst the heart rate response was unchanged. Similarly, early human studies in which bilateral CBR was performed to treat bronchial asthma found that the respiratory response to hypoxia was absent (Lugliani *et al.* 1971). Our data in SH rats and in humans may have important implications when evaluating the carotid body as a potential therapeutic target in cardiovascular disease, as subjects lacking carotid bodies may be less able to cope with situations where oxygen availability is decreased. This is borne out by the recent observation of worsening blood oxygen saturations at night in heart failure patients after bilateral CBR (Niewinski *et al.* 2017). This supports our contention that carotid body therapy should modulate, not abolish, its function (Pijacka *et al.* 2016).

We performed bilateral CBR because unilateral carotid sinus denervation was ineffective in lowering blood pressure in SH rats (McBryde *et al.* 2013). In contrast, unilateral carotid body denervation in drug-resistant hypertensive patients was effective in ~60% of patients tested, suggesting a possible species difference. In our study (Narkiewicz *et al.* 2016) and that of others (Limberg *et al.* 2015), unilateral carotid body ablation lowered arterial pressure in some patients, which was well maintained at 3 and 6 months of follow-up with some showing a relapse by 12 months; the relapse may reflect compensation from the contralateral carotid body. Nevertheless, preservation of the contralateral carotid body may be necessary to preserve protection against hypoxia in these patients, especially during sleep. This view is supported by a recent case report examining various sympatho-excitatory reflex tests in a patient with (prior) unilateral carotid body resection for paraganglioma (Larson *et al.* 2017). They reported that hypoxic ventilatory responses were normal, but that the sympatho-excitatory responses to static exercise appeared to be blunted.

Exposing rats without carotid bodies to hyperoxic hypercapnia produced an exaggerated pressor response compared to sham controls. We propose that this is due to a greater plasma level of CO₂ that results from a reduced ventilatory response; this is borne out by the reduced breathing frequency response to hypercapnia after CBR. We presume the plasma contains an elevated level of CO₂ that provides a greater stimulus to the central chemoreceptors. We recognise that this will need to be confirmed using blood sampling, which was not tenable in the present study. We acknowledge that the use of hyperoxia might have: (i) suppressed basal discharge of the carotid bodies in the sham control group and (ii) caused a confounding vasoconstrictive effect. However, this would be expected to be the same in the sham and CBR groups, making their comparison relative. Also, hyperoxia does not attenuate the response of the carotid bodies to hypercapnia in the rat (Carroll & Bureau, 1988; Pepper *et al.* 1995; Rodman *et al.* 2001) so this is not problematic. All told, the exaggerated rise in blood pressure to hypercapnia after CBR is potentially worrisome and could pose problems clinically in terms of inducing stroke.

References

- 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**, 4269–4277.
- Andrade DC, Lucero C, Toledo C, Madrid C, Marcus NJ, Schultz HD & Del Rio R (2015). Relevance of the carotid body chemoreflex in the progression of heart failure. *BioMed Res Int* **2015**, 467597.
- Burger HR, Chandler MP, Rodenbaugh DW & DiCarlo SE (1998). Dynamic exercise shifts the operating point and reduces the gain of the arterial baroreflex in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **275**, R2043–2048.
- Burr RL (2007). Interpretation of normalized spectral heart rate variability indices in sleep research: a critical review. *Sleep* **30**, 913–919.
- Carroll JL & Bureau MA (1988). Peripheral chemoreceptor CO₂ response during hyperoxia in the 14-day-old awake lamb. *Respir Physiol* **73**, 339–349.
- Chu AL, Jay O & White MD (2007). The effects of hyperthermia and hypoxia on ventilation during low-intensity steady-state exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R195–203.
- Del Rio R, Marcus NJ & Schultz HD (2013). Carotid chemoreceptor ablation improves survival in heart failure: rescuing autonomic control of cardiorespiratory function. *J Am Coll Cardiol* **62**, 2422–2430.
- Delaney EP, Greaney JL, Edwards DG, Rose WC, Fadel PJ & Farquhar WB (2010). Exaggerated sympathetic and pressor responses to handgrip exercise in older hypertensive humans: role of the muscle metaboreflex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**, H1318–1327.

- Fiamma MN, O'Connor ET, Roy A, Zuna I & Wilson RJ (2013). The essential role of peripheral respiratory chemoreceptor inputs in maintaining breathing revealed when CO₂ stimulation of central chemoreceptors is diminished. *J Physiol* **591**, 1507–1521.
- Franchini KG & Krieger EM (1992). Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic-denervated rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **262**, R677–683.
- Geleijnse JM (2008). Habitual coffee consumption and blood pressure: an epidemiological perspective. *Vasc Health Risk Manag* **4**, 963–970.
- Graham DA & Rush JW (2004). Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* (1985) **96**, 2088–2096.
- Grundy D (2015). Principles and standards for reporting animal experiments in *The Journal of Physiology* and *Experimental Physiology*. *J Physiol* **593**, 2547–2549.
- Gu Q, Zhao L, Ma YP & Liu JD (2015). Contribution of mitochondrial function to exercise-induced attenuation of renal dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* **406**, 217–225.
- Itskovitz J, LaGamma EF, Bristow J & Rudolph AM (1991). Cardiovascular responses to hypoxemia in sinoaortic-denervated fetal sheep. *Pediatr Res* **30**, 381–385.
- Iturriaga R, Andrade DC & Del Rio R (2015a). Crucial role of the carotid body chemoreceptors on the development of high arterial blood pressure during chronic intermittent hypoxia. *Adv Exp Med Biol* **860**, 255–260.
- Iturriaga R, Moya EA & Del Rio R (2015b). Inflammation and oxidative stress during intermittent hypoxia: the impact on chemoreception. *Exp Physiol* **100**, 149–155.
- Jacobi MS, Patil CP & Saunders KB (1989). The transient ventilatory response to carbon dioxide at rest and in exercise in man. *Respir Physiol* **77**, 225–237.
- Kanbar R, Stornetta RL, Cash DR, Lewis SJ & Guyenet PG (2010). Photostimulation of Phox2b medullary neurons activates cardiorespiratory function in conscious rats. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 1184–1194.
- Kulandavelu S, Balkan W & Hare JM (2015). Regulation of oxygen delivery to the body via hypoxic vasodilation. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 6254–6255.
- Larson KF, Limberg JK, Baker SE, Joyner MJ & Curry TB (2017). Intact blood pressure, but not sympathetic, responsiveness to sympathoexcitatory stimuli in a patient with unilateral carotid body resection. *Physiol Rep* **5**, ii.
- Leasure JL & Jones M (2008). Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience* **156**, 456–465.
- Lim PO, MacFadyen RJ, Clarkson PB & MacDonald TM (1996). Impaired exercise tolerance in hypertensive patients. *Ann Intern Med* **124**, 41–55.
- Limberg JK, Taylor JL, Dube S, Basu R, Basu A, Joyner MJ & Wehrwein EA (2014). Role of the carotid body chemoreceptors in baroreflex control of blood pressure during hypoglycaemia in humans. *Exp Physiol* **99**, 640–650.
- Limberg JK, Taylor JL, Mozer MT, Dube S, Basu A, Basu R, Rizza RA, Curry TB, Joyner MJ & Wehrwein EA (2015). Effect of bilateral carotid body resection on cardiac baroreflex control of blood pressure during hypoglycemia. *Hypertension* **65**, 1365–1371.
- Lincevicius GS, Shimoura CG, Nishi EE, Perry JC, Casarini DE, Gomes GN, Bergamaschi CT & Campos RR (2015). Aldosterone contributes to sympathoexcitation in renovascular hypertension. *Am J Hypertens* **28**, 1083–1090.
- Linton RA & Band DM (1985). The effect of potassium on carotid chemoreceptor activity and ventilation in the cat. *Respir Physiol* **59**, 65–70.
- Lugliani R, Whipp BJ, Seard C & Wasserman K (1971). Effect of bilateral carotid-body resection on ventilatory control at rest and during exercise in man. *N Engl J Med* **285**, 1105–1111.
- Marcus NJ, Del Rio R, Schultz EP, Xia XH & Schultz HD (2014). Carotid body denervation improves autonomic and cardiac function and attenuates disordered breathing in congestive heart failure. *J Physiol* **592**, 391–408.
- Marshall JM & Metcalfe JD (1988). Analysis of the cardiovascular changes induced in the rat by graded levels of systemic hypoxia. *J Physiol* **407**, 385–403.
- McBryde FD, Abdala AP, Hendy EB, Pijacka W, Marvar P, Moraes DJ, Sobotka PA & Paton JF (2013). The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nat Commun* **4**, 2395.
- Mitchell JH, Kaufman MP & Iwamoto GA (1983). The exercise pressor reflex: its cardiovascular effects, afferent mechanisms, and central pathways. *Annu Rev Physiol* **45**, 229–242.
- Moraes DJ, Machado BH & Paton JF (2015). Carotid body overactivity induces respiratory neurone channelopathy contributing to neurogenic hypertension. *J Physiol* **593**, 3055–3063.
- Narkiewicz K, Ratcliffe LE, Hart EC, Briant LJ, Chrostowska M, Wolf J, Szyndler A, Hering D, Abdala AP, Manghat N, Burchell AE, Durant C, Lobo MD, Sobotka PA, Patel NK, Leiter JC, Engelman ZJ, Nightingale AK & Paton JF (2016). Unilateral carotid body resection in resistant hypertension: a safety and feasibility trial. *JACC Basic Transl Sci* **1**, 313–324.
- Niewinski P, Janczak D, Rucinski A, Jazwiec P, Sobotka PA, Engelman ZJ, Fudim M, Tubek S, Jankowska EA, Banasiak W, Hart EC, Paton JF & Ponikowski P (2013). Carotid body removal for treatment of chronic systolic heart failure. *Int J Cardiol* **168**, 2506–2509.
- Niewinski P, Janczak D, Rucinski A, Tubek S, Engelman ZJ, Jazwiec P, Banasiak W, Sobotka PA, Hart EC, Paton JF & Ponikowski P (2014). Dissociation between blood pressure and heart rate response to hypoxia after bilateral carotid body removal in men with systolic heart failure. *Exp Physiol* **99**, 552–561.
- Niewinski P, Janczak D, Rucinski A, Tubek S, Engelman ZJ, Piesiak P, Jazwiec P, Banasiak W, Fudim M, Sobotka PA, Javaheri S, Hart EC, Paton JF & Ponikowski P (2017). Carotid body resection for sympathetic modulation in systolic heart failure: results from first-in-man study. *Eur J Heart Fail* **19**, 391–400.

- Oikawa S, Hirakawa H, Kusakabe T, Nakashima Y & Hayashida Y (2005). Autonomic cardiovascular responses to hypercapnia in conscious rats: the roles of the chemo- and baroreceptors. *Auton Neurosci* **117**, 105–114.
- Paterson DJ (1996). Role of potassium in the regulation of systemic physiological function during exercise. *Acta Physiol Scand* **156**, 287–294.
- Paton JF, Ratcliffe L, Hering D, Wolf J, Sobotka PA & Narkiewicz K (2013). Revelations about carotid body function through its pathological role in resistant hypertension. *Curr Hypertens Rep* **15**, 273–280.
- Pepper DR, Landauer RC & Kumar P (1995). Postnatal development of CO₂-O₂ interaction in the rat carotid body *in vitro*. *J Physiol* **485**, 531–541.
- Pepper DR, Landauer RC & Kumar P (1996). Extracellular potassium and chemosensitivity in the rat carotid body, *in vitro*. *J Physiol* **493**, 833–843.
- Pickering AE, Simms AE & Paton JF (2008). Dominant role of aortic baroreceptors in the cardiac baroreflex of the rat *in situ*. *Auton Neurosci* **142**, 32–39.
- Pijacka W, Moraes DJ, Ratcliffe LE, Nightingale AK, Hart EC, da Silva MP, Machado BH, McBryde FD, Abdala AP, Ford AP & Paton JF (2016). Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nat Med* **22**, 1151–1159.
- Ratcliffe LE, Pijacka W, McBryde FD, Abdala AP, Moraes DJ, Sobotka PA, Hart EC, Narkiewicz K, Nightingale AK & Paton JF (2014). CrossTalk opposing view: Which technique for controlling resistant hypertension? Carotid chemoreceptor denervation/modulation. *J Physiol* **592**, 3941–3944.
- Rodman JR, Curran AK, Henderson KS, Dempsey JA & Smith CA (2001). Carotid body denervation in dogs: eupnea and the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia. *J Appl Physiol* (1985) **91**, 328–335.
- Sabino JP, Oliveira M, Giusti H, Glass ML, Salgado HC & Fazan R Jr (2013). Hemodynamic and ventilatory response to different levels of hypoxia and hypercapnia in carotid body-denervated rats. *Clinics (Sao Paulo)* **68**, 395–399.
- Sacramento JF, Gonzalez C, Gonzalez-Martin MC, Conde SV (2015). Adenosine receptor blockade by caffeine inhibits carotid sinus nerve chemosensory activity in chronic intermittent hypoxic animals. *Adv Exp Med Biol* **860**, 133–137.
- Sacramento JF, Ribeiro MJ, Rodrigues T, Olea E, Melo BF, Guarino MP, Fonseca-Pinto R, Ferreira CR, Coelho J, Obeso A, Seica R, Matafome P & Conde SV (2017). Functional abolition of carotid body activity restores insulin action and glucose homeostasis in rats: key roles for visceral adipose tissue and the liver. *Diabetologia* **60**, 158–168.
- Schultz HD & Marcus NJ (2012). Heart failure and carotid body chemoreception. *Adv Exp Med Biol* **758**, 387–395.
- Sinski M, Lewandowski J, Przybylski J, Bidiuk J, Abramczyk P, Ciarka A & Gaciong Z (2012). Tonic activity of carotid body chemoreceptors contributes to the increased sympathetic drive in essential hypertension. *Hypertens Res* **35**, 487–491.
- Smith SA, Williams MA, Leal AK, Mitchell JH & Garry MG (2006). Exercise pressor reflex function is altered in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol* **577**, 1009–1020.
- Stein P, White SE, Homan J, Hanson MA & Bocking AD (1999). Altered fetal cardiovascular responses to prolonged hypoxia after sinoaortic denervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **276**, R340–346.
- Takakura AC & Moreira TS (2011). Contribution of excitatory amino acid receptors of the retrotrapezoid nucleus to the sympathetic chemoreflex in rats. *Exp Physiol* **96**, 989–999.
- Vidruk EH, Olson EB Jr, Ling L & Mitchell GS (2001). Responses of single-unit carotid body chemoreceptors in adult rats. *J Physiol* **531**, 165–170.
- Waki H, Katahira K, Polson JW, Kasparov S, Murphy D & Paton JF (2006). Automation of analysis of cardiovascular autonomic function from chronic measurements of arterial pressure in conscious rats. *Exp Physiol* **91**, 201–213.
- Ward SA (1994). Peripheral and central chemoreceptor control of ventilation during exercise in humans. *Can J Appl Physiol* **19**, 305–333.

Additional information

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

JFRP was responsible for acquisition of funding, administrative support, study conception, design of the experiments and drafting the manuscript. WP designed the experiments, and collected, analysed and interpreted the data. FDM analysed and interpreted the BRG data. Both WP and FDM wrote the manuscript. PLK performed and interpreted the spectral analysis. GSL and PLK performed immunohistochemistry. HCS and RRC contributed to the editing of the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work.

Funding

The study was funded by a programme grant awarded to JFRP from the British Heart Foundation (RG/12/6/29670).

Acknowledgements

We acknowledge Dr Jean-Charles Isner (University of Bristol) for designing and building the motorised wheel for the forced exercise test. The European Union, Seventh Framework Programme, Marie Curie Actions (CARPEDIEM—No 612280) also supported this study.

Translational Perspective

The present study raises potentially clinically relevant problems with bilateral carotid body resection. Although there are positive effects on blood pressure control in conditions of hypertension, the SH rat was not able to control blood pressure after CBR when exposed to hypoxia and exhibited excessive rises in blood pressure to hypercapnia. These could trigger end organ damage and may be particularly pertinent to human patients with sleep apnoea. Through extension, it might be expected that in other situations where the carotid bodies would normally be engaged, the homeostatic control of blood pressure and ventilation may become jeopardised. Given that the carotid body has multiple other functions, such as blood glucose control (Limberg *et al.* 2014; Sacramento *et al.* 2017), multiple levels of organ and systems failure could occur under different states of health and disease without carotid bodies. We surmise that blunt resection is not optimal and efforts are now needed to find pharmacological approaches that can normalise carotid body function by abolishing hyperreflexia and tonic activity without destroying physiological function; the purinergic P2X3 receptors are one such example that we have proposed (Pijacka *et al.* 2016) but others have also been suggested, including anti-oxidant therapy (Iturriaga *et al.* 2015a,b) and caffeine, which is known to block adenosine receptors and decrease carotid body sensitisation following chronic intermittent hypoxia (Sacramento *et al.* 2015). The relevance of the latter is that habitual coffee drinking was found to lower blood pressure, especially in women (Geleijnse, 2008).