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

**Avaliação de parâmetros cardiovasculares e
respiratórios durante o ciclo sono-vigília de
ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente**

Darlan da Silva Bazilio

Ribeirão Preto

2018

DARLAN DA SILVA BAZILIO

**Avaliação de parâmetros cardiovasculares e
respiratórios durante o ciclo sono-vigília de
ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente**

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

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito H. Machado

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bazilio, Darlan da Silva

Avaliação de parâmetros cardiovasculares e respiratórios durante o ciclo sono-vigília de ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente. Ribeirão Preto, 2018.

74 f. 30cm

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração: Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Machado, Benedito H.

1. hipóxia crônica intermitente, 2. ciclo sono-vigília, 3. alterações cardiovasculares e respiratórias, 4. inspirações profundas.

FICHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Darlan da Silva Bazilio

Título: Avaliação de parâmetros cardiovasculares e respiratórios durante o ciclo sono-vigília de ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa

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

Assinatura: _____

Prof. Dr. Hélio Cesar Salgado

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

Assinatura: _____

Prof. Dr. Sergio Luiz Domingues Cravo

Departamento de Fisiologia, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Benedito H. Machado (orientador)

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

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Sou muito grato a todos que passaram pela minha vida e contribuíram de alguma forma para o meu amadurecimento enquanto pessoa e como profissional. Em especial, gostaria nesse momento de agradecer aqueles que contribuíram de alguma maneira para a construção deste trabalho:

- ao Prof. Benedito H. Machado pela oportunidade que me concedeu para desenvolvimento deste trabalho, pela prestatividade e por todos os ensinamentos;
- a Leni Heck Bonagamba (em memória), com quem aprendi os fundamentos para executar as técnicas utilizadas nesse trabalho e para com quem tenho imensa admiração;
- ao Prof. Davi Moraes, que fez parte desta pesquisa e esteve sempre presente contribuindo com seus ensinamentos;
- aos meus colegas de laboratório Ludmila, George, Mateus, Melina, e Daniela, com quem também aprendi muita coisa nesses dois anos e com quem compartilhei muitos momentos;
- a FMRP da USP e aos funcionários do Departamento de Fisiologia pelo apoio e suporte à pós-graduação;
- a todos os Professores com quem tive aulas e que participaram de minha trajetória no curso de mestrado em Fisiologia;
- aos membros da banca pela atenção, pela disponibilidade em fazer parte da avaliação deste trabalho e por todas as sugestões, correções e recomendações;
- aos meus colegas também alunos do Programa de Pós-graduação, que compartilharam comigo meses intensos de estudos e com quem também aprendi muita Fisiologia;
- ao meu amigo Heitor Bernardes Delfino, com quem convivi durante esses dois anos e que acompanhou de perto a minha formação, sempre prestativo e companheiro;
- a minha namorada Kelly, pela paciência e compreensão, por ser meu braço direito, por me dar força e suporte;
- a minha mãe Janeci, meu pai Gerson e meu irmão Fabricio, pelo amor, carinho, acolhimento, exemplo, força e tudo mais que fizeram por mim.

RESUMO

BAZILIO, D. S. **Avaliação de parâmetros cardiovasculares e respiratórios durante o ciclo sono-vigília de ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente.** 74 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2017.

A hipóxia crônica intermitente (HCI) é um modelo experimental no qual o quimiorreflexo é ativado a cada episódio de hipóxia, assim como em alguns casos de apneia obstrutiva do sono. A HCI promove aumento da atividade simpática, hipertensão e alterações no acoplamento simpático-respiratório no tronco encefálico. No presente trabalho estudamos os parâmetros cardiorrespiratórios concomitantemente com o ciclo sono-vigília em uma janela temporal de 3 horas no período do dia em que esses registros são feitos no nosso laboratório. Foram também registradas ao longo deste período as respostas cardiovasculares associadas a inspirações profundas (IPs) que acontecem normalmente nos ratos. Ratos Wistar (~ 250 g) foram divididos nos grupos HCI (n = 12) e controle (CTL) (n = 12). Os animais foram submetidos à cirurgia de implantação de eletrodos no crânio e nos músculos cervicais para obtenção de registros eletrocorticográficos (ECoG) e eletromiográficos (EMG), respectivamente, para determinarmos as fases do ciclo sono-vigília (vigília, sono NREM (non-rapid eye movement) e sono REM (rapid eye movement)). Um grupo de animais CTL (n=5) e outro de animais HCI (n=6) tiveram também eletrodos implantados nos músculos diafragma (DIA) e abdominal oblíquo (ABD) para registros da atividade muscular respiratória. Após 48 horas, o grupo HCI foi exposto a um protocolo de hipóxia intermitente durante 10 dias (6% de O₂ por 40 s, a cada 9 min, 8 h/d), enquanto o grupo CTL foi mantido em normoxia (20,8% de O₂) pelo mesmo período. No último dia do protocolo, os ratos tiveram uma artéria femoral canulada para registros de pressão arterial (PA). No dia seguinte, ECoG, EMG e a PA foram registrados por 3 horas para análise da latência para o sono, o tempo total em cada uma das fases do ciclo sono-vigília, o número e a duração dos episódios de sono REM e os parâmetros cardiovasculares pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) nas diferentes fases do ciclo. Os parâmetros respiratórios foram registrados por 2 horas para análise de frequência respiratória (fR), volume corrente (V_T) e volume minuto (V_E) nas diferentes fases do ciclo sono-vigília. Os animais dos grupos utilizados para avaliação da atividade respiratória muscular foram registrados por 2 horas. O protocolo de 10 dias de HCI

promoveu alterações significativas apenas na duração dos episódios de sono REM nos ratos HCI. Entretanto, os animais do grupo HCI apresentaram níveis médios mais elevados de PAS ($145,0 \pm 1,8$ vs $129,3 \pm 2,2$ mmHg), PAD ($104,1 \pm 1,7$ vs $91,4 \pm 1,8$ mmHg), PAM (121 ± 9 vs $107,7 \pm 1,9$ mmHg) e FC ($387, \pm 5,4$ vs $363,5 \pm 8,7$ bpm) no período de 3 horas de registro, sendo estes aumentos igualmente observados em todas as fases do ciclo sono-vigília. A HCI também promoveu aumento significativo de V_T durante os sonos NREM ($6,6 \pm 0,2$ vs $5,8 \pm 0,2$ mL/kg) e REM ($6,4 \pm 0,2$ vs $5,3 \pm 0,2$ mL/kg), porém este parâmetro não foi significativamente diferente durante a vigília nos animais HCI em relação aos animais CTL. Ambos os grupos apresentaram expirações ativas apenas durante a vigília, porém estas foram muito mais frequentes nos animais HCI. Além disso, nos animais HCI as respostas de queda da PAM ($-18 \pm 0,8$ vs $-14 \pm 0,6$ mmHg) e aumento da FC ($28,4 \pm 1,8$ vs $21,8 \pm 1,1$ bpm) associadas às IPs apresentaram maiores magnitudes em relação aos animais CTL, embora o intervalo temporal entre as IPs não tenha se alterado. Esses achados indicam que a HCI aplicada durante 10 dias promove alterações significativas na duração dos episódios de sono REM, aumento da PA e FC em todas as fases do ciclo sono-vigília, aumento do V_T durante o sono, aumento da ocorrência de expirações ativas durante a vigília e aumento das respostas hemodinâmicas associadas às IPs. Portanto, as alterações cardiovasculares observadas após a HCI são decorrentes dos episódios repetidos de hipóxia que acontecem ao longo desse protocolo, mas não parecem ser dependentes de alterações no ciclo sono-vigília, pois ainda que a duração dos episódios de sono REM tenha sido maior nos ratos HCI, os parâmetros cardiovasculares se apresentaram igualmente elevados em todas as fases do ciclo sono-vigília desses animais.

Palavras-chave: hipóxia crônica intermitente, ciclo sono-vigília, alterações cardiovasculares e respiratórias, inspirações profundas.

ABSTRACT

BAZILIO, D. S. **Evaluation of cardiovascular and respiratory parameters during the sleep-wake cycle of rats submitted to chronic intermittent hypoxia.** 74 p. Dissertation (Masters) – School of Medicine of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2017.

Chronic intermittent hypoxia (CIH) is an experimental model in which the chemoreflex is activated at each episode of hypoxia, as observed in some cases of obstructive sleep apnea. CIH induces increased sympathetic activity, hypertension, and changes in the sympathetic-respiratory coupling in the brainstem. In the present study, we recorded cardiorespiratory parameters concomitantly with the sleep-wake cycle during a 3-hour time window which corresponds to the period of the day in which these recordings are collected in our laboratory. During this period, we also studied the cardiovascular responses associated with the normally occurring deep breaths (DBs) in rats. Male Wistar rats (~ 250 g) were divided into CIH (n = 12) and control (CTL) groups (n = 12). Animals underwent implantation of electrodes in the skull and in the cervical muscles for electrocorticographic (ECoG) and electromyographic (EMG) recordings, respectively, to determine the phases of the sleep-wake cycle (wakefulness, NREM sleep and REM sleep). A group of CTL animals (n=5) and another of CIH animals (n=6) had electrodes implanted also in the diaphragm (DIA) and oblique abdominal muscle (ABD) for recordings of respiratory muscle activity. After 48 hours, the CIH group was exposed to an intermittent hypoxia protocol for 10 days (6% O₂ for 40 s, every 9 min, 8 h/d), while the CTL group was maintained in normoxia (20.8 % of O₂) for the same period. On the last day of the protocol, rats had a femoral artery cannulated for blood pressure (BP) recordings. On the following day, ECoG, EMG and BP were recorded for 3 hours for analysis of time for sleep onset, total time in each phase of the sleep-wake cycle, number and duration of REM sleep episodes, and the cardiovascular parameters systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) in the different phases of the cycle. The respiratory parameters were recorded for 2 hours for analysis of ventilatory frequency (fR), tidal volume (V_T) and minute volume (V_E) in the different phases of the sleep-wake cycle. The groups of animals used for analysis of respiratory muscle activity were recorded for only 2 hours. CIH promoted significant alterations only in the duration of REM episodes. However, animals from CIH group had higher average levels of SBP (145,0 ± 1,8 vs 129,3 ± 2,2 mmHg), DBP (104,1 ± 1,7 vs 91,4 ± 1,8

mmHg), MAP (121 ± 9 vs $107,7 \pm 1,9$ mmHg) e HR ($387, \pm 5,4$ vs $363,5 \pm 8,7$ bpm) in the 3-hour recording period. These increases were also observed in all phases of the sleep-wake cycle. CIH also promoted a significant increase in V_T during NREM ($6,6 \pm 0,2$ vs $5,8 \pm 0,2$ mL/kg) and REM ($6,4 \pm 0,2$ vs $5,3 \pm 0,2$ mL/kg), although this parameter was not significantly different during wakefulness in CIH animals compared to CTL animals. Both groups presented active expiration only during wakefulness, however it was much more frequent in HCI rats. In addition, in CIH animals, the fall in MAP ($-18 \pm 0,8$ vs $-14 \pm 0,6$ mmHg) and the increase in HR ($28,4 \pm 1,8$ vs $21,8 \pm 1,1$ bpm) associated with DBs presented higher magnitudes in relation to CTL animals, although the time interval between DBs did not change. These findings indicate that CIH for 10 days promotes longer REM episodes, increased BP and HR in all phases of the cycle, increased V_T during sleep, increased active expiration occurrence and higher magnitudes of the hemodynamic responses associated with DBs. Therefore, the cardiovascular alterations observed after CIH are due to the intermittent hypoxia episodes that occur throughout this protocol, but do not seem to be related to changes in the sleep-wake cycle, for although the duration of REM episodes was longer, the cardiovascular parameters were equally increased in all phases of the sleep-wake cycle.

Keywords: chronic intermittent hypoxia, sleep-wake cycle, cardiovascular and respiratory alterations, deep breaths.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Traçado representativo de um rato mostrando registro simultâneo da pressão arterial pulsátil (PAP), eletrocorticograma (ECoG), frequência cardíaca (FC) e ventilação (INSP = inspirações) durante o sono de ondas lentas. Dois eventos de dessincronizações eletrocorticográficas estão apresentados. IP = inspiração profunda. Adaptado de Dias-dos-Santos e Machado (1997). 22

Figura 2. Representação esquemática do protocolo experimental indicando os horários de início e término dos registros (setas) e os segmentos temporais utilizados na avaliação dos registros cardiovasculares, eletrocorticográficos, eletromiográficos e pletismográficos. 34

Figura 3. Peso dos ratos controles (CTL, n=12) e ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente por 10 dias (HCI, n=12) no início do primeiro dia do protocolo de HCI e no término do último dia do protocolo. * $P < 0,05$; n.s. $P > 0,05$; ANOVA de duas vias. 38

Figura 4. Tempo necessário para ratos controles (CTL, n = 9) e ratos previamente submetidos à hipóxia crônica intermitente por 10 dias (HCI, n = 12), após o término da manipulação dos animais para conexão dos fios e cânulas de registro, apresentarem o primeiro episódio de sono NREM. 39

Figura 5. Porcentagem de um tempo total de 3 horas que os ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, n = 12) permaneceram nas fases acordada (A), NREM (B) e REM (C) do ciclo sono vigília. 40

Figura 6. Média do número total de episódios de sono REM apresentados por ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, n = 12) em um período de 3 horas de registros. 41

Figura 7. Média da duração de todos os episódios de sono REM apresentados por ratos controles (CTL, n = 9, 94 episódios) e ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente por 10 dias (HCI, n = 12, 123 episódios) em um período de 3 horas de registros. * $P < 0,05$ – diferente em relação ao grupo CTL. 42

Figura 8. Hipnogramas do período de 3 horas de registros do ciclo sono-vigília durante a fase clara do ciclo claro/escuro de um rato representativo do grupo controle (CTL) e de um rato submetido ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI). 43

Figura 10. Média dos valores médios de pressão arterial sistólica (PAS, A), pressão arterial diastólica (PAD, B), pressão arterial média (PAM, C) e frequência cardíaca (FC, D) apresentados somente durante as fases de sono NREM de um registro de 3 horas do ciclo sono-vigília de ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, n = 12). * $P < 0,05$ – diferente em relação ao grupo CTL. 46

Figura 14. Média da frequência cardíaca (FC) de ratos controles (CTL, n=9) e ratos submetidos à HCI por 10 dias (HCI, n=12) durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília (vigília, NREM e REM). * $P < 0,05$; n.s. $P > 0,05$; ANOVA de uma via. 50

Figura 15. Média dos valores médios de frequência respiratória (fR, A), volume corrente (V_T , B) e volume minuto (V_E , C) apresentados somente durante a fase acordada do ciclo sono-vigília de ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, n = 11). 51

Figura 16. Média dos valores médios de frequência respiratória (fR, A), volume corrente (V_T , B) e volume minuto (V_E , C) apresentados somente durante a fase de sono NREM do ciclo sono-vigília de ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, n = 11). * $P < 0,05$ – diferente em relação ao grupo CTL. 52

Figura 17. Média dos valores médios de frequência respiratória (fR, A), volume corrente (V_T , B) e volume minuto (V_E , C) apresentados somente durante a fase de sono REM do ciclo sono-vigília de ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, n = 11). * $P < 0,01$ – diferente em relação ao grupo CTL. 53

Figura 18. Registros da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e atividades dos músculos respiratórios diafragma (DIA) e abdominal oblíquo (ABD) nas fases de vigília ativa (i), NREM (ii) e REM (iii) do ciclo sono-vigília de um rato representativo do grupo CTL e de um rato representativo do grupo HCI. 54

Figura 19. Porcentagem em relação ao tempo total de registros (2 h = 100%) em que ratos controle (CTL, n = 5) e ratos submetidos ao protocolo de hipóxia crônica intermitente (HCI, n = 6) apresentaram expirações ativas. * $P < 0,05$ – diferente em relação ao grupo CTL. 55

Figura 20. Médias das magnitudes das respostas hipotensoras (A) e taquicárdicas (B) associadas a inspirações profundas (IPs) de ratos controles (CTL, 48 IPs) e ratos submetidos a 10 dias de protocolo de hipóxia crônica intermitente (HCI, 54 IPs) e dos intervalos temporais (CTL = 35 intervalos; HCI = 37 intervalos) entre IPs (C). * $P < 0,05$ – diferente em relação ao grupo CTL. 56

LISTA DE ABREVIATURAS

ABD	Músculo abdominal oblíquo
AOS	Apneia obstrutiva do sono
bpm	Batimentos por minuto
cpm	Ciclos por minuto
CO ₂	Dióxido de carbono
CTL	Controle
DIA	Músculo diafragma
ECoG	Eletrocorticograma (Eletrocorticografia)
EMG	Eletromiograma (Eletromiografia)
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
fR	Frequência ventilatória
HCI	Hipóxia crônica intermitente
I.M.	Intramuscular
INSP	Inspirações
IPs	Inspirações profundas
i.p.	Intraperitoneal
mmHg	Milímetro de mercúrio
N ₂	Nitrogênio
NA	Núcleo ambíguo
NREM	<i>Non-rapid eye movement</i>
NTS	Núcleo do trato solitário

O ₂	Oxigênio
PA	Pressão arterial
PaCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PAP	Pressão arterial pulsátil
PAS	Pressão arterial sistólica
pH	Potencial hidrogeniônico
REM	<i>Rapid eye movement</i>
RVLM	Bulbo ventrolateral rostral
UI	Unidades internacionais
VGR	Grupo respiratório bulbar ventral
V _E	Volume minuto
V _T	Volume corrente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Grupos Experimentais	26
3.3 Implante de eletrodos para registro eletrocorticográfico (ECoG) e eletromiográfico (EMG) cervical, abdominal e diafragmático	27
3.4 Hipóxia Crônica Intermitente	28
3.5 Implante de cânulas para registro da PA e da FC	29
3.6 Avaliação da PA, da FC e das atividades respiratória, eletrocorticográfica e eletromiográfica	30
3.6.1 Registro da PA e da FC	30
3.6.2 Registro da frequência respiratória, volume corrente e volume minuto	30
3.6.3 Registros eletrocorticográficos e eletromiográficos	32
3.7 Protocolo experimental de registros fisiológicos	33
3.8 Coleta dos dados a partir dos registros	35
3.9 Análise estatística dos dados	36
4. RESULTADOS	38
4.1 Peso dos animais ao longo do protocolo de HCl	38
4.2 Parâmetros referentes ao padrão de ciclo sono-vigília	39
4.2.1 Tempo necessário para ocorrência do primeiro episódio de sono NREM	39
4.2.2 Tempo total em cada fase do ciclo sono-vigília	39
4.2.3 Número total de episódios de sono REM	41
4.2.4 Duração dos episódios de sono REM	41
4.3 Parâmetros cardiovasculares durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília de ratos dos grupos CTL e HCl	44
4.3.1 Parâmetros cardiovasculares nos ratos acordados	44
4.3.2 Parâmetros cardiovasculares nos ratos durante o sono NREM	45

4.3.3 Parâmetros cardiovasculares nos ratos durante o sono REM	46
4.3.4 Parâmetros cardiovasculares basais independentes da fase do ciclo sono-vigília	47
4.3.5 Análises intragrupos dos parâmetros cardiovasculares durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília	48
4.4 Parâmetros respiratórios durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília	50
4.4.1 Parâmetros respiratórios nos ratos acordados.....	50
4.4.2 Parâmetros respiratórios nos ratos durante o sono NREM	51
4.4.3 Parâmetros respiratórios nos ratos durante o sono REM.....	52
4.5 Avaliação da atividade expiratória nas diferentes fases do ciclo sono-vigília	53
4.6 Parâmetros referentes às inspirações profundas (IPs)	55
5. DISCUSSÃO.....	57
5.1 Ganho de peso dos animais ao longo do protocolo de HCl	57
5.2 Parâmetros referentes ao padrão de ciclo sono-vigília	58
5.3 Parâmetros cardiovasculares durante cada fase do ciclo sono-vigília.....	61
5.4 Parâmetros respiratórios durante cada fase do ciclo sono-vigília	64
5.5 Avaliação da atividade expiratória durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília.....	65
5.6 Parâmetros referentes às IPs	66
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

A hipóxia crônica intermitente (HCI) é um modelo experimental que simula alguns dos efeitos fisiológicos decorrentes da apneia obstrutiva do sono (AOS) (FLETCHER *et al.*, 1992). A AOS é uma condição fisiopatológica na qual ocorre obstrução episódica das vias aéreas superiores durante o sono (CAPLES *et al.*, 2005; DEMPSEY *et al.*, 2010), podendo levar à fragmentação do sono e à ativação intermitente do quimiorreflexo em alguns casos. Em humanos, a AOS está associada ao desenvolvimento de hipertensão sistêmica, insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana, arritmias, distúrbios metabólicos, sonolência diurna, além de prejuízos na capacidade de concentração e memória (CAPLES, *et al.*, 2005; SOMERS *et al.* 2008; DEMPSEY *et al.* 2010; PARK *et al.* 2011).

As células glomus que constituem os quimiorreceptores localizados nos corpos carotídeos e aórticos são sensíveis a variações na composição química do sangue arterial, principalmente na diminuição na pressão parcial do oxigênio (PaO_2), mas também no aumento da pressão parcial de dióxido de carbono (PaCO_2) ou queda do pH sanguíneo (COSTA *et al.* 2014). As células glomus, quando ativadas, dão início a uma série de processamentos neurais que constituem o quimiorreflexo. Essas células podem ser estimuladas também por drogas específicas, como o cianeto de potássio (KCN) (BARROS *et al.* 2002). As informações geradas a partir das células glomus em contato com as terminações de neurônios que constituem as aferências do quimiorreflexo são conduzidas pelos nervos glossofaríngeo e vago até o núcleo do trato solitário (NTS), local de processamento e transmissão das informações periféricas para outras áreas do tronco cerebral responsáveis pelo controle cardiovascular e respiratório (LONGHURST, 2008; ACCORSI-MENDONÇA *et al.*, 2011; ACCORSI-MENDONÇA & MACHADO, 2013). Em relação às vias neurais do quimiorreflexo, a partir da primeira sinapse no

NTS partem projeções excitatórias para o núcleo ambíguo (NA) (NUNEZ-ABADES *et al.*, 1990; MACHADO, 2001), aumentando assim o tônus vagal (sistema nervoso parassimpático) sobre o coração. Além disso, do NTS também partem projeções excitatórias para os neurônios pré-simpáticos da região rostral ventrolateral do bulbo (bulbo ventrolateral rostral, BVLR) (KOSHIYA & GUYENET, 1996; GUYENET, 2000; ACCORSI-MENDONÇA *et al.*, 2016), aumentando o tônus simpático vasomotor com consequente vasoconstrição. Do NTS partem também projeções para o grupo respiratório bulbar ventral (VGR), responsáveis pela taquipnéia e inspiração e expiração forçadas observadas nas respostas à ativação do quimiorreflexo (ZOCCAL *et al.*, 2009b; ZOCCAL & MACHADO, 2011; MORAES *et al.*, 2012a). O quimiorreflexo induz, portanto, resposta pressora mediada pela ativação glutamatérgica de neurônios pré-simpáticos localizados na região ventral do bulbo, e resposta bradicárdica mediada ativação de neurônios pré-ganglionares parassimpáticos do núcleo ambíguo (COSTA *et al.* 2014).

Na AOS, ocorre obstrução das vias aéreas superiores devido ao tônus motor inadequado da língua e de músculos dilatadores da faringe, o qual muitas vezes combinados a um retroposicionamento da mandíbula durante o sono, podem levar ao bloqueio total (apneia) ou parcial (hipopneia) do fluxo de ar (PARK *et al.*, 2011; GREENSTONE & HACK, 2014). Esses eventos de hipopneia ou apneia podem levar à excitações neurofisiológicas com interrupção abrupta do estado de sono, a qual pode ser observada em registros eletroencefalográficos (DEEGAN & MCNICHOLAS, 1995). Esses microdespertares restabelecem o tônus muscular da farínge e lingual, possibilitando a desobstrução das vias aéreas e permitindo o fluxo de ar. Em alguns casos de AOS, as apneias podem levar à quedas repetidas da PaO_2 (hipóxia) e à ativação intermitente das células glomus do corpúsculos carotídeo e, consequentemente, do

quimiorreflexo, o que promove ajustes cardiovasculares e respiratórios. A HCI, como modelo experimental, expõe o animal a períodos de hipóxia intermitentes com períodos de normóxia, o qual simula, em parte, os efeitos sistêmicos da hipóxia observados na AOS.

Diversos estudos têm demonstrado que a HCI promove alterações significativas no controle autonômico e respiratório, levando a um quadro de hipertensão arterial. Estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que ratos submetidos à HCI apresentam pressão arterial média (PAM) significativamente aumentada (ZOCCAL *et al.*, 2007a, 2007b), níveis elevados de corticosterona (ZOCCAL *et al.*, 2007b) e de noradrenalina plasmática (ZOCCAL *et al.*, 2007b), sugerindo aumento da atividade simpática nesse modelo experimental. Outro estudo mostrou que o bloqueio ganglionar com hexametônio promove resposta depressora mais acentuada em ratos HCI em relação aos respectivos controles, indicando aumento do tônus simpático vasomotor nesses animais (ZOCCAL *et al.*, 2009a). Estudos de Braga *et al.* (2006) mostraram, por meio da preparação coração-tronco cerebral isolados (preparação *in situ*), que ratos submetidos à HCI, em resposta à ativação do quimiorreflexo, apresentam maior atividade do nervo simpático torácico, aumento persistente do disparo do nervo frênico e maior resposta bradicárdica em resposta à estimulação do quimiorreflexo. Posteriormente, Zoccal *et al.* (2008) verificaram, por meio da mesma preparação, que a HCI promove aumento da atividade basal do nervo simpático torácico. Este aumento foi correlacionado com o aparecimento de disparos dos nervos abdominais na fase expiratória final (*late expiration - late-E*), sugerindo alterações no acoplamento entre as redes respiratórias e simpáticas no tronco cerebral, podendo estas estarem envolvidas com a gênese da hipertensão nesse modelo experimental. A presença de atividade expiratória nos ratos submetidos à HCI também foi confirmada em estudo posterior do

nosso laboratório por meio de registros *in vivo* dos músculos abdominal e diafragma (MORAES *et al.*, 2013).

O sono pode ser definido como um comportamento normal, periódico e reversível, complementar à vigília, em que há reduzida percepção sensorial e da atividade motora voluntária, tornando o indivíduo menos responsivo aos estímulos naturais do meio ambiente (CARSKADON & DEMENT, 2011). Duas fases evidentes ocorrem no sono natural, sendo estas classicamente chamadas de sono sincronizado ou NREM (do Inglês: *non-rapid eye movement*) e sono dessincronizado ou REM (do Inglês: *rapid eye movement*). No sono NREM, à medida que o sono se aprofunda, ocorre uma diminuição progressiva da frequência e um aumento da voltagem observada por meio de registros eletroencefalográficos, além do progressivo relaxamento muscular, porém sem perda total do tônus. Em contrapartida, o sono REM é caracterizado por baixa amplitude de voltagem e alta frequência no eletroencefalograma, atonia muscular, movimentação rápida dos olhos e flutuações cardiorrespiratórias (CARSKADON & DEMENT, 2011). O padrão temporal e quantitativo do ciclo sono-vigília em mamíferos é influenciado por mecanismos fisiológicos e psicológicos, bem como por fatores ambientais e sociais (SAPER *et al.*, 2005). Nos roedores e em outros mamíferos, embora haja uma reconhecida variabilidade na dinâmica do sono-vigília em curto prazo (isto é, na microarquitetura do sono-vigília fase-a-fase) (ZUNG *et al.*, 1965; YANG & HURSCH, 1973), o ciclo sono-vigília apresenta uma regularidade que depende de dois mecanismos fisiológicos: um sistema de temporização circadiano dependente do relógio biológico, o qual modula o ciclo sono-vigília em um padrão cíclico circadiano, e um mecanismo homeostático oscilatório (homeostato sono-vigília), que regula o ciclo sono-vigília conforme o tempo acumulado em cada um desses estados. Vários modelos têm sido propostos para explicar padrões de longo-prazo de sono-vigília, porém o modelo

que inclui o relógio biológico e o homeostato sono-vigília como principais fatores determinantes da duração e temporização do sono (“modelo de 2 processos”) é um dos mais reconhecidos (ACHERMANN, 2004; BORBÉLY, 1982; DAAN *et al.*, 1984). Ainda que esse modelo contribua para explicar padrões de longo prazo de sono-vigília, o mesmo não oferece elementos para explicar flutuações de curto prazo (ultradianas) no comportamento sono-vigília, principalmente em roedores, uma vez que, diferente dos humanos, esses animais apresentam padrões polifásicos de sono (STEPHENSON *et al.*, 2012).

Por dependerem de mecanismos neurais distintos (JOUVET, 1967; ALÓE *et al.*, 2005), o sono NREM e o sono REM podem influenciar de forma diferente as regulações cardiovascular e respiratória. O fato da região do córtex insular participar na modulação simpática e parassimpática faz com que essa área tenha papel na regulação do controle cardiovascular durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília (ZHANG & OPPENHEIMER, 1997; OPPENHEIMER *et al.*, 1992). Além disso, sabe-se que em humanos ocorre diminuição do limiar de sensibilidade do barorreflexo durante o sono, estando esta redução aparentemente associada a mecanismos regulatórios centrais ainda desconhecido (SAYK *et al.*, 2007). Estudos de Somers *et al.* (1993) mostraram que durante o sono NREM ocorre aumento da sensibilidade barorreflexa e predominância parassimpática, o que reduz a pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC). Outros estudos em humanos mostraram que durante o sono REM os níveis de PA e FC aumentam devido à um aumento da atividade simpática (HORNYAK *et al.*, 1991; NAKAZATO *et al.*, 1998).

Os parâmetros hemodinâmicos sofrem variações significativas em muitas espécies de animais ao longo das 24 horas do dia, mas também, e principalmente, durante as diferentes fases do sono. Em estudos realizados em ratos, Junqueira e Krieger

(1976) verificaram que os níveis médios de PA no sono NREM e no repouso acordado foram semelhantes, porém mais estáveis no sono NREM. O mesmo estudo indicou que o sono REM é acompanhado de aumento tônico e variações fásicas da PA. Esse aumento dos níveis médios de PA durante o sono REM foram posteriormente corroborados por estudos de Moreira e Krieger (1984) e Padilha e Krieger (1987). Em 95% dos humanos normotensos, durante o sono ocorre o chamado descenso noturno, ou seja, uma queda da PA maior ou igual a 10% da PA durante a vigília (STAESSEN *et al.*, 1997). Evidências indicam que durante o sono, humanos apresentam variações típicas das funções cardiovascular, com predomínio da atividade parassimpática e redução da PA, FC e da frequência respiratória durante o sono NREM, porém aumentos fásicos da atividade simpática e instabilidade dos parâmetros cardiorrespiratórios durante o sono REM, tendo estes fatores relação com as diferentes emoções experienciadas nos sonhos vívidos que acontecem nessa fase do sono (MURALI *et al.* 2003). Durante o sono NREM, Khatri e Freis (1967) observaram que a PA, a FC e o débito cardíaco estavam reduzidos em comparação com a vigília em repouso. Esses autores também observaram que o sono REM era acompanhado de oscilações nos registros de PA e FC, porém com tendência à elevação, e vasoconstrição, sugerindo aumento da atividade simpática nesta fase do sono. Estudos de Somers *et al.* (1993) mostraram redução da atividade simpática, da PA e da FC em humanos em sono NREM em comparação com a vigília. Além disso, esses autores observaram que durante o sono REM a atividade simpática aumentou e que os níveis de PA e FC retornaram para valores semelhantes aos observados durante a vigília.

Em mamíferos, inspirações profundas (IPs) ocorrem em intervalos de tempo regulares, sendo uma característica respiratória normal. Esses episódios de IPs têm sido considerados um mecanismo fisiológico para prevenção de atelectasia (REYNOLDS,

1962; BENDIXEN *et al.*, 1964; BARTLETT, 1971). Estudos do nosso laboratório mostraram que as IPs estão associadas a oscilações na PA e na FC (MACHADO *et al.*, 1992; MAUAD *et al.*, 1992). Em um estudo do nosso laboratório com ratos durante o sono natural, as IPs foram seguidas de hipotensão e taquicardia, além de serem precedidas por dessincronizações regulares no sono NREM avaliado por meio de registros eletrocorticográficos (Figura 1) (DIAS-DOS-SANTOS & MACHADO, 1997). Esse período curto de dessincronização do sono NREM tem sido considerado a expressão eletrofisiológica dos microdespertares que acompanham as IPs (DIAS-DOS-SANTOS & MACHADO, 1997).

Figura 1. Traçado representativo de um rato mostrando registro simultâneo da pressão arterial pulsátil (PAP), eletrocorticograma (ECoG), frequência cardíaca (FC) e ventilação (INSP = inspirações) durante o sono de ondas lentas. Dois eventos de dessincronizações eletrocorticográficas estão apresentados. IP = inspiração profunda. Adaptado de Dias-dos-Santos e Machado (1997).

Embora estudos anteriores do nosso laboratório tenham identificado alterações autonômicas e respiratórias no modelo de HCI em registros realizados em ratos não anestesiados (ZOCCAL *et al.*, 2007a; ZOCCAL *et al.*, 2007b; ZOCCAL *et al.*, 2008;

MORAES et al., 2013; PERIM et al., 2015; SOUZA et al., 2015), informações sobre possíveis alterações no ciclo sono-vigília desses animais durante o período do dia nos quais os registros cardiovasculares e respiratórios são normalmente realizados no nosso laboratório ainda não haviam sido estudadas. Por essa razão realizamos os registros dos parâmetros cardiorrespiratórios durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília. Importante destacar que possíveis alterações no ciclo sono-vigília poderiam contribuir para as importantes alterações cardiorrespiratórias observadas nesse modelo experimental. Nesse contexto, a nossa hipótese original foi a seguinte: os animais submetidos à HCI apresentam modificações no padrão de ciclo sono-vigília durante a janela temporal de 3 horas compreendidas entre as 12:00 h e as 15:00 h, quando os registros cardiovasculares e respiratórios são normalmente realizados no nosso laboratório. Essas eventuais alterações contribuiriam para as alterações cardiovasculares e respiratórias observadas nesses animais após o protocolo de HCI. Portanto, para testar essa hipótese, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar se ratos previamente submetidos à HCI apresentam alterações no padrão de curto prazo no sono-vigília e nos padrões cardiovascular e respiratório durante cada uma das diferentes fases do ciclo sono-vigília ao longo das 3 horas de registros.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se ratos submetidos ao protocolo de HCI apresentam, no dia seguinte ao término do protocolo, alterações no ciclo sono-vigília em um período de registro de 3 horas durante o dia, as quais poderiam contribuir para as alterações cardiovasculares e respiratórias observadas nesses animais durante este período.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o tempo necessário para o aparecimento do sono (latência para o sono) nos animais submetidos ao protocolo de HCI após os mesmos serem conectados aos sistemas de registros;
- Investigar se a HCI altera a duração das diferentes fases do ciclo sono-vigília em um período de 3 horas de registros;
- Analisar o número de episódios de sono REM e a duração dos episódios REM nos animais submetidos à HCI durante o período de 3 horas de registros;
- Avaliar os efeitos da HCI sobre os valores basais de PA e FC durante o período de 3 horas de registros;
- Investigar se a HCI altera os valores basais de PA e FC durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília;
- Avaliar se a HCI promove alterações nos valores basais de frequência ventilatória (f_R), o volume corrente (V_T) e o volume minuto (V_E) durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília;
- Investigar se a HCI promove alterações na atividade expiratória (expiração ativa) nas diferentes fases do ciclo sono-vigília;

- Avaliar os efeitos da HCI sobre a frequência das inspirações profundas (IPs) e sobre as respostas taquicárdicas e hipotensoras durante as IPs.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Nesse estudo foram utilizados ratos machos jovens (Wistar) com peso aproximado de 250 g e fornecidos pelo Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto. Todos os animais foram mantidos em condições ambientais padrões ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$; 12/12h de ciclo claro/escuro). Os protocolos experimentais propostos neste trabalho foram realizados após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, Processo nº 129/2016) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da USP.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo HCI (n=18): os ratos foram submetidos ao protocolo experimental de HCI 10 dias após os procedimentos cirúrgicos de implantes de eletrodos e antes dos registros eletrocorticográficos (ECoG), eletromiográficos (EMG) cervicais, cardiovasculares e respiratórios (n=12). Neste grupo, 6 animais foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém com adição de eletrodos implantados nos músculos diafragma (DIA) e abdominais oblíquos externo e interno (ABD) para registros concomitantes das atividades inspiratória e expiratória, respectivamente.
- Grupo controle (n=17): os ratos foram mantidos integralmente em condições de normóxia por 10 dias após os procedimentos cirúrgicos de implantes de eletrodos e antes dos registros ECoG, EMG cervicais, cardiovasculares e respiratórios (n=12). Neste grupo, 5 animais foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém com adição de eletrodos implantados nos músculos DIA e ABD para os registros das atividades inspiratória e expiratória, respectivamente.

3.3 Implante de eletrodos para registro eletrocorticográfico (ECoG) e eletromiográfico (EMG) cervical, abdominal e diafragmático

Os animais de ambos os grupos foram submetidos à cirurgia de implantação de eletrodos para os registros do ECoG e EMG. Para isso, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). O nível anestésico foi verificado constantemente por pinçamentos na cauda e a ausência de respostas reflexas. Em caso de respostas reflexas, doses adicionais do anestésico foram injetadas. Com auxílio de um aparato de estereotaxia, dois pequenos parafusos de relojoeiro de cromo-níquel (1,2 mm de diâmetro) foram fixados em duas pequenas perfurações cranianas. No osso parietal, um dos parafusos foi afixado 1,5 mm à direita da sutura mediana e 2 mm anterior à sutura bregmática. O outro parafuso foi afixado 1,5 mm à direita da sutura mediana e 2 mm anterior à sutura lambdoide. Os parafusos fixados no crânio e em contato com a dura-máter foram conectados, por meio de dois fios de aço inoxidável, à um soquete posicionado sobre o crânio. Com o animal posicionado em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica, dois eletrodos (fios flexíveis de aço inoxidável) também foram inseridos no músculo trapezoide e conectados ao soquete posicionado sobre o crânio (EMG cervical). Cimento acrílico foi utilizado para afixar o soquete aos pequenos parafusos. Com o animal em decúbito lateral, uma pequena incisão foi realizada no tecido cutâneo e subcutâneo da região lateral esquerda do abdômen para inserção de um par de eletrodos nos músculos abdominais oblíquos externo e interno (ABD) para registro da atividade expiratória. Com o animal em decúbito ventral, dois eletrodos também foram implantados no músculo diafragma (DIA) por meio de uma incisão no abdômen, na região do hipocôndrio direito, para registros da atividade inspiratória. O soquete conectado aos fios de EMG de DIA e

ABD foi posicionado dorsalmente entre as escápulas. Após a cirurgia, foi administrado o anti-inflamatório e analgésico flunixinina meglumina (1 mg/kg, I.M.) (Banamine; Mantecorp Ind. Quím. e Farm. Ltda, Rio de Janeiro, Brazil) e uma dose única (0,2 mL de 2,4 milhões UI, I.M.) de associação anti-infecciosa polivalente (Pentabiótico® veterinário, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, Brasil). Os animais foram então acondicionados em ambiente com temperatura controlada, com liberdade de movimentos e com água e ração *ad libitum* e supervisão constante durante o período de pelo menos 2 horas para a recuperação dos efeitos da anestesia.

3.4 Hipóxia Crônica Intermitente

Após 48 h de recuperação da cirurgia e anestesia, os animais dos grupos HCI e controle foram alojados em gaiolas individuais (30 x 20 x 13 cm) e mantidos dentro de câmaras de polimetilmetacrilato (Plexiglas®) (volume = 210 L) equipadas com injetores de O₂ e nitrogênio (N₂) e sensores de O₂, CO₂, temperatura e umidade. Por um período de 10 dias, o grupo HCI foi submetido a 8 horas diárias (das 9:00h às 17:00h) de ciclos de 5 minutos de normóxia (fração de O₂ inspirado (FiO₂) = 0,208) seguidos de 4 minutos de injeção de N₂ (100%) para redução da FiO₂ para 0,06, permanecendo neste nível por 30-40 s. Ao término deste período, O₂ foi injetado a fim de retornar a FiO₂ para 0,208. A cada ciclo de 9 minutos, os animais foram submetidos a 1 (um) episódio de hipóxia, tendo o protocolo sido repetido 8 horas por dia. Durante as 16 h remanescentes do período de 24 h (das 17:00h às 09:00h), os animais HCI foram mantidos em normóxia. O grupo controle foi mantido em normóxia por 24 h por dia durante 10 dias. Os ciclos de injeção de gases nas câmaras foram alternados automaticamente pelas válvulas solenoides do sistema Oxycycler (Biospherix, Redfield, NY, USA) conectado a cilindros de O₂ e N₂ (White Martins, Sertãozinho, SP, Brasil) e

controlado por um sistema computadorizado (Oxycycler, Biospherix, Lacona, NY, USA).

3.5 Implante de cânulas para registro da PA e da FC

Ao final do dia correspondente ao 10^o dia do protocolo de HCI ou controle, os animais foram anestesiados novamente com uma mistura de cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). O nível anestésico foi verificado constantemente por pinçamentos na cauda e a ausência de respostas reflexas. Em caso de respostas reflexas, doses adicionais do anestésico foram injetadas. Uma cânula de polietileno (PE-10 conectado ao PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) previamente preenchida com solução fisiológica foi implantada na aorta abdominal (através da artéria femoral), tendo esta sido utilizada para registro da pressão arterial pulsátil (PAP). A extremidade externa da cânula foi obstruída com pino de metal para evitar o fluxo de sangue. Um trocater foi utilizado para conduzir as cânulas subcutaneamente e exteriorizá-las no dorso do animal, entre as escápulas, onde foram suturadas junto a pele. Após a cirurgia, o anti-inflamatório e analgésico flunixinina meglumina (1 mg/kg, I.M.) (Banamine; Mantecorp Ind. Quím. e Farm. Ltda, Rio de Janeiro, Brazil) foi administrado e os animais acondicionados individualmente com livre movimentação, água e ração *ad libitum* e sob supervisão constante durante o período de pelo menos 2 horas para a recuperação dos efeitos da anestesia.

3.6 Avaliação da PA, da FC e das atividades respiratória, eletrocorticográfica e eletromiográfica

3.6.1 Registro da PA e da FC

Após pelo menos 17 h de recuperação dos procedimentos cirúrgicos e anestesia, a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (MLT0380; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália), o qual, por sua vez, foi conectado a um amplificador (Bridge Amp, ML221; ADInstruments). Os sinais da PAP foram adquiridos por um sistema de aquisição (PowerLab 4/25, ML845; ADInstruments) e registrados em um computador com frequência de aquisição de 2 kHz por meio de um software (Chart Pro; ADInstruments). Os valores das pressões arteriais diastólica (PAD), média (PAM) e sistólica (PAS), e da FC foram derivados a partir dos sinais da PAP utilizando o software de aquisição.

3.6.2 Registro da frequência respiratória, volume corrente e volume minuto

A avaliação da fR, do V_T e do V_E foi feita por meio de pletismografia de corpo inteiro, como descrito por Bartlett Jr. e Tenney (1970). Para isso, o animal foi acondicionado dentro de uma câmara de acrílico vedada (volume da câmara = 6 L), de modo que pequenas variações de pressão dentro da câmara pudessem ser monitoradas. A respiração do animal causou oscilações na temperatura do ar dentro da câmara, uma vez que o ar inspirado estava a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) e o ar expirado estava a temperatura corporal (aproximadamente 37 °C), o que resultou em oscilações na pressão total dentro da câmara. Um transdutor diferencial de pressão de alta sensibilidade foi utilizado para monitorar as variações de pressão (ML141 Spirometer, PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, Austrália), estando este conectado a um sistema de aquisição (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments). Os sinais foram

registrados em um computador a uma frequência de aquisição de 1 kHz por meio de um software (Chart Pro; ADInstruments). A câmara pletismográfica foi aberta a cada 10 minutos para evitar alterações no padrão respiratório em decorrência do aumento da pressão parcial de CO₂ dentro da câmara. A calibração do volume (V_K) foi feita a cada experimento por meio da injeção de 1 mL de ar com uma seringa. As temperaturas da sala de experimentos e dentro da câmara pletismográfica foram monitoradas constantemente. A frequência respiratória (FR) foi calculada pelo software de aquisição a partir do intervalo de tempo entre ciclos respiratórios consecutivos e foram expressos em ciclos por minuto (cpm). Os valores de volume corrente (V_T) foram calculados utilizando a equação abaixo, conforme descrito por Drorbaugh e Fenn (1955), corrigidos para o peso do animal e expressos em mL/kg:

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

Onde,

V_K = volume de ar injetado na câmara para calibração;

P_K = alteração de pressão associada a injeção do volume de calibração;

PT = alteração de pressão associada a cada ciclo respiratório;

T_C = temperatura corporal do animal (~37 °C);

TA = temperatura do ar dentro da câmara;

PB = pressão barométrica;

PC = pressão de vapor d'água à temperatura corporal (50 mmHg);

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

Os valores de volume minuto (V_E) foram calculados a partir da equação abaixo e expressos em mL/kg/min:

$$V_E = FR \times V_T$$

3.6.3 Registros eletrocorticográficos e eletromiográficos

Para obtenção dos sinais eletrocorticográficos e eletromiográficos, fios elétricos finos e flexíveis foram conectados aos soquetes previamente afixados no animal e a amplificadores (Animal Bio Amp, FE136; ADInstruments) acoplados a um sistema de aquisição (PowerLab 4/25, ML845; ADInstruments), de modo que os sinais foram registrados em computador a uma frequência de aquisição de 2 kHz por meio de um software (LabChart 5; ADInstruments). Os fios elétricos para registros do ECoG/EMG e as extensões dos cateteres arteriais foram exteriorizados através de um pequeno orifício na câmara pletismográfica para conexão com o sistema de registro. Durante os registros, o orifício foi coberto com uma rolha de espuma de poliuretano de maneira a impedir a entrada ou saída de ar. Os sinais eletrocorticográficos e eletromiográficos foram filtrados para passagem de faixa de 0,3-50 Hz e 30-500 kHz, respectivamente. Os estágios do sono foram identificados no registro eletrocorticográfico conforme os padrões descritos por Louis *et al.* (2004). Resumidamente, foram quantificadas a potência do EMG na faixa de 185 – 235 Hz e a potência do ECoG das bandas delta (δ : 1,5 – 6 Hz), teta (θ : 6 – 10 Hz), alfa (α : 10,5 – 15 Hz), beta (β : 22 – 30 Hz) e gama (γ : 35 – 45 Hz). Para isto, intervalos de 2048 pontos foram transformados com uma janela Hann e submetidos a transformação de Fourier. As diferentes fases do ciclo sono-vigília foram identificadas a partir dos seguintes passos:

1 - a amplitude do EMG ultrapassa o limiar? Sim: vigília ativa; não: sono ou vigília relaxada;

2 - a razão das potências de bandas lentas pelas bandas rápidas do ECoG, ou seja, $(\delta \times \alpha) / (\beta \times \gamma)$, ultrapassa o limiar? Sim: NREM; não: REM ou vigília relaxada;

3 - a razão da potência da banda teta pelas bandas lentas do ECoG, ou seja, $\theta^2/(\delta \times \alpha)$, ultrapassa o limiar? Sim: REM; não: vigília relaxada.

Os limiares para os três passos foram estabelecidos manualmente a partir dos próprios registros e as fases do ciclo sono-vigília foram classificadas em épocas de 10 segundos, ou seja, a cada 10 segundos o algoritmo determinava a fases do ciclo em que o animal se encontrava.

3.7 Protocolo experimental de registros fisiológicos

A figura 2 descreve o protocolo experimental de registro dos parâmetros cardiovasculares, ECoG, EMG e pletismografia. Todos os animais foram alocados na sala de registros para adaptação pelo menos 1 hora antes do início dos registros. Todos os fios e cânulas foram conectados aos animais imediatamente antes de iniciarmos os registros. Durante todo o período de registro, os animais não foram manipulados e os registros foram realizados em uma sala com isolamento acústico para evitar os efeitos indesejáveis de ruídos que pudessem estressar os animais e alterar a qualidade do sono. Os parâmetros de PAP, ECoG, e EMG foram coletados simultaneamente das 11:00 às 15:00 h. A primeira hora de registro foi descartada e somente o período das 12:00 h às 15:00 h foi considerado para avaliação dos parâmetros de ciclo sono-vigília e parâmetros cardiovasculares. Os registros envolvendo a pletismografia de corpo inteiro somente foram feitos no período entre as 15:00 e as 17:00 h, a fim de avaliarmos os parâmetros respiratórios e as alterações cardiovasculares durante as inspirações profundas (IPs).

Figura 2. Representação esquemática do protocolo experimental indicando os horários de início e término dos registros (setas) e os segmentos temporais utilizados na avaliação dos registros cardiovasculares, eletrocorticográficos, eletromiográficos e pletismográficos.

3.8 Coleta dos dados a partir dos registros

Os parâmetros referentes ao ciclo sono-vigília dos animais e os parâmetros cardiovasculares foram analisados a partir das 3 horas de registro que correspondem ao período das 12:00 às 15:00 h. Para se avaliar a propensão para dormir, ou seja, para quantificar a latência para o sono, avaliamos o tempo necessário para a ocorrência do primeiro episódio de sono NREM com tempo igual ou superior a 30 s a partir do término da manipulação dos animais para conexões de cânulas e fios elétricos de registro. Para determinarmos o tempo total em cada uma das fases do ciclo sono-vigília (vigília, sono NREM e sono REM), somamos todas as épocas classificadas para cada uma das fases do ciclo e calculamos a porcentagem em relação ao total de épocas detectadas (1080 épocas em 3 horas de registro = 100 %).

Os parâmetros cardiovasculares basais de PAP, PAM, PAD e FC, independentemente da fase do ciclo sono-vigília que os animais se encontravam, foram analisados a partir da média do trecho total de 3 horas. Os mesmos parâmetros cardiovasculares foram avaliados também durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília por meio da média de todos os episódios de vigília, sono NREM e sono REM com tempo superior a 1 minuto apresentados no trecho de 3 horas de registro.

Os parâmetros respiratórios de fR, V_T e V_E nas diferentes fases do ciclo sono-vigília foram avaliados a partir do segmento de registro das 15:00 as 17:00 h por meio da média de pelo menos dois episódios de vigília, sono NREM e sono REM com duração superior a 1 minuto. Nos subgrupos de animais HCI e CTL dedicados à avaliação da atividade expiratória (*late-E*), avaliamos se a expiração ativa nesses animais seria dependente das fases do ciclo sono-vigília. Além disso, analisamos as séries de episódios contendo pelo menos 3 eventos de expiração ativa consecutivos de alta frequência, os quais apresentam características do comportamento de cheirar

exploratório. A soma dos intervalos de tempo correspondente a esses episódios foi calculada em percentuais em relação ao período total de 2 horas de registros (100%).

As alterações cardiovasculares associadas às IPs também foram avaliadas. Somente as inspirações que apresentavam o dobro do volume corrente de uma inspiração comum foram consideradas IPs. Para cada animal, avaliamos todas as IPs apresentadas em um trecho estável de no máximo 10 minutos de registro ventilatório (tempo máximo em que a câmara pletismográfica foi mantida fechada). Segmentos instáveis dos registros ventilatórios decorrentes de movimento corporal dos animais não foram utilizados para as análises. Os segmentos considerados para análises apresentaram pelo menos 3 episódios de IPs em todos os animais. Para avaliação das magnitudes de queda da pressão arterial e aumento da frequência cardíaca associada a uma IP, utilizamos as diferenças do pico da queda da PAM e do pico de aumento da FC durante um episódio de IP em relação aos níveis basais de PAM e FC observados 20 s antes do evento.

3.9 Análise estatística dos dados

Para comparação dos pesos dos animais dos grupos CTL e HCI no início e no término no protocolo, foi utilizado o teste ANOVA de duas vias com teste *post hoc* de Bonferroni. Para compararmos diretamente o grupo HCI e seu controle no que diz respeito aos parâmetros referentes ao ciclo sono-vigília, aos parâmetros cardiovasculares e respiratórios e as alterações cardiovasculares durante as IPs, foi utilizado teste *t* de Student não pareado quando as variâncias foram iguais e teste *t* com correção de Welch quando as variâncias foram significativamente diferentes. Para compararmos PAM e FC entre as fases do ciclo sono-vigília dentro do mesmo grupo, foi utilizado o teste ANOVA de uma via pareado com teste *post hoc* de Bonferroni. As

diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$. Os resultados foram apresentados como médias dos grupos $\pm$ erro padrão da média (EPM), sob a forma de figuras. Todas as construções gráficas e análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Peso dos animais ao longo do protocolo de HCI

Em relação aos pesos dos animais dos grupos experimentais, os resultados indicam que no protocolo de HCI 10 dias afetou significativamente o ganho de peso dos animais deste grupo em relação ao grupo CTL (Interação: $F_{1,44} = 52,85$, $P < 0,0001$; Variável CTL *vs.* HCI: $F_{1,44} = 47,83$, $P < 0,0001$; Variável Início *vs.* Término do protocolo: $F_{1,44} = 47,83$, $P < 0,0001$). O pós-teste indicou que os grupos HCI ($n=12$) e CTL ($n=12$) apresentavam pesos semelhantes no início do protocolo experimental ($259,3 \pm 3,4$ *vs.* $257,6 \pm 3,8$ g) (figura 3), porém os animais do grupo CTL apresentaram ganho significativo de peso ao término do protocolo ($332,3 \pm 5,6$ g) em relação ao início ($257,6 \pm 3,8$ g; $P < 0,05$) (figura 3). Além disso, os pesos dos animais do grupo HCI foram semelhantes no início e no término do protocolo, indicando que estes animais não ganharam peso ($259,3 \pm 3,4$ *vs.* $265,5 \pm 5,6$ g) (figura 3).

Figura 3. Peso dos ratos controles (CTL, $n=12$) e ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente por 10 dias (HCI, $n=12$) no início do primeiro dia do protocolo de HCI e no término do último dia do protocolo. * $P < 0,05$; n.s. $P > 0,05$; ANOVA de duas vias.

4.2 Parâmetros referentes ao padrão de ciclo sono-vigília

4.2.1 Tempo necessário para ocorrência do primeiro episódio de sono NREM

O primeiro parâmetro que avaliamos referente ao ciclo sono-vigília de ratos foi o tempo necessário para a ocorrência do primeiro episódio de sono NREM a partir do momento em que os fios e cânulas de registro foram conectados ao animal e o registro foi iniciado. Este parâmetro, portanto, diz respeito ao tempo necessário para o aparecimento do sono a partir do término da manipulação do animal. Quando registrados no dia seguinte ao término do protocolo de HCI, os animais dos grupos CTL e HCI não apresentaram diferença significativa no tempo necessário para ocorrência do primeiro episódio de sono ($14,4 \pm 2,8$ vs $9,3 \pm 1,3$ min; figura 4).

Figura 4. Tempo necessário para ratos controles (CTL, n = 9) e ratos previamente submetidos à hipóxia crônica intermitente por 10 dias (HCI, n = 12), após o término da manipulação dos animais para conexão dos fios e cânulas de registro, apresentarem o primeiro episódio de sono NREM.

4.2.2 Tempo total em cada fase do ciclo sono-vigília

Utilizando 3 horas de registro contínuo e sem perturbação do sono natural de ratos, avaliamos a porcentagem total de tempo que animais dos grupos experimentais permaneceram nas diferentes fases do ciclo sono-vigília. Os animais do grupo HCI (n =

9), quando comparados aos animais do grupo CTL ($n = 12$), não apresentaram diferenças significativas no tempo de permanência nas fases acordada ($32,49 \pm 2,1$ vs $32,92 \pm 2,6$ %; figura 5, painel A), NREM ($58,06 \pm 1,6$ vs $58,87 \pm 2,5$ %; figura 5, painel B) e REM ($9,45 \pm 1,4$ vs $8,21 \pm 0,8$ %; figura 5, painel C) do ciclo sono-vigília.

Figura 5. Porcentagem de um tempo total de 3 horas que os ratos controles (CTL, $n = 9$) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, $n = 12$) permaneceram nas fases acordada (A), NREM (B) e REM (C) do ciclo sono vigília.

4.2.3 Número total de episódios de sono REM

A figura 6 mostra a média do número total de episódios de sono REM apresentados pelos animais do grupo CTL (n = 9) e HCI (n = 12) em um período de 3 horas de registro do ciclo sono-vigília. Os ratos do grupo HCI apresentam um número total de episódios REM semelhantes àquele apresentado pelos ratos do grupo CTL ($10,25 \pm 1,7$ vs $10,44 \pm 1,3$ episódios; figura 6).

Figura 6. Média do número total de episódios de sono REM apresentados por ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, n = 12) em um período de 3 horas de registros.

4.2.4 Duração dos episódios de sono REM

Avaliamos também a duração de todos os episódios de sono REM apresentados por todos os animais dos grupos CTL (94 episódios) e HCI (123 episódios) em um período de 3 horas de registros. Observamos que a duração dos episódios de sono REM dos animais do grupo HCI foi significativamente maior que àquela dos episódios REM dos animais do grupo CTL ($99,59 \pm 4,6$ vs $84,68 \pm 5,0$ s; $P < 0,05$; figura 7).

Figura 7. Média da duração de todos os episódios de sono REM apresentados por ratos controles (CTL, n = 9, 94 episódios) e ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente por 10 dias (HCI, n = 12, 123 episódios) em um período de 3 horas de registros. * $P < 0,05$ – diferente em relação ao grupo CTL.

A figura 8 mostra hipnogramas do período de 3 horas de registros do ciclo sono-vigília durante a fase clara do ciclo claro/escuro de um rato representativo do grupo CTL e de um rato representativo do grupo HCI.

Figura 8. Hipnogramas do período de 3 horas (10800 s) de registros do ciclo sono-vigília durante o dia (das 12:00 h às 15:00 h) de um rato representativo do grupo controle (CTL) e de um rato representativo do grupo submetido ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI). Note a presença de episódios de sono REM mais longos no animal submetido à HCI em relação animal controle (↑).

4.3 Parâmetros cardiovasculares durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília de ratos dos grupos CTL e HCI

4.3.1 Parâmetros cardiovasculares nos ratos acordados

Os parâmetros cardiovasculares PAS, PAD, PAM e FC foram avaliados durante as diferentes fases do sono-vigília a partir das 3 horas de registros também utilizadas para avaliação dos parâmetros referentes à qualidade do sono natural. Quando avaliados somente durante a fase de vigília do ciclo sono-vigília, os ratos do grupo HCI apresentaram valores significativamente maiores de PAS ($142,6 \pm 2,1$ vs $127,6 \pm 2,2$ mmHg; $P < 0,001$; figura 9, painel A), PAD ($101,8 \pm 1,7$ vs $89,7 \pm 1,7$ mmHg; $P < 0,001$; figura 9, painel B), PAM ($119,6 \pm 1,8$ vs $106,1 \pm 1,8$ mmHg; $P < 0,001$; figura 9, painel C) e FC ($404,3 \pm 5,7$ vs $374,1 \pm 8,1$ bpm; $P < 0,01$; figura 9, painel D) em relação aos animais do grupo CTL.

Figura 9. Média dos valores médios de pressão arterial sistólica (PAS, A), pressão arterial diastólica (PAD, B), pressão arterial média (PAM, C) e frequência cardíaca (FC, D) apresentados somente durante as fases acordadas de um registro de 3 horas do ciclo sono-vigília de ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, n = 12). * $P < 0,01$ – diferente em relação ao grupo CTL.

4.3.2 Parâmetros cardiovasculares nos ratos durante o sono NREM

Ao avaliarmos os parâmetros cardiovasculares somente durante as fases de sono NREM do ciclo sono-vigília, observamos que os ratos do grupo HCI também apresentaram valores significativamente maiores de PAS ($143,3 \pm 2,0$ vs $129,1 \pm 2,4$ mmHg; $P < 0,001$; figura 10, painel A), PAD ($103,2 \pm 1,8$ vs $91,0 \pm 1,9$ mmHg; $P < 0,001$; figura 10, painel B), PAM ($120,7 \pm 1,8$ vs $107,3 \pm 2,0$ mmHg; $P < 0,001$; figura 10, painel C) e FC ($383,4 \pm 6,2$ vs $358,4 \pm 9,4$ bpm; $P < 0,05$; figura 10, painel D) em relação aos animais do grupo CTL.

Figura 90. Média dos valores médios de pressão arterial sistólica (PAS, A), pressão arterial diastólica (PAD, B), pressão arterial média (PAM, C) e frequência cardíaca (FC, D) apresentados somente durante as fases de sono NREM de um registro de 3 horas do ciclo sono-vigília de ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, n = 12). * P < 0,05 – diferente em relação ao grupo CTL.

4.3.3 Parâmetros cardiovasculares nos ratos durante o sono REM

Os parâmetros cardiovasculares também foram avaliados durante as fases de sono REM do ciclo sono-vigília. Assim como durante a fase acordada e de sono NREM, observamos que na fase REM os ratos do grupo HCI apresentaram níveis significativamente mais elevados de PAS ($148,6 \pm 2,2$ vs $134,0 \pm 2,4$ mmHg; $P < 0,001$; figura 11, painel A), PAD ($108,8 \pm 1,6$ vs $95,0 \pm 2,3$ mmHg; $P < 0,001$; figura 11, painel B), PAM ($126,4 \pm 1,7$ vs $111,8 \pm 2,2$ mmHg; $P < 0,001$; figura 11, painel C) e FC ($384,4 \pm 5,0$ vs $360,9 \pm 7,9$ bpm; $P < 0,05$; figura 11, painel D) em relação aos animais do grupo CTL.

Figura 11. Média dos valores médios de pressão arterial sistólica (PAS, A), pressão arterial diastólica (PAD, B), pressão arterial média (PAM, C) e frequência cardíaca (FC, D) apresentados somente durante as fases de sono REM de um registro de 3 horas do ciclo sono-vigília de ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, n = 12). * P < 0,05 – diferente em relação ao grupo CTL.

4.3.4 Parâmetros cardiovasculares basais independentes da fase do ciclo sono-vigília

Além de avaliarmos os parâmetros cardiovasculares durante cada uma das diferentes fases do ciclo sono-vigília, analisamos também os valores de PAS, PAD, PAM e FC nos animais dos grupos CTL e HCI durante o tempo total de 3 horas de registro, independentemente da fase do ciclo. Os valores médios de 3 horas de registros de PAS ($145,0 \pm 1,8$ vs $129,3 \pm 2,2$ mmHg; $P < 0,001$; figura 12, painel A), PAD ($104,1 \pm 1,7$ vs $91,4 \pm 1,8$ mmHg; $P < 0,001$; figura 12, painel B), PAM ($121,9 \pm 1,7$ vs $107,7 \pm 1,9$ mmHg; $P < 0,001$; figura 12, painel C) e FC ($387,6 \pm 5,4$ vs $363,5 \pm 8,7$ bpm; $P < 0,001$; figura 12, painel D).

0,05; figura 12, painel D) foram significativamente maiores no grupo HCI em relação ao grupo CTL.

Figura 2. Média dos valores médios de pressão arterial sistólica (PAS, A), pressão arterial diastólica (PAD, B), pressão arterial média (PAM, C) e frequência cardíaca (FC, D) apresentados durante um registro de 3 horas independente da fase do ciclo sono-vigília de ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, n = 12). * P < 0,05 – diferente em relação ao grupo CTL.

4.3.5 Análises intragrupos dos parâmetros cardiovasculares durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília

Ao compararmos as médias da PAM entre as três fases do ciclo sono-vigília na situação CTL, verificamos que houve diferença significativa entre as fases (n = 9; F = 19,49; P < 0,0001). O pós-teste de Bonferroni indicou que não houve diferença significativa entre vigília (106,1 ± 1,9 mmHg) e NREM (107,3 ± 2,0 mmHg; t = 1,2; P > 0,05), porém a PAM foi maior em REM (111,8 ± 2,3 mmHg) do que na vigília (t =

5,9; $P < 0,05$) e do que em NREM ($t = 4,6$; $P < 0,05$) (figura 13). Para as mesmas comparações no grupo HCI, verificamos que houve diferença significativa entre as fases ($n = 12$; $F = 15,49$; $P < 0,0001$). O pós-teste indicou que não houve diferença significativa entre vigília ($118,0 \pm 2,5$ mmHg) e NREM ($118,7 \pm 2,5$ mmHg; $t = 0,55$; $P > 0,05$), porém a PAM foi maior em REM ($124,5 \pm 2,5$ mmHg) do que na vigília ($t = 5,07$; $P < 0,05$) e do que em NREM ($t = 4,5$; $P < 0,05$) (figura 13).

Figura 13. Média da pressão arterial média (PAM) de ratos controles (CTL, $n=9$) e ratos submetidos à HCI por 10 dias (HCI, $n=12$) durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília (vigília, NREM e REM). * $P < 0,05$; n.s. $P > 0,05$; ANOVA de uma via.

Ao compararmos as médias da FC entre as três fases do ciclo sono-vigília na situação CTL, verificamos que houve diferença significativa entre as fases ($n = 9$; $F = 25,10$; $P < 0,0001$). O pós-teste de Bonferroni indicou que a FC foi significativamente maior na vigília ($374,1 \pm 8,2$ bpm) do que em NREM ($358,4 \pm 9,5$ bpm; $t = 6,5$; $P < 0,05$) e do que em REM ($360,9 \pm 7,9$ bpm; $t = 5,5$), porém a FC não foi diferente em NREM quando comparado com REM ($t = 1,0$; $P > 0,05$) (figura 14). Para as mesmas comparações no grupo HCI, verificamos que houve diferença significativa entre as fases ($n = 12$; $F = 22,76$; $P < 0,0001$). O pós-teste indicou que houve diferença significativa

entre vigília ($402,2 \pm 5,3$ bpm) e NREM ($380,8 \pm 5,6$ bpm; $t = 5,99$; $P > 0,05$) e entre vigília e REM ($382,0 \pm 4,8$; $t = 5,6$; $P < 0,05$), porém não houve diferença entre NREM e REM ($t = 0,32$; $P > 0,05$) (figura 14).

Figura 104. Média da frequência cardíaca (FC) de ratos controles (CTL, $n=9$) e ratos submetidos à HCI por 10 dias (HCI, $n=12$) durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília (vigília, NREM e REM). * $P < 0,05$; n.s. $P > 0,05$; ANOVA de uma via.

4.4 Parâmetros respiratórios durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília

4.4.1 Parâmetros respiratórios nos ratos acordados

Os parâmetros respiratórios de f_R , V_T , e V_E foram avaliados durante as diferentes fases do sono-vigília a partir de pelo menos 2 episódios de cada fase do ciclo com mais de um minuto de duração. Quando avaliados somente durante a fase acordada do ciclo sono-vigília, os ratos do grupo HCI e do grupo CTL apresentaram valores semelhantes de f_R ($110,6 \pm 5,0$ vs $121,5 \pm 8,3$ cpm; figura 15, painel A), V_T ($7,0 \pm 0,3$ vs $6,7 \pm 0,3$ mL/kg; figura 15, painel B) e V_E ($792,6 \pm 62,7$ vs $847,4 \pm 99,6$ mL/kg/min; figura 15, painel C).

Figura 11. Média dos valores médios de frequência respiratória (fR, A), volume corrente (V_T , B) e volume minuto (V_E , C) apresentados somente durante a fase acordada do ciclo sono-vigília de ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCl, n = 11).

4.4.2 Parâmetros respiratórios nos ratos durante o sono NREM

Ao avaliarmos os parâmetros respiratórios somente durante a fase de sono NREM do ciclo sono-vigília, observamos que os ratos do grupo HCl apresentaram níveis significativamente mais elevados de V_T ($6,6 \pm 0,2$ vs $5,8 \pm 0,2$ mL/kg; $P < 0,05$; figura 16, painel B) do que os animais do grupo CTL. Entretanto, os grupos HCl e CTL apresentaram valores semelhantes de fR ($103,3 \pm 4,3$ vs $110,1 \pm 4,5$ cpm; figura 16, painel A) e V_E ($689,8 \pm 38,3$ vs $652,1 \pm 46,1$ mL/kg/min; figura 16, painel C).

Figura 12. Média dos valores médios de frequência respiratória (fR, A), volume corrente (V_T , B) e volume minuto (V_E , C) apresentados somente durante a fase de sono NREM do ciclo sono-vigília de ratos controles (CTL, n = 9) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCl, n = 11). * $P < 0,05$ – diferente em relação ao grupo CTL.

4.4.3 Parâmetros respiratórios nos ratos durante o sono REM

Os parâmetros respiratórios também foram avaliados durante a fase de sono REM do ciclo sono-vigília. Assim como durante a fase de sono NREM, observamos que na fase REM os ratos do grupo HCl e do grupo CTL apresentaram níveis semelhantes de fR ($142,4 \pm 3,5$ vs $153,9 \pm 4,7$ cpm; figura 17, painel A) e V_E ($915,0 \pm 32,8$ vs $827 \pm 47,4$ mL/kg/min; figura 17, painel C), porém os animais do grupo HCl apresentaram maior V_T ($6,4 \pm 0,2$ vs $5,3 \pm 0,2$ mL/kg; $P < 0,01$; figura 17, painel B) em relação aos animais controles.

Figura 13. Média dos valores médios de frequência respiratória (fR , A), volume corrente (V_T , B) e volume minuto (V_E , C) apresentados somente durante a fase de sono REM do ciclo sono-vigília de ratos controles (CTL, $n = 9$) e ratos submetidos ao protocolo de 10 dias de hipóxia crônica intermitente (HCI, $n = 11$). * $P < 0,01$ – diferente em relação ao grupo CTL.

4.5 Avaliação da atividade expiratória nas diferentes fases do ciclo sono-vigília

Investigamos se a HCI promove aumento da atividade expiratória ativa (*late-E*) nas diferentes fases do ciclo sono-vigília em grupos específicos de animais CTL e HCI. Todos os animais apresentaram, durante a fase de vigília ativa, segmentos dos registros contendo aumentos da atividade de ABD (expirações ativas) que ocorreram em períodos de aumento da amplitude de DIA e aumento da frequência ventilatória (figura 18), os quais apresentam características do cheirar exploratório. Vale ressaltar que esses segmentos foram mais frequentes e de maior amplitude nos animais HCI em relação aos animais CTL no período de 2 h de registros, ou seja, os animais HCI apresentaram, durante a vigília, eventos de expiração ativa por mais tempo do que os animais CTL

($1,21 \pm 0,36$ vs $0,26 \pm 0,12$ %; $P < 0,05$; figura 19). Não foram observadas expirações ativas nas fases NREM e REM do sono.

Figura 14. Registros da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e atividades dos músculos respiratórios diafragma (DIA) e abdominal oblíquo (ABD) nas fases de vigília ativa (i), NREM (ii) e REM (iii) do ciclo sono-vigília de um rato representativo do grupo CTL e de um rato representativo do grupo HCI. As setas (↑) indicam a presença de expirações ativas nos animais CTL e HCI apenas durante a vigília.

Figura 15. Porcentagem em relação ao tempo total de registros (2 h = 100%) em que ratos controle (CTL, n = 5) e ratos submetidos ao protocolo de hipóxia crônica intermitente (HCl, n = 6) apresentaram expirações ativas. * P < 0,05 – diferente em relação ao grupo CTL.

4.6 Parâmetros referentes às inspirações profundas (IPs)

Avaliamos as magnitudes das respostas hipotensoras (Δ PAM) e taquicárdicas (Δ FC) associadas a 48 episódios de inspirações profundas (IPs) no grupo CTL e 54 episódios no grupo HCl, bem como o intervalo temporal entre as IPs. Os animais do grupo HCl apresentaram maior magnitude de respostas hipotensoras ($-18 \pm 0,8$ vs $-14 \pm 0,6$ mmHg; P < 0,001; figura 20, painel A) e taquicárdicas ($28,4 \pm 1,8$ vs $21,8 \pm 1,1$ bpm; P < 0,05; figura 20, painel B) em relação ao grupo CTL, porém não houve diferença significativa no intervalo entre as ocorrências das IPs ($100,2 \pm 5,2$ vs $96,8 \pm 4,1$ s; figura 20, painel C).

Figura 16. Médias das magnitudes das respostas hipotensoras (A) e taquicárdicas (B) associadas a inspirações profundas (IPs) de ratos controles (CTL, 48 IPs) e ratos submetidos a 10 dias de protocolo de hipóxia crônica intermitente (HCl, 54 IPs) e dos intervalos temporais (CTL = 35 intervalos; HCl = 37 intervalos) entre IPs (C). * $P < 0,05$ – diferente em relação ao grupo CTL.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos a possível influência da exposição de ratos à 10 dias de HCI sobre o ciclo sono-vigília avaliado por um período de 3 horas de registro durante a fase clara do ciclo claro/escuro no dia seguinte ao término do protocolo experimental de HCI. Foram também analisados os parâmetros cardiovasculares e respiratórios durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília. Avaliamos alguns parâmetros relacionados ao ciclo sono-vigília dos ratos, sendo estes: a) o tempo necessário para o aparecimento do sono a partir do final da manipulação dos animais e início dos registros; b) o tempo total permanecido em cada uma das fases do ciclo sono-vigília ao longo de 3 horas; c) o número total de episódios de sono REM; d) a duração dos episódios de sono REM. Os parâmetros cardiovasculares PAS, PAD, PAM e FC em cada uma das fases do ciclo sono-vigília também foram avaliados, bem como durante o tempo total de registro de 3 horas. Avaliamos também os parâmetros respiratórios de fR, V_T e V_E nas diferentes fases do ciclo sono-vigília. Além disso, as inspirações profundas (IPs) que acontecem regularmente foram também analisadas no que diz respeito a sua frequência de ocorrência e a amplitude das repostas hipotensoras e taquicárdicas associadas.

5.1 Ganho de peso dos animais ao longo do protocolo de HCI

Diversos estudos prévios da literatura mostraram que os ratos, quando submetidos ao protocolo de hipóxia intermitente de 10 ou de 35 dias, apresentam menor ganho de peso em comparação com os ratos mantidos em normóxia (controle) (ZOCCAL *et al.*, 2007a; ZOCCAL *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2015). Em concordância com estes estudos, no presente trabalho estamos mostrando que os animais que foram submetidos ao protocolo de HCI por 10 dias não ganharam peso ao longo deste período. Este resultado sugere que importantes alterações metabólicas acontecem ao longo do

período de exposição a episódios repetitivos de hipóxia. Estudos existentes na literatura mostram aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona após a HCI devido à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos (ZOCCAL *et al.* 2007b; MA *et al.*, 2008), o que pode levar a importantes alterações metabólicas. De fato, Przygodda *et al.* (2016) mostraram que a hipóxia aguda intermitente por 8 horas induziu resistência à insulina e promoveu aumento da proteólise muscular. Além disso, a HCI tem sido associada a aumento persistente do estresse oxidativo (PRABHAKAR & KUMAR, 2004). Estes fatores podem explicar, pelo menos em parte, porque os animais submetidos à HCI não ganharam peso ao longo do protocolo. Importante destacar que, em um estudo de Zoccal (2006), ratos expostos à HCI por 5 semanas apresentaram menor ganho de peso ao longo de todo o protocolo em relação ao grupo controle, porém o consumo de ração foi semelhante entre os grupos, o que sugere que alterações metabólicas são responsáveis por esse menor ganho de peso.

5.2 Parâmetros referentes ao padrão de ciclo sono-vigília

Observamos neste trabalho que o protocolo de HCI por 10 dias não promoveu alterações significativas na maioria dos parâmetros avaliados referentes ao ciclo sono-vigília. O primeiro parâmetro referente ao ciclo sono-vigília de ratos avaliados no dia seguinte ao término do protocolo de HCI foi o tempo necessário para a ocorrência do primeiro episódio de sono NREM, a partir do término da manipulação dos animais para conexões de cânulas e fios elétricos utilizados para os registros. Este parâmetro foi utilizado como forma de quantificar a latência para o sono. Em nosso trabalho não observamos alteração no tempo para indução do sono, indicando que o protocolo de HCI 10 dias não altera essa característica do ciclo sono-vigília. Entretanto, estudo de Veasey *et al.* (2004) mostrou que camundongos expostos à hipóxia intermitente por

longo prazo (10 h diárias por 8 semanas), quando analisados 2 semanas após o término do protocolo hipóxia intermitente, apresentaram redução na latência para o sono em relação ao grupo controle, indicando uma maior propensão para dormir nesses animais, assim como ocorre em indivíduos com AOS. Embora a latência reduzida para o sono tenha sido reportada após a hipóxia intermitente em camundongos, o protocolo de HCI 10 dias utilizado em nossos experimentos não levou a alterações no tempo necessário para os ratos começarem a dormir.

Nossos resultados mostram também que no período de 3 horas de registros, os animais previamente submetidos à HCI não apresentaram alterações no tempo total que permaneceram nas fases do ciclo sono-vigília, ou seja, os animais do grupo HCI permaneceram em vigília, em sono NREM e em sono REM por períodos de tempo total semelhantes aqueles observados nos animais do grupo CTL. Além disso, os ratos dos grupos HCI e CTL não diferiram em relação ao número de episódios de sono REM. No entanto, a duração destes episódios apresentados ao longo das 3 horas de registros foi significativamente maior nos ratos HCI, sugerindo que estes animais estavam privados de sono REM durante o período correspondente ao protocolo de HCI. O trabalho de Veasey *et al.* (2004) mostrou que camundongos expostos à HCI por 8 semanas a episódios repetitivos de hipóxia ($FIO_2 = 0,09$, 1 episódio de 5 s a cada 90 s, por 10 horas do período claro do ciclo claro/escuro) apresentaram tempo total em sono (em período de 24 horas) maior que os animais controle quando ambos os grupos foram avaliados 2 semanas após o protocolo de hipóxia intermitente, sendo este aumento no tempo de sono total explicado por aumento no tempo tanto de sono NREM quanto de sono REM. Além disso, esses autores observaram que os camundongos, quando analisados imediatamente após o término do protocolo experimental de HCI (no dia seguinte), também apresentaram maior tempo total em sono, porém este aumento foi devido à um

aumento isolado do tempo de sono NREM, e não do tempo de sono REM. Para determinar se esse aumento no tempo total de sono observado no primeiro dia após o término de HCI era uma resposta rebote decorrente de privação do sono durante o protocolo de HCI, Veasey *et al.* (2004) avaliaram camundongos durante o último dia do protocolo de HCI e observaram que esses animais também apresentaram aumento do tempo de sono NREM durante o último dia de protocolo de HCI, sem alterações no tempo de sono REM, sugerindo que nas fases finais do protocolo de 8 semanas de HCI esses animais dormiram por mais tempo que os animais controle. Por outro lado, um estudo de Gozal *et al.* (2001) mostrou que ratos submetidos a um protocolo de 14 dias de HCI ($FIO_2 = 0,1$, em duas condições de hipóxia repetitiva: 1 episódio a cada 90 s ou a cada 30 min durante 12 horas de luz do ciclo claro/escuro e analisados em blocos de 2 h nos dias 1, 2, 7 e 14 do protocolo experimental) apresentaram perturbação significativa da arquitetura do sono durante o primeiro dia de exposição, porém tiveram padrões de sono normais nos dias seguintes do protocolo. Estes autores observaram redução do tempo total de sono e nos tempos de sono NREM e REM no dia 1 no período claro, porém um aumento do tempo de sono total, de sono NREM e de sono REM no dia 2 durante a fase clara e do tempo de sono NREM na fase escura, indicando recuperação compensatória do sono. Além disso, o mesmo estudo mostrou que nos dias 7 e 14 do protocolo de HCI, as características do sono retornaram a valores semelhantes aos basais, indicando que o protocolo de HCI utilizado não levou à privação ou fragmentação do sono além do primeiro dia de exposição. Os nossos estudos estão mostrando que ratos submetidos a HCI por 10 dias, quando avaliados no dia seguinte após o término deste protocolo, apesar de não apresentarem alterações na latência para o sono, no tempo total em cada fase do ciclo sono-vigília e no número de episódios de

sono REM, apresentam episódios REM mais longos que aqueles observados nos animais controles.

Importante destacar que os nossos registros de ciclo sono-vigília de 3 horas durante o dia não nos permite avaliar o padrão circadiano do ciclo sono-vigília a ponto de identificarmos alterações no comportamento global do ciclo sono-vigília nesses animais, uma vez que para isto precisaríamos de registros ao longo de 24 horas. Entretanto, nesse estudo, o nosso objetivo foi avaliar se, nessa janela temporal de 3 horas, as alterações cardiovasculares observadas nos ratos submetidos ao protocolo de HCI poderiam estar associadas a possíveis alterações no perfil de sono-vigília, as quais poderiam contribuir para as alterações cardiovasculares observadas nesse modelo experimental.

5.3 Parâmetros cardiovasculares durante cada fase do ciclo sono-vigília

Uma vez que as diferentes fases do ciclo sono-vigília são determinadas por mecanismos neurais distintos, elas poderiam modular de forma diferente os parâmetros cardiovasculares e respiratórios. Apesar de termos observado alterações apenas na duração dos episódios REM, verificamos que os parâmetros cardiovasculares sofreram alterações significativas em todas as fases do ciclo sono-vigília após a submissão dos ratos ao protocolo de HCI. Nossos resultados obtidos com 10 dias de HCI corroboram estudos anteriores mostrando que a exposição repetitiva à episódios de hipóxia promovem aumento mantido da pressão arterial com 35 dias de exposição à HCI (FLETCHER *et al.*, 1992; ZOCCAL *et al.*, 2007a; ZOCCAL *et al.*, 2007b) ou mesmo com 10 dias de exposição (ZOCCAL *et al.*, 2008). Níveis elevados de corticosterona e de noradrenalina plasmática foram demonstrados após exposição à hipóxia crônica intermitente (ZOCCAL *et al.*, 2007b), sugerindo aumento da atividade simpática nesse

modelo experimental. Estudos de Zoccal *et al.* (2008) e de Moraes *et al.* (2013) mostraram alterações no acoplamento entre as redes respiratórias e simpáticas no tronco cerebral e sugeriram que essas alterações poderiam estar envolvidas com a elevação da PA nesse modelo experimental de hipertensão neurogênica. Além disso, estudos não publicados de nosso laboratório mostraram que 3 dias de exposição ao protocolo de HCI foram suficientes para promover aumento significativo da PA e da FC. Desta forma, o aumento significativo dos níveis basais de PAS, PAM e FC (média de 3 horas de registros independente da fase do ciclo sono-vigília) verificado no presente trabalho (HCI 10 dias) pode ser explicado pelo aumento da atividade simpática e alterações no acoplamento simpático-respiratório em decorrência da ativação repetitiva do quimiorreflexo a cada episódio de hipóxia.

Acreditávamos inicialmente que os ratos submetidos à HCI poderiam apresentar parâmetros cardiovasculares aumentados durante a fase da vigília, período em que os ratos estão mais ativos explorando o ambiente ou exibindo comportamento de *grooming*. Ao analisarmos os parâmetros cardiovasculares durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília, observamos que os aumentos de PA e FC foram observados em todas as fases do ciclo. Os parâmetros PAS, PAD, PAM e FC durante a vigília, o sono NREM e o sono REM foram diferentes entre os grupos experimentais, sugerindo que a hipertensão observada ao analisar a média dos registros de pelo menos 3 horas não depende especificamente de uma das fases do ciclo sono-vigília. De fato, em comparação com o grupo CTL, no grupo HCI esses parâmetros cardiovasculares se apresentaram aumentados em todas as fases do ciclo sono-vigília quando avaliadas individualmente. Portanto, as alterações nos parâmetros cardiovasculares observadas após o protocolo de HCI são igualmente observadas em todas as fases do ciclo sono-vigília. O fato dos episódios de sono REM nos ratos HCI apresentarem uma duração

significativamente maior do que nos ratos controles não parece ser o fator determinante da hipertensão arterial observada nesses animais, pois a PA se apresentou elevada em todas as fases do ciclo sono-vigília, quando comparada aos registros obtidos nos animais do grupo controle.

Ao realizarmos análises intragrupos para compararmos os parâmetros cardiovasculares entre as fases do ciclo sono-vigília, observamos que os nossos resultados estão de acordo, pelo menos em parte, com os descritos por Junqueira e Krieger (1976), os quais descreveram que a PA de ratos no período de vigília imediatamente anterior ao sono e na fase NREM do sono se mantinha semelhante, porém mais estável durante o sono. Estudos de Junqueira e Krieger (1976) também mostraram aumentos significativos da PA durante o sono REM e que foram confirmadas posteriormente por estudos de Moreira e Krieger (1984) e Padilha e Krieger (1987).

Importante ressaltar também que variações circadianas da PA e FC em ratos foram descritas previamente (JANSSEN *et al.* 1991; BUUSE, 1994). Em geral, os valores de PA e a FC são menores durante o período compreendido entre as 6:00 h e as 18:00 h, ou seja, na fase clara do ciclo claro/escuro, e aumentam durante a fase escura (BUUSE, 1994). Tendo isso em vista, existe a possibilidade de que os ratos submetidos ao protocolo de 10 de HCI fiquem privados de sono durante as 8 horas da fase clara em que estão submetidos aos episódios repetitivos de hipóxia e que durmam mais de forma compensatória durante a fase escura. Isto poderia fazer com que esses animais apresentassem inversão do padrão circadiano dos parâmetros cardiovasculares do dia para a noite e explicaria níveis maiores de PA e FC no período de 3 horas de registros durante o dia nos animais submetidos à HCI em relação aos animais controle, os quais apresentam ciclo circadiano normal. Entretanto estudos adicionais com registros do

ciclo sono-vigília e dos parâmetros cardiovasculares ao longo de 24 horas serão necessários para avaliar esta hipótese.

5.4 Parâmetros respiratórios durante cada fase do ciclo sono-vigília

No presente trabalho avaliamos o papel da HCI 10 dias sobre os parâmetros respiratórios fR , V_T e V_E por meio da técnica de pletismografia de corpo inteiro, uma ferramenta não-invasiva para avaliação da atividade respiratória em ratos acordados e com livre movimentação. Essa abordagem experimental, apesar de não apresentar a mesma precisão de registros das atividades elétricas de nervos e músculos, permite avaliação do padrão respiratório fisiológico nos animais. Nossos resultados relacionados aos parâmetros respiratórios basais nas diferentes fases do ciclo sono-vigília estão parcialmente de acordo com os descritos por Zoccal (2010) e Souza *et al.* (2015), que não encontraram alterações nos parâmetros de fR , V_T e V_E nos ratos machos HCI 10 dias e nas ratas HCI 35 dias, respectivamente. Perim *et al.* (2015) também não encontraram diferenças na fR , V_T e V_E nos ratos submetidos à HCI por 10 dias. Entretanto, os nossos animais do grupo HCI apresentaram aumento significativo de V_T em relação ao grupo CTL nas fases NREM e REM do sono natural, porém nenhuma alteração nos parâmetros respiratórios durante a vigília. Estudos de Skelly *et al.* (2012) mostraram que ciclos alternados de hipóxia e normóxia (90 s cada ciclo; $FIO_2 = 0,05$ no ponto mais baixo; 8 h/dia por 9 dias) em ratos machos levam a aumentos significativos de V_T e V_E , porém não alteram a fR . Em nossos experimentos, a HCI 10 dias alterou o V_T nos ratos apenas durante o sono. Apesar de termos avaliado este parâmetro durante a vigília e de não termos obtido diferença estatística entre os grupos experimentais, durante a vigília os animais se encontram mais ativos e em movimentação, tornando o registro pletismográfico ventilatório mais irregular e instável, o que poderia tornar esse

método de análise inadequado para a avaliação dos parâmetros respiratórios durante a vigília.

5.5 Avaliação da atividade expiratória durante as diferentes fases do ciclo sono-vigília

Observamos que tanto os ratos CTL quando os ratos HCI apresentaram atividade expiratória ativa observada por meio de aumento da atividade dos músculos abdominais oblíquos durante as expirações. Estes eventos de expirações ativas aconteceram apenas durante a vigília e principalmente em períodos de aumento da frequência ventilatória devido aos animais estarem ativamente explorando o ambiente, não tendo esse comportamento respiratório sido observado durante das fases NREM e REM do sono. Esse fato nos permite sugerir que os episódios com aumento da frequência respiratória e das expirações ativas correspondem ao comportamento de cheirar exploratório. Entretanto, a exposição de ratos ao protocolo de 10 dias de HCI promoveu maior frequência de eventos de expiração ativa durante a vigília em um período de 2 horas de registros. Esse aumento da atividade expiratória nos animais HCI observado neste trabalho corrobora outros estudos do nosso laboratório que demonstraram alterações no padrão respiratório em ratos submetidos à HCI. Estudos de Zoccal *et al.* (2008) mostraram, por meio da preparação coração-tronco cerebral isolados, que ratos jovens submetidos à HCI por 10 dias apresentam aumento da atividade respiratória na fase final expiração. Além disso, estudos de Moraes *et al.* (2013) realizados em ratos acordados e com livre movimentação mostraram que os ratos HCI apresentam expiração ativa documentada por meio do aumento da atividade dos músculos abdominais. O mesmo estudo mostrou, utilizando a preparação coração-tronco cerebral isolados, que os ratos HCI apresentam aumento da atividade do nervo abdominal na fase final da

expiração, estando esse fenômeno relacionado a aumento da atividade do nervo simpático torácico nessa fase do ciclo respiratório. Esses resultados indicaram que a HCI promove alterações no acoplamento entre as redes respiratórias e simpáticas no bulbo. Esse fenômeno tem sido considerado uma explicação, pelo menos parcial, para a hipertensão arterial de origem neural, como é o caso dos animais submetidos à HCI (ZOCCAL *et al.* 2008; MORAES *et al.* 2012b, MORAES *et al.*, 2013). Embora no presente trabalho tenhamos observado aumento da atividade expiratória nos ratos HCI apenas em curtos períodos durante a vigília, documentamos também hipertensão arterial em todas as fases do ciclo sono-vigília nesses animais, sugerindo que o aumento da modulação respiratória sobre a atividade simpática nesse modelo experimental seja independente da fase do ciclo sono-vigília e que o mesmo não é o único fator determinante da hiperatividade simpática e da hipertensão arterial nesse modelo experimental.

5.6 Parâmetros referentes às IPs

O protocolo de HCI 10 dias não alterou a frequência de ocorrências da IPs nos animais dos grupos experimentais, porém promoveu aumento na magnitude das respostas hipotensoras e taquicárdicas associadas às IPs nos animais do grupo HCI em relação aos animais do grupo CTL. Isso implica que as IPs tiveram maior impacto nas respostas hemodinâmicas de queda da PA e aumento da FC nos animais submetidos ao protocolo e HCI 10 dias. Esses resultados corroboram os achados de outro estudo de nosso laboratório no qual ratas submetidas ao protocolo de 35 dias de HCI apresentaram uma queda maior da PAM associadas às IPs (SOUZA *et al.*, 2015). De acordo com estudos de Olsen *et al.* (1985) e Machado *et al.* (1992), as respostas cardiovasculares associadas às IPs que acontecem regularmente podem ser explicadas por efeitos

mecânicos e hemodinâmicos, haja vista que as IPs podem reduzir a pressão intratorácica, tornando a pressão intrapleural mais negativa e aumentando o retorno venoso para o coração, o que por sua vez pode disparar reflexos cardiopulmonares. As alterações nas respostas hemodinâmicas associadas às IPs podem também ser decorrentes de alterações em mecanismos centrais de controle. Como mencionado anteriormente, a HCI promove alterações na atividade das redes neurais que controlam a respiração e a modulação destas sobre a atividade simpática (ZOCCAL *et al.* 2008; MORAES *et al.* 2012b, MORAES *et al.*, 2013). Em ciclos respiratórios regulares, as redes neurais levam ao aumento da atividade simpática durante a inspiração. Entretanto, durante as IPs, outros neurônios da rede respiratória provavelmente estão envolvidos, o que poderia resultar em uma modulação respiratória da atividade simpática diferente, ou seja, promovendo redução da atividade simpática e resposta hipotensora ao invés de hipertensora e uma resposta taquicardica reflexa devido à desativação dos barorreceptores arteriais em função da hipotensão arterial.

6. CONCLUSÕES

Ratos submetidos à HCI por 10 dias e avaliados no dia seguinte ao término deste protocolo experimental não apresentaram alterações na latência para o aparecimento do sono, no tempo total nas fases do ciclo sono-vigília e no número de episódios REM na janela temporal de 3 horas nas quais os parâmetros cardiovasculares foram registrados. No entanto, os ratos submetidos à HCI apresentaram episódios REM mais longos e aumento significativo da PA e da FC em todas as fases do ciclo sono-vigília em relação aos animais controles. Além disso, os animais submetidos à HCI apresentam aumento do volume corrente de ar durante o sono NREM e REM, maior ocorrência de episódios com expirações ativas e aumento na magnitude das respostas hemodinâmicas associadas às inspirações profundas. O fato dos episódios de sono REM nos ratos submetidos à HCI apresentarem uma duração maior do que no grupo CTL não parece ser o fator determinante das alterações cardiovasculares observadas nesses animais, pois a PA e a FC se apresentaram elevadas em todas as fases do ciclo sono-vigília. Isso implica que o aumento da atividade simpática, as alterações no acoplamento simpático-respiratório e as alterações cardiovasculares são provavelmente decorrentes dos episódios intermitentes de hipóxia que acontecem ao longo desse protocolo e que resultam na ativação intermitente dos quimiorreceptores periféricos.

7. REFERÊNCIAS

- ACCORSI-MENDONÇA, D. *et al.* Synaptic profile of nucleus tractus solitarius neurons involved with the peripheral chemoreflex pathways. *Neuroscience*, [s.l.], v. 197, p.107-120, dez. 2011.
- ACCORSI-MENDONÇA, D.; MACHADO, B. H. Synaptic transmission of baro- and chemoreceptors afferents in the NTS second order neurons. *Autonomic Neuroscience*, [s.l.], v. 175, n. 1-2, p.3-8, abr. 2013.
- ACCORSI-MENDONÇA, D. *et al.* Pacemaking Property of RVLM Presympathetic Neurons. *Frontiers in Physiology*, [s.l.], v. 7, 424, 22 set. 2016.
- ACHERMANN, P. The Two-Process Model of Sleep Regulation Revisited. *Aviat Space Environ Med*, [s.l.], v. 75, n. 3, p. A37-A43, 2004.
- ALÓE, F.; AZEVEDO, A. P.; HASAN, R. Mecanismos do ciclo sono-vigília. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, [s.l.], v. 27, n. 1, p.33-39, maio 2005.
- BARROS, R. C. H. *et al.* Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Autonomic Neuroscience*, [s.l.], v. 97, n. 2, p.110-115, maio 2002.
- BARTLETT, D.; TENNEY, S. M. Control of breathing in experimental anemia. *Respiration Physiology*, [s.l.], v. 10, n. 3, p.384-395, out. 1970.
- BARTLETT, D. Origin and regulation of spontaneous deep breaths. *Respiration Physiology*, [s.l.], v. 12, n. 2, p.230-238, jun. 1971.
- BENDIXEN, H. H.; SMITH, G. M.; MEAD, J. Pattern of ventilation in young adults. *J. Appl. Physiol.*, [s.l.], v. 19, n. 2, p.195-198, 1 mar. 1964.
- BORBÉLY, A. A. A two-process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol*, [s.l.], v. 1, p.195-204, 1982.
- BRAGA, V. A.; SORIANO, R. N.; MACHADO, B. H. Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Experimental Physiology*, [s.l.], v. 91, n. 6, p.1025-1031, nov. 2006.
- BUUSE, M. v. D. Circadian rhythms of blood pressure, heart rate, and locomotor activity in spontaneously hypertensive rats as measured with radio-telemetry. *Physiology & Behavior*, [s.l.], v. 55, n. 4, p.783-787, abr. 1994.
- CAPLES, S. M.; GAMI, A. S.; SOMERS, V. K. Obstructive Sleep Apnea. *Annals of Internal Medicine*, [s.l.], v. 142, n. 3, p.187-197, 1 fev. 2005.

CARSKADON, M. A.; DEMENT, W. C. Normal Human Sleep: An Overview. In: KRYGER, Meir H.; ROTH, Thomas; DEMENT, William C. Principles and practice of sleep medicine. 5. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2011. Cap. 2. p. 16-26.

COSTA, K. M. *et al.* Evolution and physiology of neural oxygen sensing. *Frontiers in Physiology*, [s.l.], v. 5, p.1-16, 12 ago. 2014.

DAAN, S.; BEERSMA, D. G. M. S.; BORBELY, A. A. Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *Am J Physiol*, [s.l.], v. 246, p.161-183, 1984.

DEEGAN, P. C.; MCNICHOLAS, W. T. Pathophysiology of obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*, [s.l.], v. 8, n. 7, p.1161-1178, 1 jul. 1995.

DEMPSEY, J. A. *et al.* Pathophysiology of Sleep Apnea. *Physiological Reviews*, [s.l.], v. 90, n. 1, p.47-112, 1 jan. 2010.

DIAS-DOS-SANTOS, J. R.; MACHADO, B. H. Cardiovascular and respiratory changes during slow-wave sleep in rats are associated with electrocorticogram desynchronization. *Braz J Med Biol Res*, [s.l.], v. 30, n. 11, p.1371-1376, nov. 1997.

DRORBAUG, J. E.; FENN, W. O. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*, [s.l.], v. 16, n. 1, p.81-87, 01 jul. 1955.

FLETCHER, E. C. *et al.* Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension*, [s.l.], v. 19, n. 61, p.555-561, 1 jun. 1992.

GOZAL, D.; DANIEL, J. M.; DOHANICH, G. P. Behavioral and Anatomical Correlates of Chronic Episodic Hypoxia during Sleep in the Rat. *Journal of Neuroscience*, [s.l.], v. 21, p.2442-2450, 2001.

GREENSTONE, M.; HACK, M. Obstructive sleep apnoea. *Bmj*, [s.l.], v. 348, n. 1711, p. g3745-g3745, 17 jun. 2014.

GUYENET, P. G. Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. *Respiration Physiology*, [s.l.], v. 121, n. 2-3, p.147-162, jul. 2000.

HORNYAK, M. *et al.* Sympathetic muscle nerve activity during sleep in man. *Brain*, [s.l.], v. 114, n. 3, p.1281-1295, 1 jun. 1991.

JANSSEN, B. J. A.; TYSEN, C. M.; STRUYKER-BOUDIER, H. A. J. Modification of Circadian Blood Pressure and Heart Rate Variability by Five Different Antihypertensive Agents in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, [s.l.], v. 17, n. 3, p.494-503, mar. 1991.

JOUVET, M. Neurophysiology of the states of sleep. *Physiological Reviews*, [s.l.], v. 47, p.117-177, 1967.

JUNQUEIRA, F. L. Jr; KRIEGER, E. M. Blood pressure and sleep in the rat in normotension and in neurogenic hypertension. *J Physiol*, [s.l.], v. 259, p.725-735, 1976.

KHATRI, B. M.; FREIS, E. D. Hemodynamic changes during sleep. *J Appl Physiol*, [s.l.], v. 22, p.867-873, 1967.

KOSHIYA, N.; GUYENET, P. G. NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.*, [s.l.], v. 270, n. 6, p. R1273-R1278, jun. 1996.

LONGHURST, J. Neural regulation of the cardiovascular system. In: SQUIRE, L.; BERG, D.; BLOOM, F.; SPITZER, N.; DU LAC, S.; GOSH, S. *Fundamental Neuroscience*. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2008. Cap. 36. p. 829-852.

LOUIS, R. P.; LEE, J.; STEPHENSON, R. Design and validation of a computer-based sleep-scoring algorithm. *Journal of Neuroscience Methods*, [s.l.], v. 133, n. 1-2, p.71-80, fev. 2004.

MA, S. *et al.* Chronic intermittent hypoxia sensitizes acute hypothalamic–pituitary–adrenal stress reactivity and Fos induction in the rat locus coeruleus in response to subsequent immobilization stress. *Neuroscience*, [s.l.], v. 154, n. 4, p.1639-1647, jul. 2008.

MACHADO, B. H. MAUAD, H.; GLASS, M. L. Transient changes in blood pressure during spontaneous deep breaths in rats with sinoaortic deafferentation. *J. Appl. Physiol.*, [s.l.], v. 72, n. 3, p.920-924, 1 mar. 1992.

MACHADO, B. H. Neurotransmission of the Cardiovascular Reflexes in the Nucleus Tractus Solitarii of Awake Rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, [s.l.], v. 940, n. 1, p.179-196, 25 jan. 2001.

MAUAD, H.; GLASS, M. L.; MACHADO, B. H. Effect of selective denervation of baroreceptors on pulmonary ventilation and arterial pressure lability in rat. *Hypertension*, [s.l.], v. 19, n. 2, p.II182-II182, 1 fev. 1992.

MORAES, D. J. A.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Sympathoexcitation during chemoreflex active expiration is mediated by L-glutamate in the RVLM/Botzinger complex of rats. *Journal of Neurophysiology*, [s.l.], v. 108, n. 2, p.610-623, 25 abr. 2012a.

MORAES, D. J. A.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Medullary Respiratory Network Drives Sympathetic Overactivity and Hypertension in Rats Submitted to Chronic Intermittent Hypoxia. *Hypertension*, [s.l.], v. 60, n. 6, p.1374-1380, 29 out. 2012b.

MORAES, D. J. A. *et al.* Electrophysiological Properties of Rostral Ventrolateral Medulla Presympathetic Neurons Modulated by the Respiratory Network in Rats. *Journal of Neuroscience*, [s.l.], v. 33, n. 49, p.19223-19237, 4 dez. 2013.

MOREIRA, R. D.; KRIEGER, E. M. Alteration of the Pattern of Pressure Changes During Sleep of Rats with Overactivity of the Renin-Angiotensin System. *Clinical and*

Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice, [s.l.], v. 6, n. 10-11, p.2123-2126, jan. 1984.

MURALI, N. S.; SVATIKOVA, A.; SOMERS, V. K. Cardiovascular physiology and sleep. *Frontiers In Bioscience*, [s.l.], v. 8, n. 6, p.636-652, 2003.

NAKAZATO, T. *et al.* Nocturnal variation in human sympathetic baroreflex sensitivity. *Journal of The Autonomic Nervous System*, [s.l.], v. 70, n. 1-2, p.32-37, maio 1998.

NATTIE, E. E.; LI, A. CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. *Journal of Applied Physiology*, [s.l.], v. 92, n. 5, p.2119-2130, 4 jan. 2002.

NUNEZ-ABADES, P. A.; PORTILLO, F.; PÁSARO, R. Characterisation of afferent projections to the nucleus ambiguus of the rat by means of fluorescent double labelling. *J. Anat.*, [s.l.], v. 172, p.1-15, 1990.

OLSEN, C. O. *et al.* Diminished stroke volume during inspiration: a reverse thoracic pump. *Circulation*, [s.l.], v. 72, n. 3, p.668-679, 1 set. 1985.

OPPENHEIMER, S. M. *et al.* Cardiovascular effects of human insular cortex stimulation. *Neurology*, [s.l.], v. 42, p.1727-1732, 1992.

PADILHA, J. U.; KRIEGER, E. M. Alteration in Baroreceptor Function in Rats Produces Typical Pressure Changes During Sleep. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, New York, v. 10, p. S194-S198, 1987.

PARK, J. G.; RAMAR, K.; OLSON, E. J. Updates on Definition, Consequences, and Management of Obstructive Sleep Apnea. *Mayo Clinic Proceedings*, [s.l.], v. 86, n. 6, p.549-555, jun. 2011.

PERIM, R. R.; BONAGAMBA, L. G. H.; MACHADO, B. H. Cardiovascular and respiratory outcome of preconditioned rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Experimental Physiology*, [s.l.], v. 100, n. 9, p.1008-1017, set. 2015.

PRABHAKAR, N. R.; KUMAR, G. K. Oxidative stress in the systemic and cellular responses to intermittent hypoxia. *Biological Chemistry*, [s.l.], v. 385, n. 3-4, p.217-221, 13 jan. 2004.

PRZYGODDA, F. *et al.* Acute intermittent hypoxia in rats activates muscle proteolytic pathways through a glucocorticoid-dependent mechanism. *Journal of Applied Physiology*, [s.l.], v. 122, n. 5, p.1114-1124, 8 dez. 2016.

REMMERS, J. E. Control of breathing during sleep. In: HORNBEIN, T. R. (Ed.). *Regulations of Respiration. Part II*. New York: Marcel Dekker, 1981. p. 1197-1249.

REYNOLDS, L. B., Jr. Characteristics of an inspiration-augmenting reflex in anesthetized cats. *J. Appl. Physiol.*, [s.l.], v. 17, n. 4, p.683-688, 1 jul. 1962.

SAPER, C. B. *et al.* Homeostatic, circadian, and emotional regulation of sleep. *The Journal of Comparative Neurology*, [s.l.], v. 493, n. 1, p.92-98, 2005.

SAYK, F. *et al.* To Dip or Not to Dip: On the Physiology of Blood Pressure Decrease During Nocturnal Sleep in Healthy Humans. *Hypertension*, [s.l.], v. 49, n. 5, p.1070-1076, 12 mar. 2007.

SKELLY, J. R. *et al.* Tempol Ameliorates Pharyngeal Dilator Muscle Dysfunction in a Rodent Model of Chronic Intermittent Hypoxia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, [s.l.], v. 46, n. 2, p.139-148, fev. 2012.

SOMERS, V. K. *et al.* Sympathetic-Nerve Activity during Sleep in Normal Subjects. *New England Journal of Medicine*, [s.l.], v. 328, n. 5, p.303-307, 4 fev. 1993.

SOMERS, V. K. *et al.* Sleep Apnea and Cardiovascular Disease. *Circulation*, [s.l.], v. 118, n. 10, p.1080-1111, 18 ago. 2008.

SOUZA, G. M. P. R. *et al.* Cardiovascular and respiratory responses to chronic intermittent hypoxia in adult female rats. *Experimental Physiology*, [s.l.], v. 100, n. 3, p.249-258, 28 jan. 2015.

STAESSEN, J. A. *et al.* Nocturnal Blood Pressure Fall on Ambulatory Monitoring in a Large International Database. *Hypertension*, [s.l.], v. 29, p.30-39, 1997.

STEPHENSON, R. *et al.* Sleep-Wake Behavior in the Rat. *Journal of Biological Rhythms*, [s.l.], v. 27, n. 6, p.490-501, dez. 2012.

VEASEY, S. C. *et al.* Long-term Intermittent Hypoxia in Mice: Protracted Hypersomnolence with Oxidative Injury to Sleep-Wake Brain Regions. *Sleep*, [s.l.], v. 27, n. 2, p.194-201, mar. 2004.

ZHANG, Z.; OPPENHEIMER, S. M. Characterization, distribution and lateralization of baroreceptor-related neurons in the rat insular cortex. *Brain Research*, [s.l.], v. 760, n. 1-2, p.243-250, jun. 1997.

ZOCCAL, D. B. Função cardiovascular de ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente. 2006. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

ZOCCAL, D. B. *et al.* Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Experimental Physiology*, [s.l.], v. 92, n. 1, p.79-85, 1 jan. 2007a.

ZOCCAL, D. B. *et al.* Plasma corticosterone levels is elevated in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Autonomic Neuroscience*, [s.l.], v. 134, n. 1-2, p.115-117, jul. 2007b.

ZOCCAL, D. B. *et al.* Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *The Journal of Physiology*, [s.l.], v. 586, n. 13, p.3253-3265, 28 jun. 2008.

ZOCCAL, D. B. *et al.* Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Experimental Physiology*, [s.l.], v. 94, n. 9, p.972-983, 14 ago. 2009a.

ZOCCAL, D. B.; PATON, J. F. R.; MACHADO, B. H. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, [s.l.], v. 36, n. 12, p.1188-1196, dez. 2009b.

ZOCCAL, D. B. Alterações no acoplamento entre as atividades simpática e respiratória em ratos jovens submetidos à hipóxia crônica intermitente. 2010. 249 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Coupling between Respiratory and Sympathetic Activities as a Novel Mechanism Underpinning Neurogenic Hypertension. *Curr Hypertens Rep*, [s.l.], v. 13, n. 3, p.229-236, 30 mar. 2011.

YANG, M. C. K.; HURSCH, C. J. The Use of a Semi-Markov Model for Describing Sleep Patterns. *Biometrics*, [s.l.], v. 29, n. 4, p.667-676, dez. 1973.

ZUNG, W. W. K. *et al.* Computer simulation of sleep EEG patterns with a Markov chain model. In: WORTIS, Joseph. *Recent Adv Biol Psychiatry*. Boston: Springer, 1965. Cap. 27. p. 335-355.