

## **Introdução**

---

As doenças isquêmicas do coração e cérebro representam a principal causa de morte no Brasil (Chor et al., 1995) e no mundo ocidental. São doenças de evolução crônica, de amplo impacto sobre a saúde individual e coletiva, que têm a aterosclerose como o seu substrato fisiopatológico fundamental. A aterosclerose é uma doença de etiologia multifatorial e de fisiopatologia complexa. Os fatores de risco clássicos, como a história familiar, a hipercolesterolemia, o diabetes mellitus, a hipertensão arterial sistêmica e o tabagismo, interagem para determinar o fenótipo final. A presença destes fatores de risco ajudam a predizer o risco individual do desenvolvimento desta doença, mas eles estão presentes em apenas cerca de 50 a 75% das doenças cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio (Mayo Clinic, 2003). Portanto, há necessidade de investigar-se outros fenômenos que podem participar nas vias mecânicas relacionadas à aterosclerose. Entre eles, um estímulo patológico que representa um potencial agravo ao aparelho cardiovascular é a alternância da hipóxia com a reoxigenação, que ocorre particularmente na síndrome da apnéia do sono (SAS).

A síndrome da apnéia do sono é uma doença prevalente da qual estes fenômenos participam de forma crônica, pois o indivíduo é a eles exposto diariamente, de forma cíclica, durante o sono. Já existem estudos experimentais vinculando a síndrome da apnéia do sono a mecanismos aterogênicos, conforme será detalhado adiante. Há também estudos epidemiológicos que ressaltam a associação positiva entre a SAS e a doença aterosclerótica.

O efeito do estímulo representado pela hipóxia seguida por reoxigenação sobre as vias inflamatórias que podem promover aterosclerose, aplicado de forma aguda a indivíduos que não apresentam a SAS é menos conhecido e é o escopo deste trabalho, pela importância que tem a padronização de novos modelos para o estudo da SAS. A seguir revisaremos alguns tópicos relacionados a este tema.

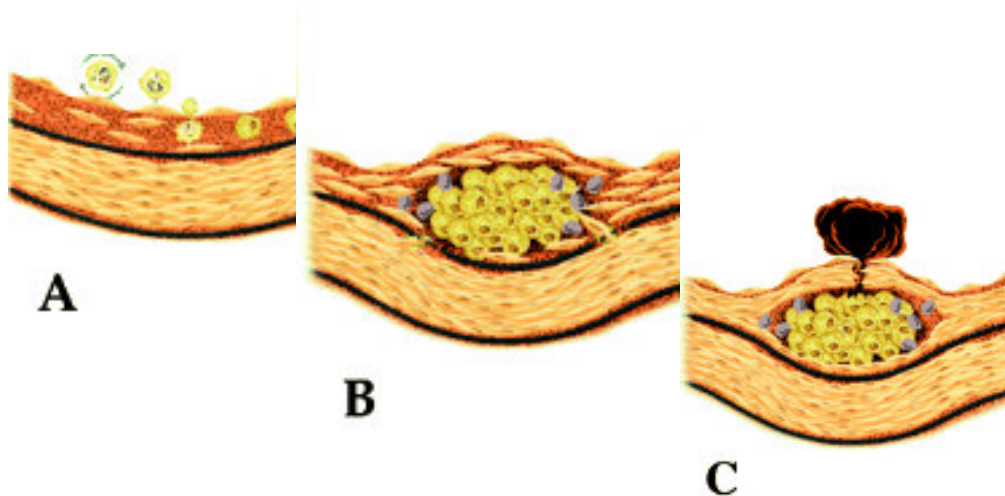
### **1.1. Aterosclerose**

Conforme assinalado acima, a aterosclerose é o substrato fisiopatológico fundamental das doenças isquêmicas do cérebro e do coração, que constituem a principal causa de mortalidade no Brasil e no mundo.

Anteriormente aceita como uma doença de base fisiopatológica fundamentalmente degenerativa, da qual os principais agressores eram as forças mecânicas e a alta concentração de lipoproteínas, nos últimos anos acumularam-se evidências de que a resposta inflamatória local e sistêmica participa de maneira significativa na gênese da aterosclerose, em todas as suas etapas (Ross, 1999; Libby, Ridker e Maseri, 2002). A figura 1 ilustra a contribuição da inflamação no desenvolvimento da placa aterosclerótica.

O endotélio é o órgão pivô das alterações inflamatórias que culminam com a instalação da doença aterosclerótica. Ele participa decisivamente na formação inicial da placa aterosclerótica, na sua progressão e nos

processos de instabilização da placa. A disfunção do endotélio é considerada uma condição *sine qua non* para a instalação da doença aterosclerótica.



**Figura 01:** Participação da inflamação em todos os estágios da aterosclerose.

**A:** Recrutamento de leucócitos para a lesão aterosclerótica incipiente. Na presença de inflamação, a camada de células endoteliais expressa moléculas de adesão, o que facilita a ligação de leucócitos. Citocinas pró-inflamatórias expressas dentro do ateroma facilitam a migração de leucócitos para a camada íntima.

**B:** Linfócitos T acompanham os macrófagos em direção à íntima. Estas células secretam citocinas e fatores de crescimento que promovem a migração e a proliferação de células de músculo liso vascular.

**C:** Os mediadores inflamatórios evocam a expressão de colagenases por células espumosas. Estas alterações na matriz extracelular levam ao enfraquecimento da capa fibrosa, deixando-a suscetível à ruptura. A ruptura da capa fibrosa leva à exposição do material altamente trombogênico no espaço subendotelial e deflagra as complicações agudas da doença aterosclerótica.

Extraído de Libby, *Circulation*, 2002.

## 1.1 Disfunção endotelial e estresse oxidativo

A disfunção endotelial é caracterizada pelo desequilíbrio entre as ações dos mediadores protetores do endotélio, responsáveis pela regulação do tônus vascular, da agregação plaquetária e da fibrinólise, e dos fatores lesivos ao endotélio, predominando a ação destes últimos. Dentre os fatores protetores do endotélio, destacam-se o óxido nítrico (NO), a bradicinina, a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), dentre outros (Mombouli e Vanhoutte, 1999).

A disfunção endotelial também é freqüentemente referida como piora no relaxamento dependente do endotélio, causado pela perda da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), muito embora a produção de outras substâncias vasoativas derivadas do endotélio, como a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), a endotelina (ET-1), a angiotensina II, e o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), possa também estar alterada.

O óxido nítrico (NO), radical livre em estado gasoso, é o principal responsável por manter o tônus vasomotor. Além disso, apresenta propriedades antiateroscleróticas, pois inibe a proliferação de células musculares lisas, a agregação plaquetária, a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDLc), dentre outras (Verma e Anderson, 2002). É formado a partir do aminoácido L-arginina, em uma reação catalisada por uma família de enzimas, das quais são conhecidas três isoformas: sintase do NO endotelial (eNOS), sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS) e

sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) (Nathan e Xie, 1994) . As duas primeiras são enzimas expressas de forma constitutiva em sítios endotelial e neuronal, respectivamente. A iNOS, por sua vez, pode ter sua expressão induzida em uma grande variedade de células, como leucócitos polimorfonucleares, células endoteliais e células de músculo liso vascular em resposta a estímulos pró-inflamatórios, pela ativação de citocinas, do lipopolissacarídeo bacteriano e de mediadores do estresse oxidativo (Channon et al., 2000). Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) são produtos da oxidação do NO e são seus principais metabólitos, podendo ser mensurados em determinados sistemas biológicos como sinalizadores de sua síntese (Fukuto e Wink, 1999). A concentração plasmática de nitrito, principalmente, correlaciona-se diretamente com a produção de óxido nítrico (Lauer, Kleinbongard e Kelm, 2002).

Dentre os fatores potencialmente lesivos ao endotélio, podem ser citadas as espécies reativas de oxigênio (EROx). São substâncias formadas a partir da série de reduções univalentes que sofre o oxigênio durante o processo de metabolismo celular. São exemplos de EROx o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Algumas destas substâncias, como o ânion superóxido e o radical hidroxila, são radicais livres, pois apresentam um elétron desemparelhado em sua última camada (Halliwell e Gutteridge, 1999). Isto lhes confere propriedade redutora - doação deste elétron - ou oxidante, de recebimento de um elétron de outra substância para se estabilizar. Estas substâncias interagem intimamente com o NO e são as principais moduladoras de sua

atividade biológica. Este desbalanço entre a ação das espécies reativas de oxigênio e os mecanismos de proteção endotelial caracteriza o estresse oxidativo vascular. O estresse oxidativo é um importante mecanismo promotor de disfunção endotelial por diminuir a biodisponibilidade do óxido nítrico (Verma e Anderson, 2002) .

Com a mudança de paradigma sobre as vias fisiopatológicas da aterosclerose, tem sido estudado o papel de algumas substâncias já sabidamente conhecidas por atuar na resposta inflamatória e/ou imune como marcadoras ou preditoras do risco aterosclerótico. São consideradas proteínas de fase aguda, pois têm sua concentração aumentada nos estados inflamatórios. Dentre estas substâncias, destacam-se a proteína C-reativa (PCR), a interleucina-8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa).

### **1.1.2. Marcadores de resposta inflamatória sistêmica**

#### **1.1.2.1. Proteína C-reativa (PCR)**

A PCR é uma glicoproteína sintetizada pelo fígado em resposta a qualquer tipo de estímulo inflamatório e é também um dos mediadores da resposta imune. É considerado um marcador inespecífico de resposta inflamatória, porém de alta sensibilidade. Nos últimos anos, seu papel como preditor de risco cardiovascular tem sido amplamente estudado. Na década de 80, de Beer et al. (1982) verificaram aumento dos níveis da PCR



na fase aguda do infarto do miocárdio, correlacionando-se com o pico de liberação enzimática. Tommasi et al. (1999) observaram que níveis séricos mais altos da PCR associaram-se a maior taxa de mortalidade na fase aguda do infarto agudo do miocárdio, mesmo em pacientes que não apresentavam disfunção ventricular ou isquemia residual.

A análise de soro estocado de participantes de grandes estudos epidemiológicos veio em seguida, mostrando que a PCR é um importante preditor de risco cardiovascular, inclusive em indivíduos aparentemente saudáveis no início da observação. Em diversos estudos, níveis mais altos de PCR correlacionaram-se com maior risco da ocorrência de infarto agudo do miocárdio (Ridker et al., 2000), acidente vascular cerebral (Rost et al., 2001) e morte súbita por causas cardíacas (Albert et al., 2002). Em um estudo, a PCR aumentada foi melhor preditor de risco cardiovascular que os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) (Ridker et al., 2002).

Alguns estudos ressaltam o papel da PCR como agente indutor de lesão direta à integridade endotelial, reforçando a idéia de que o papel da PCR na doença aterosclerótica não se limita à sinalização da existência de um processo inflamatório vascular. Já foi demonstrada inclusive a presença da PCR na intimidade da placa aterosclerótica (Reynolds e Vance, 1987). Pasceri et al. (2000) verificaram que a adição de PCR a células endoteliais de artérias coronárias promoveu incremento da expressão de moléculas de adesão-vascular cell adhesion mollecules (VCAM-1) e intercellular adhesion mollecules (ICAM-1) nestas células. Zwaka et al. (2001)

demonstraram que a adição da PCR a macrófagos em cultura promoveu maior captação de LDL por estas células, ou seja, facilitando a formação das células espumosas que compõem o ateroma.

#### **1.1.2.2. Interleucina 8 (IL-8)**

A citocina pró-inflamatória IL-8 pode ser produzida por vários tipos celulares, incluindo monócitos, linfócitos, neutrófilos e células endoteliais. A IL-8 atua principalmente como quimioatraente para neutrófilos e linfócitos; atuando também como estimuladora da migração de células endoteliais. A IL-8 foi demonstrada age também como fator de ativação e fator angiogênico (Koch et al., 1993) sendo produzida rapidamente após um estímulo inflamatório. A produção de IL-8 pode ser esperada em infecções, isquemia, trauma e em outros distúrbios de homeostase tecidual, desde que níveis de IL-1 e TNF- $\alpha$  estejam elevados (Baggiolini, 1992). Koch et al. (1993) demonstraram a expressão de IL-8 em macrófagos e células endoteliais de aortas aneurismáticas, reforçando a idéia de seu papel patogênico sobre os vasos. Foi verificada também sua expressão em tecido extraído por aterectomia após doença isquêmica sintomática. (Simonini et al., 2000).

### **1.1.3. Estímulos pró-inflamatórios potencialmente associados à aterosclerose**

Com a mudança do paradigma sobre a fisiopatologia da aterosclerose, tem sido também investigado o papel de alguns estados clínicos enquanto promotores e/ou facilitadores da aterogênese, agindo sobre a função endotelial. Foi demonstrado que estados infecciosos agudos, por exemplo, associaram -se a aumento do risco de infarto agudo do miocárdio nos dias que sucederam a sua instalação (Smeeth et al., 2004; Meier et al., 1998) sugerindo que esses eventos inflamatórios sistêmicos são capazes de atuar em tecidos ateroscleróticos favorecendo a sua instabilização.

A hipóxia e a injúria de reoxigenação constitui um outro estímulo capaz de desencadear estresse oxidativo (Tan et al., 1999) e inflamação endotelial. Este fenômeno é capaz de diminuir a biodisponibilidade dos agentes protetores do endotélio, como o óxido nítrico. A própria hipóxia, agindo isoladamente, tem sido ressaltada enquanto agente desencadeador de inflamação sobre o endotélio, como será descrito adiante. Uma situação clínica na qual participam estes fenômenos é a síndrome da apnéia do sono (SAS).

### **1.1.4. Síndrome da apnéia do sono**

A síndrome da apnéia do sono é uma doença caracterizada pela ocorrência de episódios de interrupção total (apnéia) ou parcial (hipopnéia) do fluxo aéreo, de forma cíclica, durante o sono. A interrupção da ventilação

acarreta hipoxemia e hipercapnia, que cessam quando o fluxo aéreo é restaurado em resposta ao despertar.

O critério definidor desta doença é a ocorrência de 5 ou mais episódios de apnéia e /ou hipopnéia por hora de sono, combinada à presença de sonolência diurna. Conceitua-se apnéia como a cessação do fluxo aéreo por um período igual ou superior a 10 segundos. Define-se hipopnéia como a redução superior a 50% do volume corrente inspiratório, ou como a redução do volume corrente inferior a 50% acompanhado por queda da saturação de oxigênio ou por sinal eletroencefalográfico de despertar (The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force , 1999).

A prevalência da SAS na população adulta é alta. Cerca de 4% dos homens e 2% das mulheres preenchem critério diagnóstico para esta doença (Young et al., 1993), baseado em amostra comunitária. Entre algumas populações ela é bem mais prevalente, como em pacientes com hipertensão arterial sistêmica (Hedner et al.,2006) e insuficiência cardíaca congestiva (Sin et al., 1999).

A síndrome da apnéia do sono pode ser classificada em três tipos: central, obstrutiva e mista, dependendo da ocorrência de esforço inspiratório em resposta à cessação do fluxo aéreo. Na apnéia do sono de origem central há uma abolição transitória do impulso neural para os músculos respiratórios, sem que ocorra esforço respiratório em resposta à interrupção do fluxo de ar. Ocorre tipicamente complicando a evolução da insuficiência cardíaca congestiva (Bradley e Floras, 2003). Na apnéia do

sono do tipo obstrutivo (SAOS) a cessação do fluxo aéreo deve-se ao colapso da musculatura das vias aéreas, principalmente na região da hipofaringe. Existe esforço inspiratório consequente à apnéia. A SAOS é bem mais prevalente e a grande maioria dos estudos sobre a SAS é focada neste tipo de apnéia do sono. Os fatores de risco para o desenvolvimento da SAOS incluem o sexo masculino (Block et al., 1979), a obesidade e características craniofaciais como micrognatia e macroglossia. O principal fator de risco modificável é a obesidade (Malhorta e White, 2002). A síndrome da apnéia do sono acomete cerca de 40% da população de obesos (Vgontzas et al., 1994).

O diagnóstico da SAOS deve ser suscitado em um indivíduo que apresenta ronco alto habitual, pausas respiratórias flagradas pelo parceiro e alterações neurocognitivas desencadeadas pelo sono não reparador (fadiga, alterações do humor, dificuldade de concentração). A confirmação diagnóstica é feita pela polissonografia noturna, que avalia o sono monitorando diversos parâmetros, incluindo eletroencefalograma (EEG), eletrocardiograma, movimentos respiratórios e saturação arterial de oxigênio (American Sleep Disorders Association, 1997). O índice de apnéia e hipopnéia (IAH) é dado pela média do número de apnéias e/ou hipopnéias ocorridas por hora de sono e é o índice utilizado para o diagnóstico da SAS e a classificação quanto à gravidade. A polissonografia noturna tem valor preditivo negativo de 95% (George, 1999).

#### **1.1.4.1. Síndrome da apnéia do sono e doença cardiovascular**

Durante as últimas décadas tem sido cada vez mais ressaltado o papel deletério da SAOS sobre a saúde individual, constituindo um novo fator de risco cardiovascular.

Vários estudos experimentais (Brooks et al., 1997; Fletcher, 2000) clínicos (Becker et al., 2003; Wilcox et al., 1993) e epidemiológicos (Nieto et al., 2000; Peppard et al., 2000) ressaltaram o papel da SAOS como promotora de hipertensão arterial sistêmica. Atualmente, a SAOS é reconhecida como causa secundária de hipertensão arterial sistêmica independente da presença de variáveis potencialmente confundidoras, como a idade ou o índice de massa corpórea (Chobanian et al., 2003).

A síndrome da apnéia do sono é ainda promotora de alterações do metabolismo da glicose, também independente de fatores como a obesidade. A presença da síndrome da apnéia do sono promove aumento da resistência à insulina (Ip et al., 2002) e o seu tratamento melhora esta alteração (Brooks et al., 1994).

Além dos aspectos supracitados, acumulam-se evidências de que a SAOS cursa com disfunção endotelial, aumento do estresse oxidativo e aumento da atividade inflamatória sistêmica, caracterizando um estado pró-aterosclerótico e pró-trombótico primário não vinculado aos fatores de risco principais (Bradley e Floras, 2003). Kato et al. (2000) investigaram a função endotelial pela da vasodilatação dependente e não dependente do endotélio de pacientes acometidos pela SAOS e livres de outras doenças que

comumente a acompanham, como hipertensão arterial sistêmica e obesidade. Os autores verificaram que a vasodilatação dependente do endotélio estava significativamente deprimida em portadores de SAOS em relação aos controles, caracterizando um estado funcional que é considerado marcador precoce de aterosclerose e preditor de eventos cardiovasculares ateroscleróticos.

Pacientes portadores da SAOS apresentaram níveis mais baixos de nitrato e nitrito em comparação aos seus controles, conforme demonstrado por Schulz et al (2000). Os níveis de nitrato e nitrito aumentaram após o tratamento com o aparelho de CPAP (Continuous Positive Airway Pressure), que abole os episódios de apnéia ao aplicar ar comprimido sob pressão positiva através de máscara firmemente aderida ao nariz ou boca, evitando assim a ocorrência de hipoxemia e hipercapnia.

Existem evidências de que a SAOS cursa com aumento do estresse oxidativo vascular (Prabhakar, 2002). Schulz et al. (2000b) verificaram aumento da liberação do ânion superóxido por células polimorfonucleares de pacientes acometidos pela SAOS em relação a seus controles, que apresentavam o mesmo espectro de morbidade cardiovascular. O tratamento com CPAP foi efetivo em quase normalizar os valores de superóxido.

Em relação a marcadores de inflamação, Yokoe et al. (2003) verificaram que pacientes acometidos pela síndrome da apnéia do sono apresentam níveis séricos de proteína C-reativa (PCR) e de interleucina 6

(IL-6) mais altos que seus controles, pacientes obesos sem apnéia do sono. Os níveis de PCR foram muito maiores em pacientes com SAOS ( $0,21 \pm 0,02$  mg/dl versus  $0,07 \pm 0,01$  mg/dl), variando em função da sua gravidade. Os níveis de IL-6 também foram bem mais altos em pacientes com apnéia moderada a grave ( $1,20 \pm 0,15$  pg/ml versus  $0,44 \pm 0,07$  pg/ml) em relação aos controles. A diferença persistiu mesmo após ajuste para o IMC. Após tratamento durante um mês com CPAP, houve importante decréscimo dos níveis de interleucina-6 e PCR. Mesmo em crianças e adolescentes portadoras da SAOS e que não apresentavam as comorbidades habituais, como hipertensão arterial, os níveis da PCR encontraram-se aumentados em relação aos controles (Larkin et al., 2005) e sofreram queda após a realização da adenotonsilectomia, tratamento eficaz para a SAOS nesta situação (Kheirandish-Gozal et al., 2006).

Vários outros estudos têm consistentemente ressaltado a associação da SAOS com o aumento dos níveis séricos de marcadores inflamatórios (Minoguchi et al., 2004; Ohga et al., 2003)

Em nosso grupo, foi verificado o aumento da espessura da camada íntima-média em pacientes que sofrem da SAOS mas que não apresentam os clássicos fatores de risco ateroscleróticos, ou seja, uma manifestação precoce da doença aterosclerótica. Tais alterações foram revertidas com o uso do CPAP (Drager et al., 2007).

Recente estudo de coorte (Yaggi et al., 2005) mostrou de que a presença da SAOS associa-se a aumento do risco de acidente vascular



cerebral (AVC) e de morte por todas as causas, quando comparado ao risco dos indivíduos não acometidos pela SAOS. O risco aumentado manteve-se mesmo após ajuste para fatores de risco como idade, sexo, tabagismo, presença de diabetes mellitus e inclusive hipertensão arterial sistêmica.

Todas as alterações inflamatórias que acompanham a SAOS, descritas acima, caracterizam um estado que é crônico e que depende em grau variado dos três elementos fisiopatológicos fundamentais da SAOS, que são a hipoxemia, a hipercapnia e os picos de hiperatividade simpática. O efeito inflamatório de cada um deles agindo isoladamente e aplicado de forma aguda vem sendo alvo de alguns estudos.

### **1. 1.5. Efeitos pró-inflamatórios da hipóxia aguda**

A hipóxia aguda tem – se demonstrado capaz de desencadear resposta inflamatória sobre o endotélio. Os estudos que visaram caracterizar este fenômeno utilizaram cultura de células, animais de experimentação, e, em menor proporção, humanos.

Nos modelos experimentais que envolvem células cultivadas, verificou-se que a exposição de células endoteliais humanas a um ambiente de baixa  $PO_2$  por 24 horas levou à supressão dos níveis de RNAm da enzima eNOS (McQuillan et al., 1994). A hipóxia, portanto, pode levar à diminuição dos níveis do NO, ao suprimir a produção da principal enzima envolvida em sua síntese.

Cardiomiócitos cultivados sob baixa tensão de oxigênio durante um período de quatro horas apresentaram concentrações de interleucina-6 mais altas que os cardiomiócitos cultivados sob normóxia. Além disso, verificou-se que a exposição destas células ao estímulo de hipóxia durante duas horas seguida por duas horas de reoxigenação resultou em concentrações ainda mais altas de interleucina-6 (Yamauchi-Takihara et al., 1995). A interleucina-8 também teve sua expressão aumentada em células endoteliais cultivadas sob baixa tensão de oxigênio por duas horas (Karakurum et al., 1994).

Wada et al. (2002) verificaram maior captação da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) por células de músculo liso vascular humanas cultivadas em ambiente de hipóxia (2% de oxigênio) em relação às células cultivadas sob normóxia. A captação de LDL por células de músculo liso vascular é etapa fundamental no desenvolvimento da placa aterosclerótica e pode ser verificada mesmo em lesões mais precoces.

Angele et al. (1999) verificou que a exposição de ratos à hipoxia (fração inspirada de oxigênio de 5%) durante sessenta minutos resultou na elevação das concentrações dos derivados do NO nitrato e nitrito em macrófagos do peritônio destes animais. Esta elevação ocorreu após 3h da cessação do estímulo e foi precedida pelo aumento na expressão de RNAm da enzima iNOS.

Estudos em humanos também caracterizaram resposta inflamatória em resposta à exposição aguda à hipóxia. Tamura et al. (2002) investigaram o efeito da exposição de indivíduos jovens e saudáveis à

hipóxia aguda, aplicada de forma ininterrupta por meio da respiração de mistura gasosa pobre em oxigênio até que a saturação de oxigênio atingia o valor de 68%, o que ocorria em média após 45 minutos. O experimento era então interrompido e os voluntários eram novamente expostos ao ar ambiente. Imediatamente antes do experimento e trinta minutos após o momento em que foi atingido o nadir da dessaturação de oxigênio foi coletada amostra de sangue. Os autores verificaram que houve aumento importante da produção de superóxido ( $O_2^-$ ) por polimorfonucleares isolados do sangue, além de diminuição significativa da velocidade de apoptose destas células, sugerindo que a hipóxia aguda acentua as propriedades inflamatórias dos neutrófilos.

Mazzeo et al.(2001) compararam níveis séricos de interleucina – 6 em jovens saudáveis ao nível do mar e durante a permanência em uma altitude de 4300m, verificando valores 57% mais altos quando coletados a 4300m, mantendo-se elevados durante os doze dias do protocolo experimental.

## **1.2. Regulação da pressão arterial pelo sistema nervoso autônomo**

O sistema nervoso autônomo exerce controle tônico e reflexo sobre o sistema cardiovascular, uma vez que, tanto a noradrenalina como a acetilcolina liberadas no coração, modificam o débito cardíaco por alterar a força de contração das fibras miocárdicas e a frequência cardíaca. Respostas reflexas do simpático e do parassimpático permitem ajustes do

débito cardíaco e da resistência vascular periférica, contribuindo para a estabilização e manutenção da pressão arterial sistêmica durante diferentes situações fisiológicas, como por exemplo a postura ortostática( Franchini e Cowley, 1996).

Nesse contexto, sabe-se que pelos menos três grandes arcos reflexos estão envolvidos na modulação da atividade parassimpática para o coração e da atividade simpática para coração e vasos, ligados aos barorreceptores arteriais, aos receptores cardiopulmonares e aos quimorreceptores arteriais (Abboud et al., 1983).

Os barorreceptores arteriais são terminações nervosas livres, densamente ramificadas, presentes na camada adventícia das paredes do arco aórtico e dos seios carotídeos. São mecanorreceptores sensíveis às deformações da parede vascular e, devido ao seu alto ganho, constituem-se na forma mais importante de controle da pressão arterial em curto prazo, ou seja, momento a momento. Além do controle reflexo da atividade autonômica, os barorreceptores também exercem controle tônico sobre a atividade simpática (inibição) e parassimpática (estimulação da mesma).

É sabido que o sistema barorreflexo participa na fisiopatologia de diversas doenças do aparelho cardiovascular, como hipertensão arterial sistêmica (Bristow et al.,1969; Mancía et al., 1997). Estudos do nosso grupo demonstraram a presença de disfunção do barorreflexo e aumento de atividade simpática em filhos de pais hipertensos, quando comparados com filhos de normotensos, sugerindo que alterações no SNS podem ter uma influência genética, e estar relacionados à gênese da HAS (Lopes et al.,

2000). Uma outra doença que se acompanha de comprometimento do sistema barorreflexo é a síndrome da apnéia do sono (Narkiewicz et al., 1998).

A avaliação da sensibilidade dos barorreceptores é uma excelente medida da modulação autonômica para o coração. Este reflexo pode ser ativado pelo estímulo mecânico dos corpos carotídeos, pela manobra de Valsalva, por mudanças posturais (teste de inclinação ortostática) e injeção de drogas (fenilefrina, nitroprussiato, nitroglicerina), os quais induzem modificações de pressão arterial que devem deflagrar alterações reflexas da frequência cardíaca (Parati, DiRienzo e Mancia, 2000). Tais provas, no entanto, carecem de praticidade para o uso fora dos laboratórios de pesquisa.

Mais recentemente, técnicas não invasivas baseadas no registro eletrocardiográfico têm sido usadas como marcadores da modulação autonômica para o coração. Uma importante técnica para a avaliação do balanço simpático e parassimpático sobre o nó sinusal é o estudo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (Stein et al., 1994; van Ravenswaaij - Arts et al., 1993).

A integração entre a modulação parassimpática, que gera oscilações de ciclos curtos facilmente identificados como arritmia sinusal respiratória e a modulação simpática, que gera oscilações de ciclo longo que são mediadas pelo reflexo barorreceptor, determina a VFC. Uma baixa VFC reflete um aumento da atividade adrenérgica e concomitante redução da atividade vagal sobre o coração.

A baixa VFC demonstrou ser um importante índice prognóstico, pois é preditora de mortalidade após infarto do miocárdio (Kleiger et al., 1987; Bigger et al., 1992), à semelhança de outras variáveis importantes como a baixa fração de ejeção ventricular (Odemuyiwa et al., 1994). Outras situações em que a baixa VFC é preditora de mortalidade incluem a doença de Chagas (Guzzetti et al., 1991) e a insuficiência cardíaca congestiva (Bilchick et al., 2002; Fauchier et al., 1997). Portanto, o estudo da VFC é um instrumento valioso na prática clínica e na pesquisa que envolve o sistema nervoso autônomo.

### **1.2.1 Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo**

A análise da VFC é feita avaliando cada intervalo entre batimentos sucessivos (intervalo R-R do eletrocardiograma) normais (intervalo NN) durante aquele período de tempo, obtendo então a média e o seu desvio padrão. O tempo de monitorização eletrocardiográfica pode ser de até 24h, como é utilizado frequentemente na prática clínica (sistema Holter). Há vários tipos de manipulação aritmética do intervalo R-R para representar a VFC no domínio do tempo e estão resumidos na tabela 1.

TABELA 1 Parâmetros usados para o cálculo da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo

<b>Índice</b>	<b>Unidade</b>	<b>Descrição</b>
SDNN	ms	Desvio padrão de todos os intervalos NN
SDANN	ms	Desvio padrão das médias dos intervalos NN em todos os segmentos de 5 minutos de todo o período de monitorização
SD	ms	Desvio padrão das diferenças entre intervalos NN adjacentes
RMSSD	ms	Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre intervalos NN adjacentes
pnn50	%	Percentual das diferenças entre os intervalos NN que são maiores que 50ms.

Extraído de Sztajzel, 2004

### 1.2.2. Análise espectral da frequência cardíaca

Em contraste com a análise da VFC no domínio do tempo, a análise espectral é o estudo da VFC no domínio da frequência e é uma ferramenta complementar para o estudo não invasivo do controle autonômico sobre o sistema cardiovascular.

Pelo fato da frequência cardíaca apresentar flutuações, que em grande parte são periódicas, o registro contínuo do eletrocardiograma durante períodos curtos ou prolongados (24h) e a representação gráfica dos intervalos RR em relação ao tempo (tacograma) (Figura 2), dá origem a um fenômeno ondulatório complexo. Por meio de algoritmos matemáticos, a

análise espectral do tacograma decompõe o sinal em ondas senóides e cosenóides, de diferentes amplitudes, cujas frequências são múltiplas da frequência fundamental. O espectro resultante é derivado de todos os dados presentes no sinal registrado. Três faixas, ou bandas, de frequência podem ser identificadas (Figura 3): a banda de baixa frequência (low frequency - LF) ocorre entre as faixas de 0,08 e 0,14Hz e depende do controle do simpático e do parassimpático. A banda de alta frequência (high frequency - HF) ocorre entre as faixas de 0,15 e 0,40Hz e reflete a participação do sistema parassimpático, sofrendo a influência da respiração. A banda de muito baixa frequência (very low frequency- VLF) ainda é pouco compreendida e não é utilizada na análise espectral.

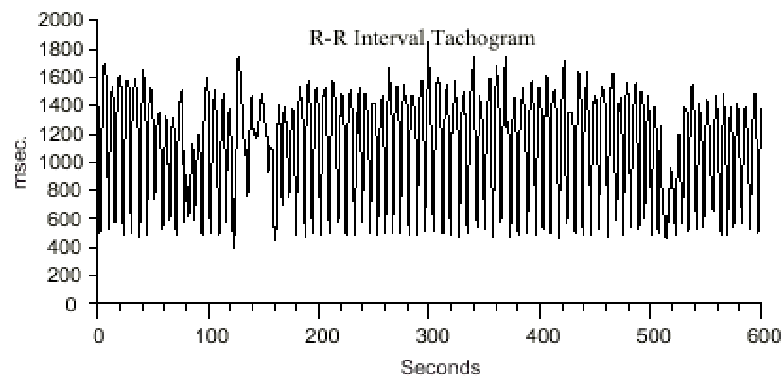


Figura 2 - Representação gráfica dos intervalos RR, em milissegundos, plotados em função do tempo (tacograma)



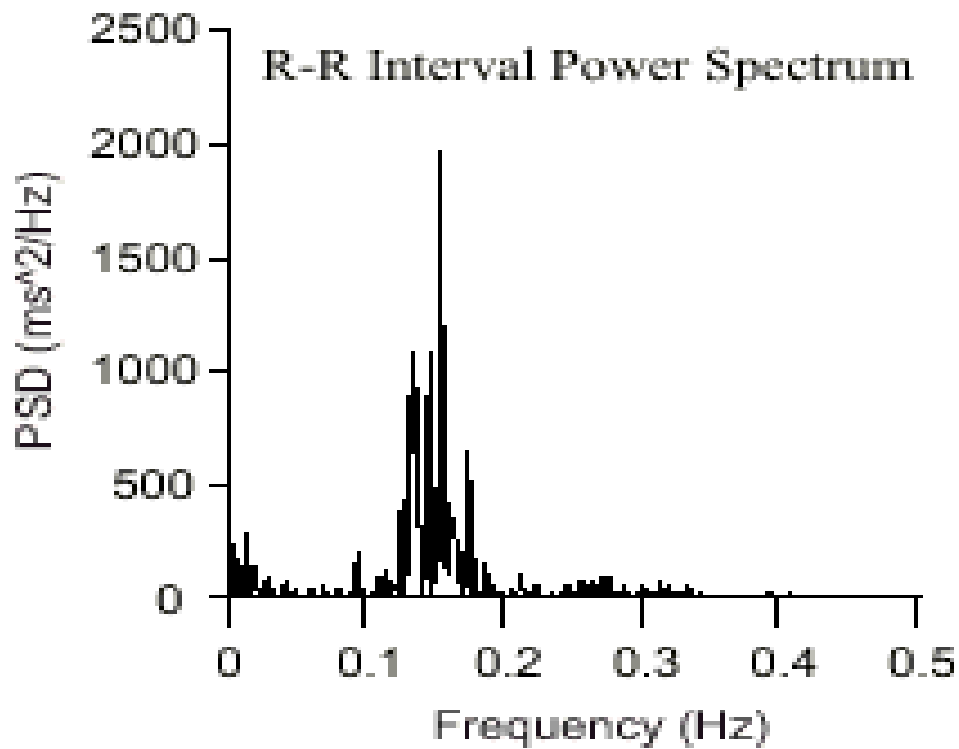


Figura 3 - Divisão dos componentes espectrais em bandas de frequência

Os algoritmos matemáticos mais utilizados para a análise da potência espectral são a transformada rápida de Fourier (FFT) e o método autorregressivo.

A medida dos componentes espectrais habitualmente é feita em valores absolutos de potência ( $\text{ms}^2$ ). Entretanto, os valores de HF e LF podem também ser expressos em unidades normalizadas (nu), representando o valor de cada um destes componentes em relação à potência total (total potency - TP) menos o componente de VLF. São calculados por meio das seguintes fórmulas:

- $HF (nu) = AF / (PT - MBF) \times 100$  e
- $LF (nu) = LF / (TP - VLF) \times 100$ .

Com isto, os efeitos das alterações na faixa de MBF sobre as outras duas de frequências mais rápidas (BF e AF) são minimizados. Outra medida muito utilizada é a relação BF/AF, aceita como um modo de estimar-se as contribuições relativas das atividades simpática e parassimpática na modulação autonômica sobre o coração em um dado momento (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996).

É bem conhecido o papel da hiperatividade simpática sobre a gênese da hipertensão arterial que acompanha a síndrome da apnéia do sono. O tônus simpático está exacerbado (Carlson et al., 1993), bem como as respostas reflexas à hipóxia, à hipercapnia e à apnéia, aplicadas de forma isolada durante o período de vigília (Somers et al, 1995 ).

Há também evidências de disfunção da atividade do sistema barorreflexo complicando a SAOS. Narkiewicz et al. (1998) verificaram diminuição da sensibilidade do barorreflexo em pacientes normotensos com SAOS moderada a grave. Já foi constatado que o diagnóstico da SAOS é um fator de risco independente para o desenvolvimento da hipertensão arterial e é possível que a disfunção do barorreflexo seja uma manifestação precoce do fenótipo hipertensivo. Sugere-se que os repetidos episódios de estimulação do simpático em resposta à hipoxemia, hipercapnia e ainda ao pico de ativação do simpático no momento da restauração do fluxo aéreo

resultem em adaptação (*resetting*) dos barorreceptores. Também as alterações na distensibilidade vascular verificada na SAOS podem contribuir para a adaptação dos barorreceptores.

Além do envolvimento do sistema barorreflexo na SAOS, que é um modelo de hipóxia crônica intermitente, o efeito do estímulo representado pela hipóxia aguda também tem sido estudado. Rey et al. (2004), em um modelo de hipóxia-reoxigenação aplicado a gatos mantidos em câmaras através das quais fluía nitrogênio puro por 90 segundos seguido por um fluxo de ar ambiente durante 270 segundos, sendo estes ciclos repetidos 10 vezes por hora, durante 8 horas por dia, verificaram que após quatro dias de experimento houve aumento acentuado da razão baixa frequência/alta frequência da análise espectral da frequência cardíaca, antes mesmo de qualquer alteração da pressão arterial.

Outro sistema regulador implicado na gênese das alterações autonômicas presentes na SAOS é o sistema quimiorreflexo, que modula a atividade simpática e parassimpática em resposta à hipóxia detectada por quimiorreceptores presentes nos corpos carotídeos (quimiorreflexo periférico) e à hipercapnia, mediada por receptores presentes na região ventral da medula, além de contribuir na regulação tônica da pressão arterial (Franchini e Krieger, 1992).

Narkiewicz et al. (1999) verificaram que a atividade simpática está aumentada em pacientes com a SAOS, mesmo normotensos. Além do tônus basal aumentado, a resposta reflexa aos estímulos de hipóxia, hipercapnia e à realização de apnéia estava exacerbada nestes pacientes,

em relação aos controles. Portanto, atribui-se grande importância à hiperatividade dos quimiorreflexo, presente na SAOS, na fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica que comumente atinge estes pacientes.

### **Considerações ao final da introdução**

Conforme descrito, são poucos os estudos feitos em humanos ou mesmo em animais de experimentação quanto aos efeitos da hipóxia aguda sobre os marcadores de inflamação. Nenhum destes estudos utilizou o modelo experimental representado pela exposição repetida à hipóxia alternada com a reoxigenação, mimetizando os ciclos de obstrução das vias aéreas que caracterizam a síndrome da apnéia do sono.

De modo análogo, não há estudos endereçando a repercussão da exposição de indivíduos saudáveis à hipóxia aplicada de forma intermitente e repetida, intercalada com a respiração de ar ambiente sobre a análise espectral da frequência cardíaca e da pressão arterial.

Deste modo, optamos por desenvolver um esquema experimental de hipóxia aguda, alternada com reoxigenação, aplicada a indivíduos normais e verificar se, de fato, pode ser detectado precocemente o envolvimento dos sinalizadores de inflamação e se há correlação das mesmas com alterações no controle autonômico.

## **Objetivos**

---

## **2. Objetivos**

Determinar o efeito da hipóxia isocápnic aguda e da reoxigenação sobre:

2.1. Marcadores de inflamação vascular e indicadores de estresse oxidativo, vinculados à formação da placa aterosclerótica.

2.2. Variáveis hemodinâmicas, como pressão arterial, frequência cardíaca, débito cardíaco e resistência vascular periférica e sobre a modulação autonômica para o coração.

## **Casuística e Métodos**

---

### **3. Casuística e Métodos**

#### **3.1. Casuística**

##### **3.1.1. População estudada**

Dezesseis indivíduos submeteram-se ao estudo. Todos os indivíduos foram avaliados por anamnese e exame físico, além de dosagens bioquímicas que consistiam de glicemia de jejum e colesterol total e frações. Todos os voluntários submeteram-se à polissonografia noturna a fim de excluir a síndrome da apnéia do sono.

Os voluntários foram considerados sadios após avaliação médica que consistiu de anamnese e exame físico. A idade dos indivíduos variou entre 19 e 48 anos, com média de  $33,81 \pm 2,12$  anos.

Na seleção, foram excluídos do protocolo voluntários que apresentassem as seguintes condições:

- (a) Idade inferior a 18 anos ou superior a 55 anos
- (b) Hipertensão arterial sistêmica
- (c) Insuficiência cardíaca congestiva
- (d) Insuficiência coronariana
- (e) Diabetes mellitus
- (f) Dislipidemia grave (LDL colesterol acima de 190mg/dl)



- (g) Tabagismo
- (h) Uso de medicamentos que interferem com a atividade simpática
- (i) História de acidente vascular cerebral
- (j) Infecção atual ou recente (últimos 30 dias)
- (k) Síndrome da apnéia do sono

## **3. 2. Métodos**

### **3.2.1. Esquema experimental**

O esquema experimental (figura 4) consistia da exposição dos voluntários à hipóxia durante cinco minutos, alternados por dois minutos de respiração de ar ambiente, de forma seqüenciada e ininterrupta. Ao todo, eram seis ciclos de respiração de hipóxia seguida por ar ambiente.

A indução de hipoxemia foi realizada através da respiração de mistura gasosa contendo oxigênio (O<sub>2</sub>) a 10% e nitrogênio (N<sub>2</sub>) a 90%. (White Martins). Para a realização do exame, a mistura de gases era armazenada em bolsa de Douglas.

FIGURA COREL DRAW

## Rotina Geral do Protocolo

a) Seleção: os voluntários foram selecionados a partir da avaliação clínica/ cardiológica realizada pela pesquisadora. Nesta fase, eram explicadas as finalidades do estudo e todas as etapas do experimento. Para o dia do exame, o indivíduo era orientado a comparecer em jejum de 12 horas, pois era realizada coleta de sangue para dosagem de colesterol total e frações, triglicérides e glicemia de jejum.

### b) Dia do Exame

b. 1. Pré- experimento: O pré-experimento iniciava-se em torno de 60 minutos antes do início do experimento, com a calibração de todos os aparelhos e abertura do arquivo individual no computador para a gravação do exame. Após finalizar o procedimento de calibração, o indivíduo era convocado a entrar no laboratório, sendo novamente explicadas as etapas do experimento. Nesta fase, era obtida a assinatura do consentimento pós-informado, segundo as normas da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Em seguida, era coletada a amostra de sangue para dosagem dos mediadores, da seguinte forma: 05ml de sangue coletados em tubo seco com gel separador para a dosagem de PCR e interleucinas, 05ml de sangue em tubo seco com adição de 02 gotas de heparina sódica para a dosagem de nitrato e nitrito; 30mL de sangue em tubos com heparina, que

eram enviados em recipiente com gelo imediatamente, por meio de motocicleta, para o Laboratório de Fisiologia Celular da Universidade de São Paulo, onde era entregue em menos de trinta minutos para o início do processo que envolvia isolamento e cultivo de neutrófilos e células mononucleares. Seguiam junto 30mL de sangue de voluntários sadios que funcionaram como amostra controle. As demais amostras de sangue eram conservadas em recipiente com gelo até a centrifugação, separação em alíquotas de 1ml e armazenamento no freezer a  $-80$  graus. O acesso vascular era mantido permeável por meio de *flush* de solução salina.

Após repouso de cerca de 10 minutos, era realizada a medida da pressão arterial em posição sentada. Antes de deitar na maca, o indivíduo era orientado a esvaziar a bexiga. Após esta etapa, o indivíduo era colocado na posição supina onde novamente era aferida a pressão arterial para comparação com a pressão obtida com o Finometer. Iniciava-se, então, o registro do eletrocardiograma e a monitorização contínua não invasiva da pressão arterial. Em seguida, o voluntário recebia o bucal acoplado à válvula respiratória unidirecional de Hans-Rudolph e o clipe nasal. Após um período de dez minutos de repouso para a estabilização dos sinais e uma vez adaptado o indivíduo ao sistema, era iniciado o experimento.

b.2. Experimento: o experimento (Figura 5) tinha início com a respiração de ar ambiente através do sistema traquéia inspiratória e válvula unidirecional de Hans-Rudolph. O indivíduo inspirava ar ambiente durante dois minutos. Em seguida, era fechada a válvula para a entrada de ar ambiente e aberta

a válvula que permitia a entrada da mistura balanceada de oxigênio a 10% e nitrogênio a 90% armazenada no saco de Douglas. O indivíduo respirava a mistura gasosa durante cinco minutos. Ao todo, eram seis ciclos de inalação de ar ambiente (2 minutos) e de oxigênio a 10% (cinco minutos), que alternavam - se em seqüência, sem intervalo.

O gás carbônico era suplementado a fim de manter a isocapnia, sempre que a capnografia indicava valor abaixo de 36mmHg. Para isto, era permitida a entrada de CO<sub>2</sub> a 100% através do sistema saco de Douglas, traquéia inspiratória e válvula de Hans Rudolph.

b.3 Pós - experimento: os voluntários permaneciam no Instituto do Coração durante oito horas após o término do experimento. Eram coletadas amostras de sangue para a dosagem de nitrato e nitrito após três horas do final do experimento. Após oito horas do final do experimento era coletada amostra de sangue para a dosagem da PCR.

#### Acessórios

- a. Takaoka: permitia a regulação e controle do fluxo das misturas gasosas (O<sub>2</sub> a 10% e nitrogênio a 90% e CO<sub>2</sub> a 100%) dos torpedos de armazenamento das misturas gasosas para a traquéia inspiratória.
- b. Bolsa Reservatória conectada à Traquéia Inspiratória: a mistura gasosa de oxigênio a 10% era armazenada em uma bolsa reservatória acoplada a um sistema valvulado que permitia a

rápida abertura da traquéia inspiratória para a mistura de oxigênio a 10% ou para o ar ambiente.

- c. Válvula de Hans-Rudolph (Hans-Rudolph, Inc., Kansas City, MO, USA), bucal e “clip” nasal: a válvula de Hans-Rudolph é um conjunto unidirecional de válvulas de três vias (em “T”), que possibilita que o ar inspirado pelo paciente, via bucal, seja exalado pela via expiratória, não ocorrendo, portanto, re - inspiração do ar exalado. O clip nasal permitia que o voluntário inspirasse apenas o gás ofertado via traquéia inspiratória.
- d. Traquéia expiratória: conectada na posição expiratória da válvula de Hans-Rudolph, permitindo a interposição do sensor do capnógrafo.
- e. Capnógrafo: posicionado na traquéia expiratória (model 7100 CO<sub>2</sub>SMO ETCO<sub>2</sub>/SpO<sub>2</sub> Monitor, Novamatrix Medical Systems Inc., Wallingford,CT, USA) foi utilizado na monitorização da PEFCO<sub>2</sub> como representante da pressão parcial de CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>).
- f. Oxímetro de pulso (model 7100 CO<sub>2</sub>SMO ETCO<sub>2</sub>/SpO<sub>2</sub> Monitor, Novamatrix Medical Systems Inc., Wallingford,CT,USA) foi utilizado para a monitorização não invasiva e contínua da saturação arterial de oxigênio (SpO<sub>2</sub>).

### 3.2.2. Monitorização da saturação de oxigênio e da capnografia

**(a) Saturação Arterial de Oxigênio:** Foi utilizado oxímetro de pulso (model 7100 CO<sub>2</sub>SMO ETCO<sub>2</sub>/SpO<sub>2</sub> Monitor, Novametrix Medical Systems Inc., Wallingford,CT,USA), posicionado no quarto quírodáctilo direito, para a monitorização indireta não invasiva e contínua da saturação arterial de oxigênio (SaO<sub>2</sub>).

**(b) Capnografia:** Capnógrafo posicionado na traquéia expiratória (model 7100 CO<sub>2</sub>SMO ETCO<sub>2</sub>/SpO<sub>2</sub> Monitor, Novametrix Medical Systems Inc., Wallingford,CT, USA) foi utilizado na monitorização indireta não invasiva e contínua da pressão expiratória final do CO<sub>2</sub> como representante da pressão parcial de CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>).

### 3.2.3. Monitorização Cardiovascular durante a Hipóxia

**(a) Eletrocardiograma:**

O ritmo cardíaco e a frequência cardíaca foram monitorizados por eletrocardiograma utilizando derivação tipo MC5. Foram colocados três eletrodos no tórax do paciente, nas posições bipolares, para a captação do sinal eletrocardiográfico. Após este sinal ser pré-amplificado (General Purpose Amplifier/Stemtech, Inc., GPA-4, modelo 2), foi convertido de analógico para digital e, em seguida, armazenado em um computador através de um programa de computador AT/CODAS.

**(b) Pressão Arterial:**

A pressão arterial foi monitorizada de maneira não invasiva e contínua pelo Finometer (Finometer 2003 Finapres Medical Systems, BV, Amhem, The Netherlands). Por meio da técnica da fotopletismografia digital, descrito por Penáz (1973) e desenvolvido por Wesseling (1996), o equipamento registra curvas de pressão arterial de forma contínua e não invasiva. A pletismografia é a medida da variação de volume de um órgão em função do aporte sanguíneo através dos vasos, também conhecido como método de clampeamento volumétrico. Para tal, era colocado um manguito de pressão circundando a falange média do terceiro quirodáctilo esquerdo. A mão foi mantida ao nível da linha média axilar durante todo o exame.

A análise das curvas de PA aquiridas pelo Finometer era realizada posteriormente com o software Beatscope, do próprio equipamento, e forneceu valores de pressão arterial sistólica, diastólica e média, frequência cardíaca, débito e índices cardíacos e resistência vascular periférica.





Figura 6: Finometer, sistema de mensuração contínua e não invasiva da pressão arterial utilizado no protocolo.

#### Registro dos Sinais durante o Experimento

(a) Saturação de Oxigênio

(b) Capnograma

(c) Eletrocardiograma

(d) Pressão Arterial batimento a batimento

Todos os sinais biológicos foram registrados simultaneamente por computador (Gateway-386), utilizando o sistema CODAS (Computer

Operated Data Acquisition Software; AT-CODAS; DATAQ, Instruments, Akron, OH, USA), sendo programado 1000 Hz para cada canal.

### **Análise dos Sinais**

Os sinais analógicos foram gravados pelo sistema CODAS e em seguida convertidos em números e armazenados em planilha (Excel, Microsoft, 2003).

- (a) Saturação Arterial de Oxigênio (%): foi obtida através da análise do sinal analógico da Saturação de oxigênio (SaO<sub>2</sub>) registrado no computador. O valor da SpO<sub>2</sub> foi lido ao final de cada minuto analisado.
- (b) CO<sub>2</sub> Final Expirado (mmHg): obtido pela análise do capnograma, através do sistema CODAS. O valor do minuto representará a média dos valores de CO<sub>2</sub>FE obtidos minuto a minuto.

### **3.3. Polissonografia noturna**

A polissonografia noturna foi realizada em todos os voluntários. Foi utilizado o sistema digital EMBLA (EMBLA; Flagra hf. Medical Devices, Reykjavik, Iceland) sendo monitorados os seguintes parâmetros eletrofisiológicos: eletroencefalograma (EEG), eletrooculograma (EOG), eletromiograma (EMG) submentoniano e tibial anterior, sensor de ronco,

sensor de fluxo aéreo (2 canais) medido por termistor oro- nasal e cânula de pressão nasal, cintas torácica e abdominal, eletrocardiograma (ECG) e oximetria de pulso.

Voluntários que apresentavam IAH superior a 5 eram excluídos do protocolo.

### **3.4. Variabilidade da Frequência Cardíaca**

A variabilidade da frequência cardíaca foi avaliada no domínio do tempo e no domínio da frequência nos cinco minutos iniciais do experimento (intervalo denominado “pré hipóxia”), e nos seis intervalos de hipóxia (intervalos HPX1,HPX2,HPX3,HPX4,HPX5,HPX6). A análise da VFC não pôde ser efetuada nos períodos de reoxigenação pois o tempo (2 minutos) é insuficiente para a análise.

Para a análise da VFC no domínio da frequência, cada batimento cardíaco será identificado através da utilização de algoritmo especialista implementado para o Matlab™, que realizará a detecção automática dos eventos sistólicos e diastólicos da onda de pressão. Após esta leitura automática será realizada uma verificação por inspeção visual. A análise espectral de séries temporais amostradas com frequência variável pode apresentar distorções espectrais indesejáveis. Estas distorções podem ser contornadas através de técnicas de interpolação de dados que resultam em séries temporais com base de tempo com intervalos regulares. A

interpolação da série temporal do intervalo de pulso cardíaco (IP) entre eventos diastólicos consecutivos foram calculadas e também verificadas visualmente. As séries temporais batimento a batimento serão re-amostradas com periodicidade de 53.3ms utilizando interpolação spline cúbica. A densidade espectral de potência (DEP) será calculada utilizando o método de Welch aplicada nos primeiros 8.192 pontos das séries interpoladas. A DEP será calculada dividindo-se o sinal em oito segmentos e aplicando-se uma janela de Hanning a cada um dos segmentos, com sobreposição de 50% entre cada segmento.

Variabilidade no domínio do tempo: As séries temporais obtidas PAS, PAD e IP serão analisadas no domínio do tempo pela média e desvio padrão. As variabilidades dos sinais serão apresentadas pelo desvio padrão. Para obtenção das séries temporais da PA e do IP serão necessários dois protocolos:

Para análise do sinal da PA batimento a batimento, os eventos sistólicos (PAS) e diastólicos (PAD) da PA serão identificados e marcados. O IP será estimado pelo intervalo entre diástoles consecutivas. Após inspeção visual de todas as séries obtidas fez-se a regularização da periodicidade por interpolação spline cúbica ( $f_i = 250\text{Hz}$ ) e após isto, a redução do número de pontos por decimação.

Para análise do sinal da PA batimento a batimento, os eventos sistólicos (PAS) e diastólicos (PAD) serão identificados e marcados. O IP será estimado pelo intervalo entre diástoles consecutivas. Após inspeção visual

de todas as séries obtidas faz-se a regularização da periodicidade por interpolação spline cúbica ( $f_i = 800\text{Hz}$ ), após o que o número de pontos reduzidos por decimação (54 vezes).

### **3.5 Dosagem de mediadores inflamatórios**

#### **3.5.1. Isolamento de neutrófilos**

Neutrófilos foram isolados pelo método descrito por Boyum (1968). Sangue (10mL) foi diluído v:v com PBS Dulbecco 10 mM a pH 7.4 contendo 100mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM  $\text{MgCl}_2$  e glicose 1mg/mL e cuidadosamente adicionado sobre 5mL de um gradiente comercial Ficoll-Hypaque (Histopaque<sup>R</sup>;  $d=1.077$ ). O tubo foi centrifugado a 2500 rpm a temperatura ambiente por 20 minutos. O sobrenadante, rico em células mononucleares foi descartado, e 10 mL de dextran 5% foi adicionados ao *pellet*. O tubo foi homogeneizado e mantido por 30 minutos a temperatura ambiente para permitir a sedimentação de eritrócitos. O sobrenadante resultante, rico em granulócitos, foi recuperado, lavado com PBS e novamente centrifugado a 2500 rpm, a temperatura ambiente por 5 minutos. Após, o *pellet* foi submetido a tratamento hipotônico com 10mL de água destilada gelada para promover a lise de eritrócitos contaminantes. Após 1 minuto, a isotonicidade foi restabelecida pela adição de 2,5 ml de NaCl 2.7% e 7,5 ml de PBS e novamente o tubo foi centrifugado a 2500 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em meio de cultura. As células foram contadas em câmara de

Neubauer para posterior cultura. Todos os procedimentos foram realizados utilizando reagentes e materiais livres de endotoxina.

### **3.5.2. Isolamento de células mononucleares**

Células mononucleares (PBMC) foram obtidas a partir de sangue periférico, coletado em tubo com heparina. Sangue (10mL) foi diluído v:v com PBS Dulbecco 10 mM a pH 7.4 contendo 100mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MgCl<sub>2</sub> e glicose 1mg/mL e cuidadosamente adicionado sobre 10mL de um gradiente comercial Ficoll-Hypaque (Histopaque<sup>R</sup>; d=1.077). O tubo foi centrifugado a 2500 rpm a temperatura ambiente por 20 minutos. O sobrenadante, rico em células mononucleares foi coletado e foram adicionados 40mL de tampão PBS ao tubo. O tubo foi homogenizado e centrifugado a 1800 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos, ao *pellet* novamente foi adicionado 40 mL de tampão PBS e centrifugado a 2500 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos, esta última etapa de lavagem foi novamente repetida e ao final o *pellet* foi ressuspensão em meio de cultura. As células foram contadas em câmara de Neubauer para posterior cultura. Todos os procedimentos foram realizados utilizando reagentes e materiais livres de endotoxina.

### **3.5.3. Dosagem da proteína C - reativa**

A dosagem da proteína C -reativa no soro foi realizada por imunonefelometria, utilizando kit comercial de alta sensibilidade (hsPCR Cardiophase, Dade Behring, Marburg, Germany).

As amostras de sangue foram coletadas nos momentos basal (pré hipóxia) e 8h após o final do experimento. As amostras de soro e o reagente-padrão eram diluídos automaticamente no nefelômetro BN 100 (Behringer Nephelometer 100 Analyzer, série 151907, Dade Behring, Marburg, Germany).

O princípio da metodologia é o de que partículas de poliestireno, revestidas com anticorpo monoclonal contra a proteína C-reativa, aglutinam-se quando misturadas com amostras que contenham tal proteína. A intensidade da luz difusa no nefelômetro é diretamente proporcional à concentração de proteína C-reativa da amostra, de forma que é possível comparar-se o resultado com diluições de um padrão com concentrações conhecidas e portanto determinar a quantidade de proteína C-reativa na amostra.

### **3.5.4. Quantificação de espécies reativas de oxigênio**

A espécie reativa de oxigênio superóxido ( $O_2^-$ ) foi dosada em neutrófilos isolados do sangue total de voluntários e controles, antes e imediatamente após o experimento.

Para detectar-se a luminescência amplificada por lucigenina utilizou-se espectrômetro de cintilação líquida (Beckman), com e sem a adição de 16ng do PMA (acetato 12-forbol 13-miristato). PMA age como estimulador da geração de espécies reativas de oxigênio, em um processo conhecido como *burst* oxidativo. Cada ensaio fo ajustado para  $2,5 \times 10^6$  células.

Os resultados foram expressos em unidade relativa de luz (URL).

### **3.6. Análise estatística**

A comparação das contagens celulares e dos níveis da PCR nos dois grupos (controle e voluntário) foi feita pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Em relação ao comportamento das variáveis pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, frequência cardíaca, débito cardíaco, resistência vascular periférica, balanço autonômico, índice RMSSD, HF e LF foi realizada análise de variância para medidas repetidas. Em seguida, foi utilizado teste de comparações múltiplas, como o Tukey Kramer ou de Student Newman para a comparação dos valores de cada intervalo de forma pareada.

Para verificar a existência de correlação entre variáveis, como RMSSD e saturação de oxigênio, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman.

Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.



## **Resultados**

---

## 4.0. Resultados

### 4.1. Características da população estudada

A análise dos dados clínicos dos voluntários (tabela 2) revela que a idade média era de 33,81anos, variando entre , 06 eram homens e 10 eram mulheres, 13 eram brancos, 2 eram negros e 1 era de origem asiática. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

Tabela 2 : dados clínicos da população estudada (n=16)

Idade (anos)	33,81 $\pm$ 2,12
Peso (kg)	62,93 $\pm$ 1,68
Altura (m)	1,68 $\pm$ 0,02
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,30 $\pm$ 0,46
IAH ( /h)	1,67 $\pm$ 0,01
Raça (B/NB)	(13/03)
PAs (mmHg)	125 $\pm$ 4,15
Pad (mmHg)	79,8 $\pm$ 3,32

IMC: índice de massa corpórea;  
IAH: índice de apnéia e hipopnéia;  
PAs: pressão arterial sistólica  
Pad: pressão arterial diastólica  
Média  $\pm$  erro padrão

A análise dos dados bioquímicos da população estudada (tabela 3) mostra que não havia nenhum indivíduo hipercolesterolêmico ou diabético, doenças que geralmente cursam com disfunção endotelial, o que poderiam se sobrepor às alterações causadas pela hipóxia-reoxigenação.

Tabela 3: Dados laboratoriais da população estudada (n=16)

Colesterol total (mg/dl)	HDL c (mg/dl)	LDL c (mg/dl)	Triglicérides (mg/dl)	Glicemia (mg/dl)
160 ± 5,60	45,88 ± 2,41	97,88 ± 4,67	84,9 ± 9,34	93,62 ± 2,13

mg/dl: miligramas por decilitro  
HDL-c: lipoproteína de alta densidade.  
LDL-c: lipoproteína de baixa densidade

#### **4.2. Saturação Arterial de Oxigênio (SpO<sub>2</sub>) e CO<sub>2</sub> Final Expirado (CO<sub>2</sub>FE)**

A utilização da mistura de gases com oxigênio a 10% e nitrogênio a 90% acarretou uma diminuição significativa na saturação arterial de oxigênio entre os valores de pré HPX e os intervalos de HPX 1 ( 99,13 ± 0,12 vs 88,51 ± 1,05, p<0,05), HPX 2 (99,13 ± 0,12 vs 83,89 ± 1,44, p<0,05), HPX 3 (99,13 ± 0,12 vs 81,79±1,46, p<0,05),HPX 4 (99,13 ± 0,12 vs 80,34± 1,47, p<0,05), HPX 5 (99,13 ± 0,12 vs 81,61 ± 1,36, p<0,05), HPX 6 (99,13 ± 0,12 vs 81,38 ± 1,72, p<0,05).

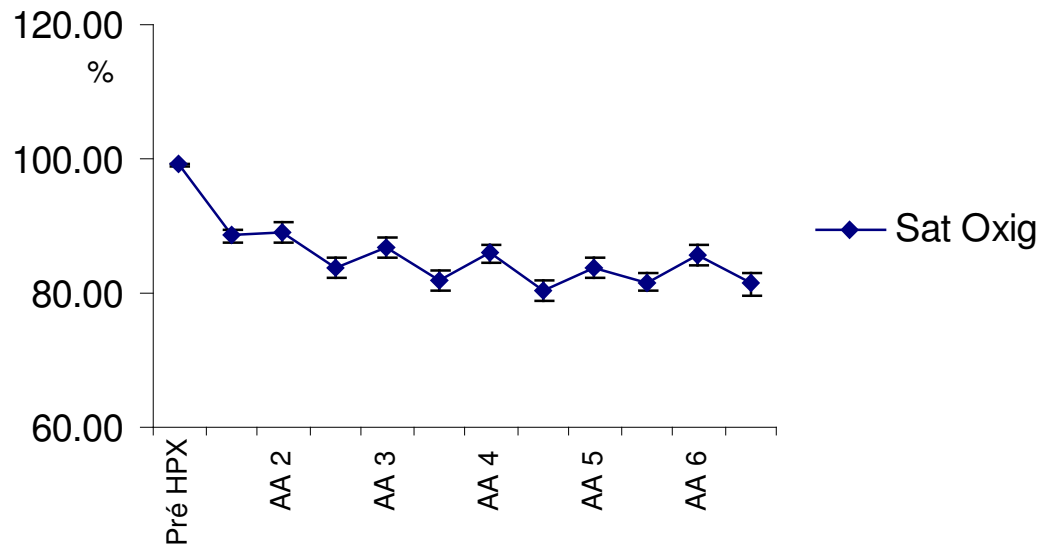
Verificamos que a saturação de oxigênio não retorna aos níveis de pré HPX, mas isto deve-se ao fato de que há um retardo de cerca de um minuto após a mudança de ar ambiente para hipóxia. Deste modo, no início de cada intervalo de hipóxia encontramos valores de saturação acima de 90%, porém tais valores são diluídos quando é calculada a média de cada intervalo. Os valores individuais podem ser visualizados no anexo x.

**Tabela 4:** Saturação de Oxigênio (%) durante o experimento (n=16)

AA1	99.13 ± 0,12
HPX1	88,51 ± 1,05
AA2	88.94 ± 1,51
HPX2	83,89 ± 1,44
AA3	86,78 ± 1,63
HPX3	81,79 ± 1,46
AA4	85,88 ± 1,40
HPX4	80,34 ± 0,47
AA5	83,88 ± 1,56
HPX5	81,61 ± 1,36
AA6	85.66 ± 1,49
HPX6	81.38 ± 1,72

HPX: hipóxia  
AA: ar ambiente

**Figura 7** Valores de saturação de oxigênio (%) durante o experimento



AA: ar ambiente

Conforme programado no protocolo, o CO<sub>2</sub>FE foi mantido estável em ao longo dos ciclos de respiração de ar ambiente e de hipóxia.

**Tabela 5:** Valores de gás carbônico durante o experimento (CO<sub>2</sub> FE), em mmHg. (n=16)

AA1	37,25 ± 0,02
HPX1	36,89 ± 0,01
AA2	35,25 ± 0,01
HPX2	36,21 ± 0,05
AA3	35,12 ± 0,03
HPX3	36,65 ± 0,08
AA4	36,85 ± 0,1
HPX4	39,54 ± 0,07
AA5	36,44 ± 0,09
HPX5	37,68 ± 0,08
AA6	36,85 ± 0,11
HPX6	36,89 ± 0,1

### 4.3. Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a contagem de células envolvidas na inflamação

#### 4.3.1 Células polimorfonucleares

A tabela 6 traz os resultados da contagem de células polimorfonucleares em câmara de Neubaer em voluntários antes e após a exposição à hipóxia, e em controles que não foram expostos à hipóxia, mas

que tiveram seu sangue coletado ao mesmo tempo. Entre parênteses estão os resultados normalizados para os obtidos anteriormente.

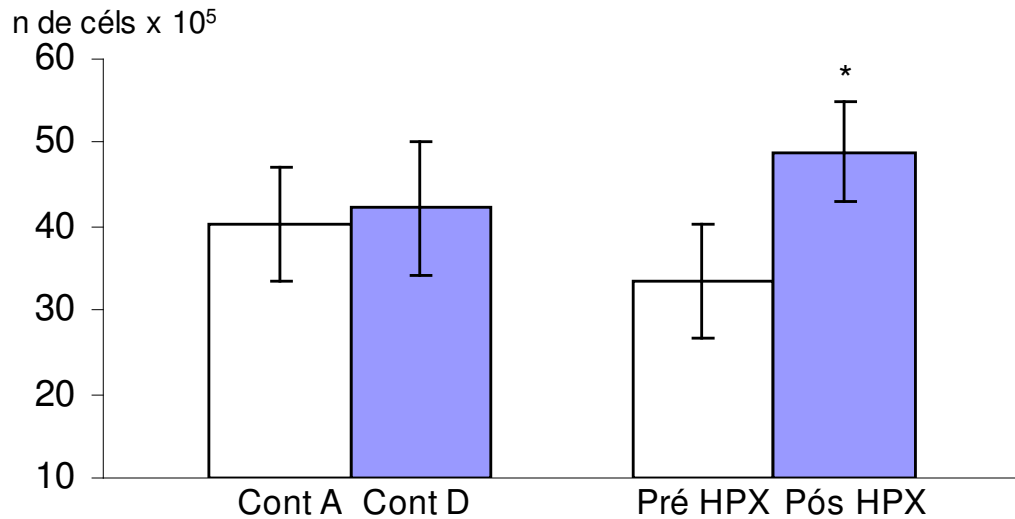
Verificamos que a hipóxia intermitente provocou um aumento expressivo e significativo no número de células polimorfonucleares. Se utilizarmos os dados normalizados, verificamos que a contagem dobrou em relação ao valor inicial.

Tabela 6: Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a contagem de células polimorfonucleares em voluntários e controles (n=16) (em número de células x 10<sup>5</sup>)

Controle antes	Controle após	Voluntário pré HPX	Voluntário pós HPX
40,21 ± 6,89	42,25 ± 8,04	33.43 ± 6,70	48.93 ± 6,05 *
(1)	(1,05 ± 0,05)	(1)	(2,30 ± 0,57)

Média ± ep  
 HPX- hipóxia  
 \*P < 0,05.

**Figura 8:** Efeito da hipóxia aguda sobre a contagem de células polimorfonucleares em voluntários antes (pré HPX) e após a hipóxia (pós HPX) e seus controles (Cont A e Cont D) (em número de células x 10<sup>5</sup>) (n=16)



\* p<0,05

#### 4.3.2. Células mononucleares

A tabela 7 traz os resultados da contagem de células mononucleares em câmara de Neubaer em voluntários antes e após a exposição à hipóxia, e em controles que não foram expostos à hipóxia, mas que tiveram seu sangue coletado ao mesmo tempo. Entre parênteses estão os resultados normalizados para os obtidos anteriormente.

Verificamos que a hipóxia intermitente provocou um aumento expressivo e significativo no número de células mononucleares. Se utilizarmos os dados normalizados, verificamos que a contagem aumentou em cerca de 50% o número de células, em relação ao valor inicial.



**Tabela 7 -** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a contagem de células mononucleares (n=16) (em número de células x 10<sup>5</sup>)

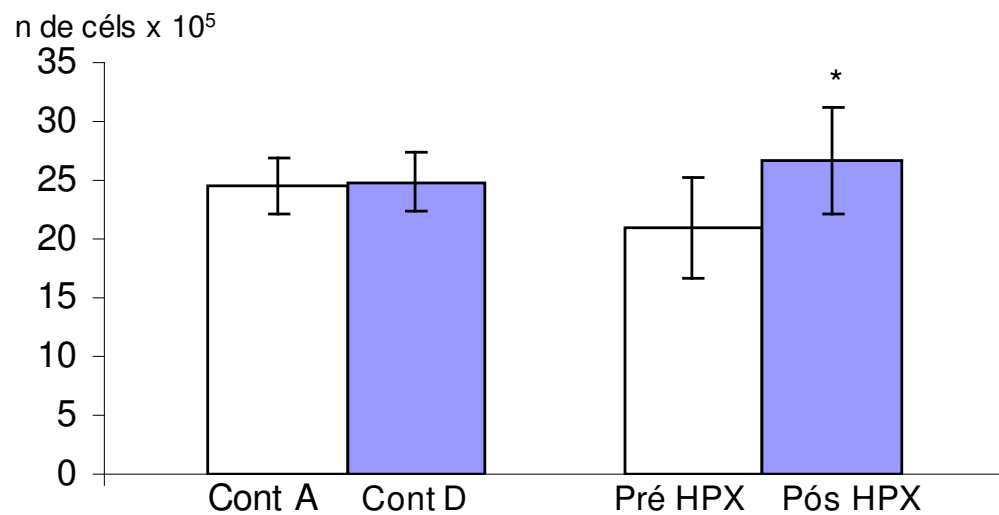
Controle antes	Controle após	Voluntário pré HPX	Voluntário pós HPX
24,53 ± 2,47	24,86 ± 2,41	21,02 ± 4,27	26,73 ± 4,49 *
(1)	(1,02 ± 0,02)	(1)	(1,54 ± 0,18)

média ± erro padrão.

HPX- hipóxia

\* p<0,05

**Figura 9:** Efeito da hipóxia aguda sobre a contagem de células mononucleares em voluntários antes (pré HPX) e após a hipóxia (pós HPX) e seus controles (Cont A e Cont D) (em número de células x 10<sup>5</sup>) (n=16)



\*p<0,05

#### 4.5. Liberação do ânion superóxido por células polimorfonucleares

A tabela 8 traz os resultados da dosagem do ânion superóxido em cultura de neutrófilos em voluntários antes e após a exposição à hipóxia, e em controles que não foram expostos à hipóxia, mas que tiveram seu sangue coletado ao mesmo tempo. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Verificamos que houve aumento significativo da geração do ânion superóxido em cultura de neutrófilos, no período pós hipóxia em relação ao pré hipóxia. A adição do PMA (acetato de forbol miristato) aumentou a geração do superóxido em controles e voluntários, conforme é esperado. O resultado da adição do PMA sobre a geração do superóxido é demonstrado na tabela 7. Verificamos que a hipóxia levou a um aumento da geração de ânion superóxido tanto no em neutrófilos estimulados quanto não estimulados com o PMA. Entre parênteses estão os resultados normalizados para os obtidos anteriormente.

Tabela 8: Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a geração de ânion superóxido em neutrófilos (n=15) (em unidade relativa de luz)

Cont A	Cont D	Pré HPX	Pós HPX
444.5 $\pm$ 73,16 (1)	395.88 $\pm$ 101 (0,93 $\pm$ 0,21)	469.3 $\pm$ 49,6 (1)	741.1 $\pm$ 135 (1,44 $\pm$ 0,1)

Média  $\pm$  ep

PMA: acetato de forbol miristato

HPX: hipóxia

\* p<0,05

Tabela 9: Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a geração de ânion superóxido em neutrófilos após a adição do PMA (n=15) (em unidade relativa de luz)

Cont A (PMA)	Cont D (PMA)	Pré HPX (PMA)	Pós HPX (PMA)
1227.93 ± 247 (3,35 ± 0.80)	1162 ± 265 (3,47 ± 0.99)	951 ± 216 (2.32 ± 0.39)	1576 ± 275 (3,36 ± 0,48) *

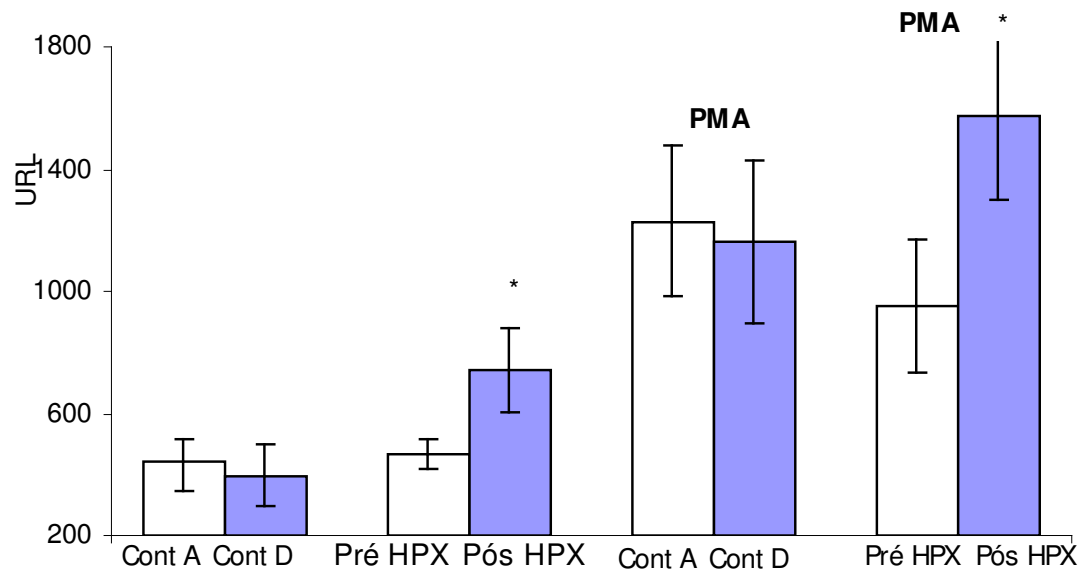
Média ± ep

PMA: acetato de forbol miristato

HPX: hipóxia

\* p<0,05

Figura 9: Liberação de superóxido em neutrófilos dos voluntários antes (Pré HPX) e após a hipóxia (Pós HPX) e seus controles (cont A e cont D), antes e após a adição do PMA (n=15), em unidades relativas de luz (URL)



HPX: Hipóxia

\* p=0,05 Pós HPX vs Pré HPX

#### 4.7.Repercussões da hipóxia aguda e intermitente sobre os níveis séricos da proteína C - reativa

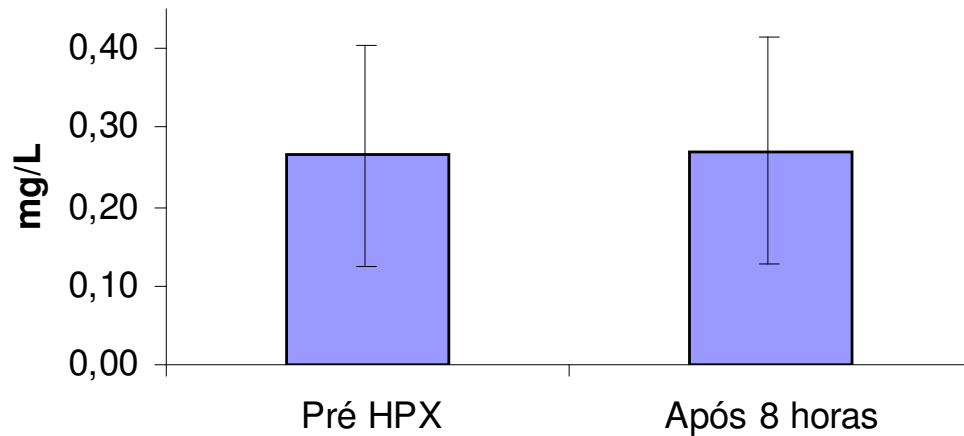
A tabela 9 traz os resultados das dosagens de PCR no soro coletados no período pré hipóxia e 8 horas após o término do experimento. Os resultados estão expressos conforme média e erro padrão, em mg/l. Entre parênteses estão os valores normalizados para os obtidos no período basal. No anexo x, podem ser verificados os valores individuais

Tabela 9 Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a dosagem da PCR na população estudada (n=16) (mg/l)

	BASAL	APÓS 8H
Média ± EP	0,26 ± 0,13	0,27 ± 0,14

P=NS

**Figura 10:** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre os níveis da PCR, em mg/l, nos períodos pré hipóxia e após 8 horas do final do experimento.



HPX: hipóxia  
P=NS.

#### **4.4. Resposta Cardiovascular**

##### **4.4.1. Pressão Arterial**

###### **Pressão arterial sistólica**

Os valores da pressão arterial sistólica de 11 dos 16 voluntários são mostrados na tabela 9. Não temos os valores de pressão sistólica de cinco voluntários devido a problemas técnicos na aferição do sinal em determinados intervalos.

Nota-se que houve aumento significativo da pressão arterial sistólica nos três primeiros ciclos de hipóxia, bem como no último intervalo, um incremento de 5 a 10%.

**Tabela 10:** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a pressão arterial sistólica (mmHg) (n=11)

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
Média ± ep	125 ± 3,94	135,6 ± 6,31*	137 ± 6,66*	133,8 ± 5,75*	133,3 ± 5,56	133,3 ± 5,56	136,1 ± 5,47*

mmHg- milímetros de mercúrio

HPX: hipóxia

\* p<0,05

### Pressão arterial diastólica

Os valores da pressão arterial diastólica de 11 dos 16 voluntários são mostrados na tabela 11. Nota-se que não houve aumento nos níveis de pressão arterial diastólica durante os intervalos de hipóxia em relação ao período pré hipóxia.

**Tabela 11:** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a pressão diastólica (mmHg) (n=11)

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
Média ± ep	72,5 ± 2,1	75,4 ± 2,1	74,8 ± 1,7	74 ± 1,4	72,8 ± 1,3	73,8 ± 2	75,98 ± 2,15

MmHg- milímetros de mercúrio

HPX: hipóxia

#### **4.4.2. Frequência Cardíaca**

A tabela 12 traz os resultados de frequência cardíaca de 14 entre 16 voluntários. Não temos os valores de frequência cardíaca de todos os voluntários devido a problemas técnicos na aferição do sinal em determinados intervalos.

Em relação ao período pré HPX há elevação dos valores de frequência cardíaca em todos os intervalos: HPX 1 ( $69,75 \pm 2,36$  vs  $79,95 \pm 3,53$ ;  $p < 0,05$ ), HPX 2 ( $69,75 \pm 2,36$  vs;  $82,42 \pm 3,49$ ;  $p < 0,05$ ), HPX 3 ( $69,75 \pm 2,36$  vs  $82,02 \pm 3,22$ ;  $p < 0,05$ ), HPX4 ( $69,75 \pm 2,36$  vs  $83,78 \pm 3,25$ ;  $p < 0,05$ ), HPX5 ( $69,75 \pm 2,36$  vs;  $82,95 \pm 3,33$ ;  $p < 0,05$ ) e HPX 6 ( $69,75 \pm 2,36$  vs;  $82,21 \pm 3,56$ ;  $p < 0,05$ ).

**Tabela 12:** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a frequência cardíaca (bpm) (n=16)

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
Média $\pm$ ep	$69,75 \pm 2,36$	$79,95 \pm 3,53$ *	$82,42 \pm 3,49$ *	$82,02 \pm 3,22$ *	$83,78 \pm 3,25$ *	$82,95 \pm 3,33$ *	$82,21 \pm 3,56$ *

bpm- batimentos por minuto

HPX: hipóxia

\*  $p < 0,05$ .

#### 4.4.3. Débito Cardíaco (DC) e Resistência Vascular Periférica (RVP)

A tabela 13 traz os resultados das medidas de débito cardíaco em 13 dos dezesseis voluntários. Não temos os valores de débito cardíaco de todos os voluntários devido a problemas técnicos na aferição do sinal em determinados intervalos.

Em relação ao período pré HPX há aumento dos valores de débito cardíaco em todos os intervalos: HPX 1 ( $5,59 \pm 0,20$  vs  $6,37 \pm 0,24$ ,  $p < 0,05$ ), HPX 2 ( $5,59 \pm 0,20$  vs  $6,37 \pm 0,24$ ,  $p < 0,05$ ), HPX 3 ( $5,59 \pm 0,20$  vs  $6,48 \pm 0,28$ ,  $p < 0,05$ ), HPX4 ( $5,59 \pm 0,20$  vs  $6,68 \pm 0,29$ ,  $p < 0,05$ ), HPX5 ( $5,59 \pm 0,20$  vs;  $6,46 \pm 0,33$ ,  $p < 0,05$ ) e HPX 6 ( $5,59 \pm 0,20$  vs  $6,46 \pm 0,33$ ,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 13:** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre o débito cardíaco (em L/min) (n=13)

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
Média ± ep	$5,59 \pm 0,20$	$6,37 \pm 0,24^*$	$6,48 \pm 0,28^*$	$6,6 \pm 0,29^*$	$6,68 \pm 0,29^*$	$6,46 \pm 0,33^*$	$6,46 \pm 0,33^*$

L/min- litros por minuto

HPX: hipóxia

\*  $p < 0,05$ .

A tabela 14 traz os resultados da resistência vascular periférica em 13 dos 16 voluntários. Em relação ao período pré HPX há diminuição dos valores de resistência vascular periférica nos intervalos de HPX 2 ( $1 \pm 0,03$  vs  $0,91 \pm 0,04$ ,  $p < 0,05$ ), HPX 3 ( $1 \pm 0,03 \pm$  vs  $0,88 \pm 0,05$ ,  $p < 0,05$ ), HPX 4 ( $1 \pm 0,03 \pm$  vs  $0,86 \pm 0,05$ ,  $p < 0,05$ ) e HPX 5 ( $1 \pm 0,03$  vs  $0,88 \pm 0,01$ ,  $p < 0,05$ ).



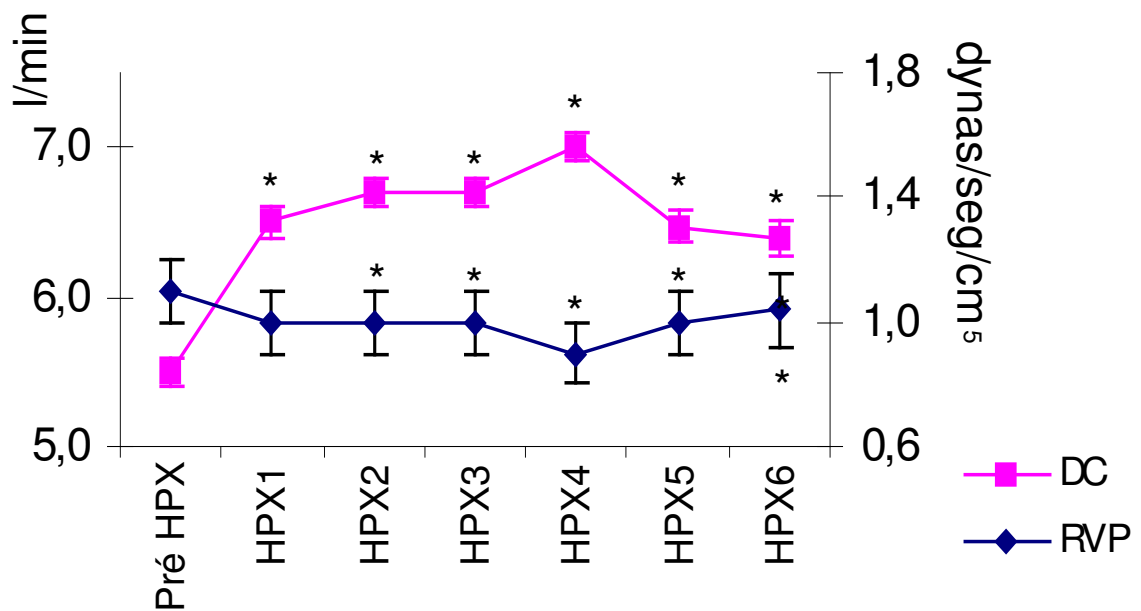
Tabela 14: Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a resistência vascular periférica (RVP) (em dynas/seg/cm<sup>5</sup>) (n=13)

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
Média ± ep	1 ± 0,03	0,91 ± 0,04	0,90 ± 0,04*	0,88 ± 0,05*	0,86 ± 0,05*	0,88 ± 0,01*	0,93 ± 0,06

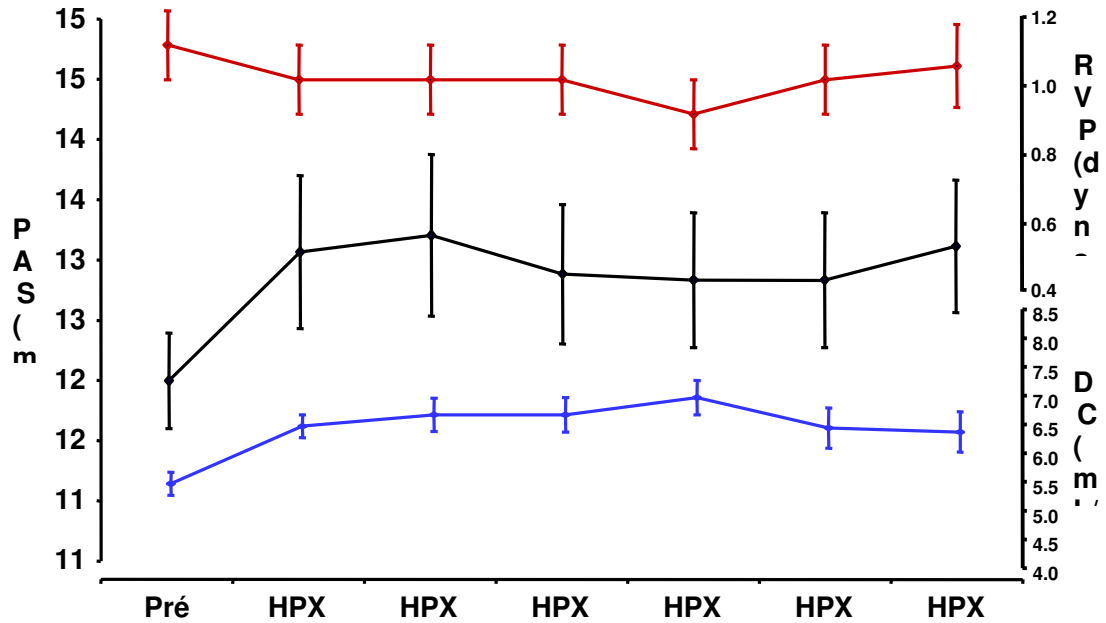
HPX- hipóxia

\* p<0,05.

Figura 11: Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre o débito cardíaco (DC) em L/min, e a a resistência vascular sistêmica (RVP), em dynas/seg/cm<sup>5</sup>. n=13.



**Figura 12:** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre o débito cardíaco (DC) em L/min, sobre a resistência vascular sistêmica (RVP), em dynas/seg/cm<sup>5</sup>, e sobre a pressão arterial (mmHg). n=13.



**Figura 13:** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a frequência cardíaca (FC) em bpm e a pressão arterial sistólica, em mmHg. Saturação de oxigênio em percentual. n=13.



#### 4.4.4. Resultado do efeito da hipóxia aguda e reoxigenação sobre a modulação autonômica - análise da VFC no domínio do tempo

##### a. Índice RMSSD

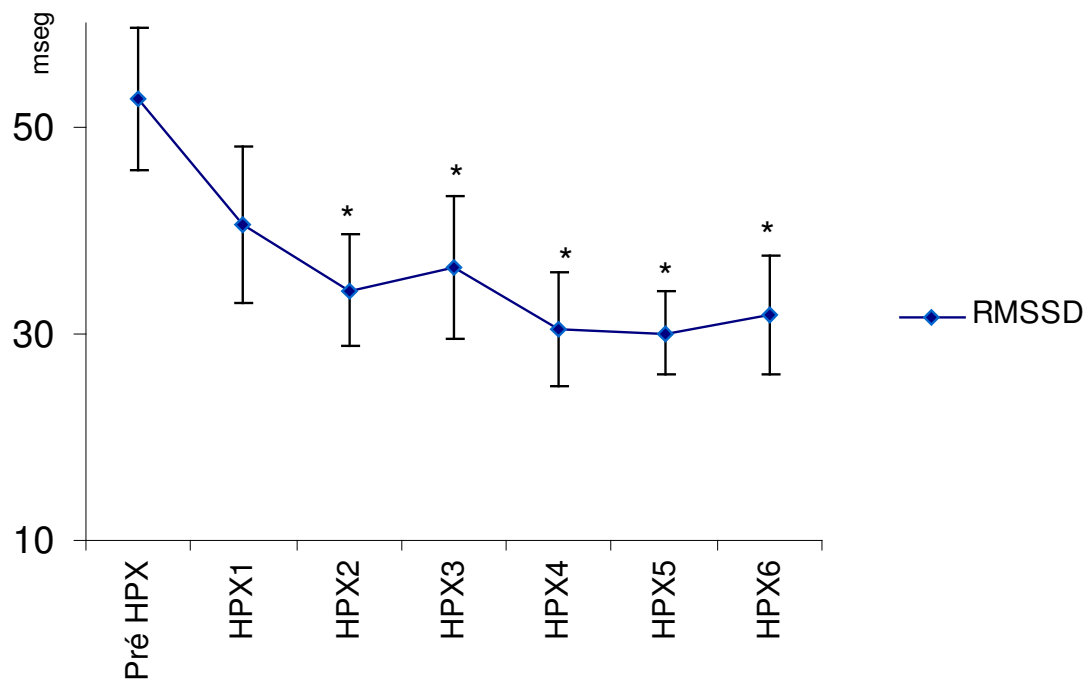
A tabela 15 e a figura 14 trazem os resultados dos valores do índice RMSSD durante os períodos de hipóxia. Verificamos que a exposição dos voluntários às hipóxias repetidas levou à diminuição da variabilidade da frequência cardíaca em relação ao período pré hipóxia, significativa, nos períodos de HPX2 ( $52.57 \pm 6,89$  vs  $34,16 \pm 5,44$ ,  $p < 0,05$ ), HPX3 ( $52.57 \pm 6,89$  vs  $36.37 \pm 6,85$ ,  $p < 0,05$ ), HPX4 ( $52.57 \pm 6,89$  vs  $30,37 \pm 5,52$ ,  $p < 0,05$ ), HPX5 ( $52.57 \pm 6,89$  vs  $30,04 \pm 4,03$ ,  $p < 0,05$ ) e HPX6 ( $52.57 \pm 6,89$  vs  $31,74 \pm 5,66$ ,  $p < 0,05$ ). Não houve alteração do índice RMSSD entre os períodos de hipóxia entre si. Houve correlação entre os valores do índice RMSSD e a saturação de oxigênio, conforme ilustrado na figura x.

**Tabela 15:** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a variabilidade da frequência cardíaca (índice RMSSD, em milissegundos) n=11.

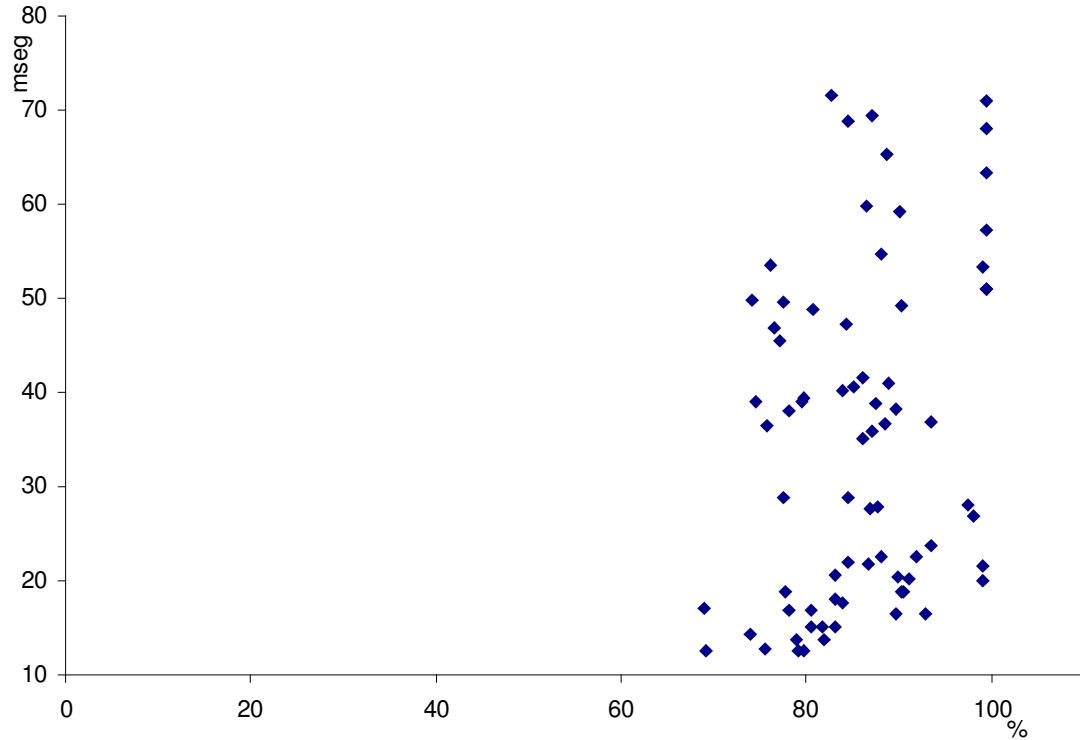
	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
Média ± ep	52,57 ± 6,89	40,53 ± 7,55	34,16 ± 5,44*	36,37 ± 6,85*	30,37 ± 5,52*	30,04 ± 4,03*	31,74 ± 5,66*

HPX: hipóxia  
Ep: erro padrão  
\* $p < 0,05$

**Figura 14:** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre a variabilidade da frequência cardíaca (índice RMSSD, em milissegundos) n=11.



**Figura 15:** Correlação entre o índice RMSSD, em milissegundos, e a saturação de oxigênio, em porcentagem em 11 voluntários ( $p < 0,05$ ).



#### 4.4.5. Resultado do efeito da hipóxia aguda e reoxigenação sobre a modulação autonômica no domínio da frequência

**4.4.5.1. Balanço autonômico:** o efeito dos ciclos de hipóxia e reoxigenação sobre o balanço autonômico para o coração é demonstrado na tabela 14.

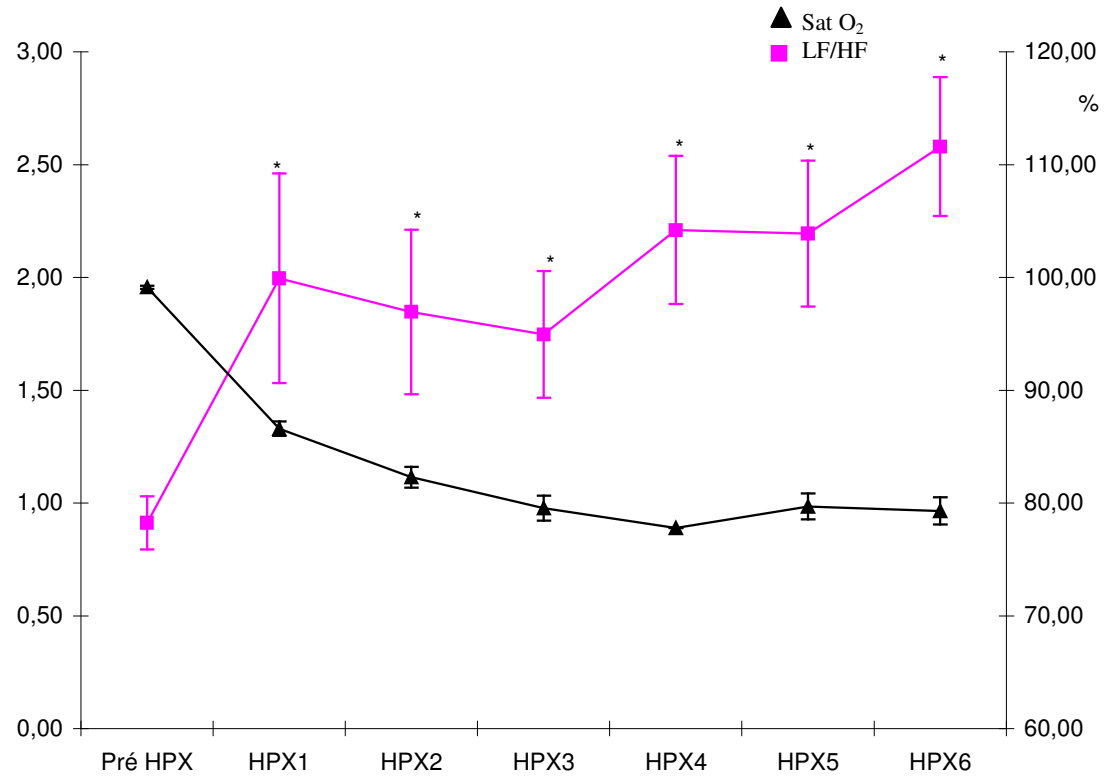
Verificamos que a hipóxia intermitente faz aumentar a razão entre o componente simpático e o parassimpático durante os intervalos de hipóxia em relação ao período pré- hipóxia, permanecendo elevado por todo o experimento, elevando-se ainda mais nos dois últimos intervalos. A diferença entre a razão de LF e HF entre o período pré-hipóxia e HPX1 é de

( $0,91 \pm 0,11$  vs  $1,99 \pm 0,46$ ,  $p < 0,05$ ), HPX2 ( $0,91 \pm 0,11$  vs  $1,84 \pm 0,36$ ,  $p < 0,05$ ), HPX3 ( $0,91 \pm 0,11$  vs  $1,74 \pm 0,28$ ,  $p < 0,05$ ), HPX4 ( $0,91 \pm 0,11$  vs  $2,21 \pm 0,32$ ,  $p < 0,05$ ), HPX5 ( $0,91 \pm 0,11$  vs  $2,19 \pm 0,32$ ,  $p < 0,05$ ), HPX6 ( $0,91 \pm 0,11$  vs  $2,58 \pm 0,30$ ,  $p < 0,05$ ). Não houve alteração entre os períodos de hipóxia entre si.

**Tabela 16:** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre o balanço autonômico (razão LF/HF) (n=11).

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
Média ± ep	0.91± 0.11	1.99± 0.46	1.84± 0.36	1.74± 0.28	2.21± 0.32	2.19± 0,3	2.58± 0.30

**Figura 16:** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre o balanço autonômico (razão LF/HF). n= 11

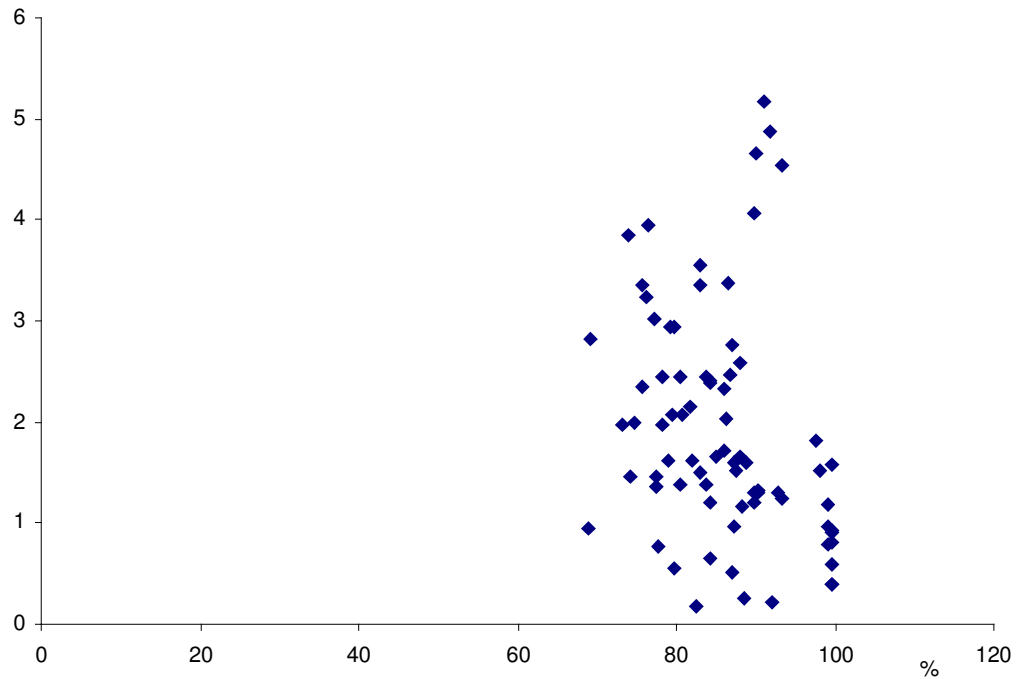


\*p<0,05

Verificamos que houve correlação positiva entre os valores de saturação de oxigênio e o balanço autonômico (Figura 17)



Figura 17: correlação entre o índice LF/HF e a saturação de oxigênio (%)



$p < 0,05$

#### 4.4.5.1. Percentual da banda de alta frequência (% HF) e baixa frequência (%LF) da variabilidade da frequência cardíaca

A tabela 17 traz os resultados do percentual do componente espectral de alta frequência (%HF) da frequência cardíaca. Verificamos que ao longo dos ciclos de hipóxia, o percentual da banda de HF vai é menor em relação ao basal (pré hipóxia) e nos intervalos de HPX 4 a 6 mais baixo em relação a HPX 1.

**Tabela 17:** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre o percentual da banda de alta frequência (% HF) da variabilidade da frequência cardíaca.

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
Média ±	54,32 ±	40,34 ±	40,66 ±	39,78 ±	36,20 ±	34,59 ±	31,03 ±
ep	3,30*	5,24*	5,04*	3,59*	5,49* †	3,51* †	3,90* †

ep= erro padrão

HPX= hipóxia

HF= high frequency (alta frequência)

\*P<0,05 vs pré HPX; † p<0,05 vs HPX 1.

#### 4.4.5.3. Percentual da banda de baixa frequência (% LF) da frequência cardíaca

A tabela 18 traz os resultados do percentual do componente espectral de baixa frequência (LF) da frequência cardíaca. Verificamos que nos primeiros ciclos de hipóxia não há alteração do percentual da banda de LF, enquanto que nos intervalos de HPX 5 e 6 ele torna-se significativo em relação ao período pré hipóxia.

**Tabela 18 :** Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre o percentual da banda de baixa frequência (% LF) da variabilidade da frequência cardíaca.

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
Média ±	45,68 ±	59,65 ±	59,33 ±	60,21 ±	63,79 ±	65,4 ±	68,96 ±
ep	3,30	5,24	5,04	3,59	5,49	3,51*	3,90*

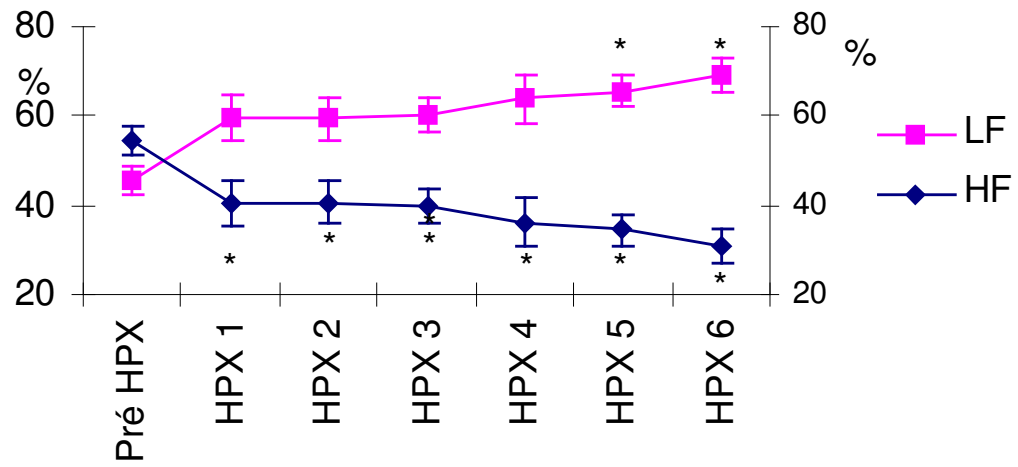
ep= erro padrão

HPX= hipóxia

LF= low frequency (baixa frequência)

\*P<0,05 vs pré HPX.

Figura 18: Efeito da hipóxia aguda e intermitente sobre o percentual das bandas de alta (%HF) e de baixa frequência (% LF) da variabilidade da frequência cardíaca



## **Discussão**

---

## 5. Discussão

Os dados apresentados ressaltam que a hipóxia intermitente e de relativa curta duração é estímulo suficiente para desencadear a ativação de alguns mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença cardiovascular vinculada à síndrome da apnéia do sono. Este efeito foi verificado em voluntários sadios, cujas respostas foram comparadas às do período pré experimento e para dados como contagem celular e geração de superóxido, comparados também com os obtidos em um controle igualmente sadio. Deve ser ressaltado também que a hipóxia/ reoxigenação induziu maior estresse oxidativo e promoveu aumento da contagem de células inflamatórias mesmo não acompanhada por outros elementos já descritos, como hipercapnia e os picos de ativação do simpático. Além disso, deflagrou importantes respostas hemodinâmicas e autonômicas.

**Células inflamatórias:** A influência da hipóxia/ reoxigenação sobre a contagem das células inflamatórias não fazia parte dos objetivos inicialmente, e o seu aumento foi um achado constatado quando da contagem prévia aos ensaios para dosagem de superóxido em cultura de células. O neutrófilo é uma das principais células envolvidas na injúria de reperfusão. Modelos experimentais de isquemia e reperfusão em artérias cerebrais demonstraram o aumento precoce da contagem leucocitária em áreas de reperfusão. (Hallenbeck et al., 1986) e o bloqueio da atividade leucocitária atenuou a injúria relacionada à reperfusão. (Groggaard et al., 1989).

Acreditamos que este aumento é devido, pelo menos em parte, à ativação adrenérgica deflagrada pela hipóxia. Alguns modelos de indução de estresse têm demonstrado a ocorrência de leucocitose em resposta a catecolaminas. Em ratos, a indução de hipervolemia por Nave et al (2000) levou ao aumento tanto da norepinefrina sérica quanto da contagem de neutrófilos e de linfócitos, o qual pôde ser prevenido pelo pré-tratamento dos ratos com um beta bloqueador ou com um alfa2- antagonista do simpático (ioimbina), ressaltando que o aumento da contagem leucocitária em resposta à adrenalina é mediado por receptores beta e alfa -adrenérgicos. Iversen et al (1994) verificaram o aumento de linfócitos (220%) e de neutrófilos (160%) em resposta à injeção de adrenalina em ratos. A resposta foi precoce (dentro de cinco minutos) e breve, retornando ao normal em 25 minutos após a injeção. Outros estudos demonstraram que as alterações da concentração de linfócitos ocorrem a partir do *pool* marginal e do baço, enquanto que neutrófilos provém principalmente do *pool* marginal e da circulação pulmonar (para referencias Benschop, 1996). O *pool* marginal é a fração não circulante de leucócitos, que permanece em contato com o endotélio (Coutinho e Coutinho, 2001).

Um outro modelo de exposição a catecolaminas que deflagra resposta de leucocitose é o exercício (Nielsen et al., 1997).

Em estudos que empregaram modelos de indução de hipóxia também foi observado aumento da contagem celular. Nestes estudos, porém, a hipóxia era acompanhada por uma estimulação bem acentuada do sistema nervoso simpático, por meio da apnéia. Bakovic et al (2005), utilizaram-se

de um modelo de indução de apnéia com imersão da face em água fria durante o máximo tempo suportado, seguida por dois minutos de intervalo, repetido cinco vezes consecutivas, em um estudo que envolveu mergulhadores profissionais, voluntários normais e voluntários esplenectomizados. Os autores verificaram aumento da contagem leucocitária tanto nos mergulhadores profissionais ( $14,9 \pm 3,1\%$ ) quanto nos voluntários normais ( $7,2 \pm 1,8\%$ ), enquanto que nos voluntários esplenectomizados houve aumento de pequena monta e tardio na contagem leucocitária.

Em nosso estudo, o aumento da contagem de neutrófilos foi bem expressivo, apesar de utilizarmos um modelo menos agressivo que os citados acima. Este dado nos permite concluir que a hipóxia aguda e reoxigenação é capaz de deflagrar resposta inflamatória, de modo análogo ao observado nos fenômenos de reperfusão seguindo a isquemia, e que este aumento é provavelmente mediado pela hiperatividade simpática.

#### Proteína C- Reativa (PCR)

Não houve alterações significantes na concentração da PCR. Em 07 pacientes houve aumento de seus níveis, em 05 houve decréscimo de seus níveis e em 05 pacientes não houve alteração de seus níveis. As explicações para este achado podem ser que a hipóxia aguda e reoxigenação de fato não levem a aumento nas concentrações da PCR ou que o tempo padronizado para a coleta não tenha possibilitado surpreender um possível aumento dos níveis desta proteína.

Não há muitos dados sobre a cinética da PCR no soro de humanos. Em um estudo, a concentração sérica da PCR em 13 indivíduos jovens e saudáveis foi investigada ao longo de 24 horas, obtendo-se amostras de sangue a cada 30-60 minutos em ambiente controlado, demonstrando-se que não há variação circadiana significativa em sua concentração (Meier-Ewert et al, 2001). Até recentemente este era o único estudo endereçando esta questão. Charuruks et al (2005) corroboraram estes resultados em um estudo que envolveu 364 indivíduos que tiveram amostras de sangue coletadas de forma seriada às 6h, 12h, 18h e 24h.

Mais recentemente, Rudnicka et al. (2007) estudaram a concentração sérica da PCR em 7669 indivíduos quanto à variação circadiana (coletando amostras entre 9h e 22h, porém não de um mesmo indivíduo), sazonal e quanto ao sexo do indivíduo. Os autores concluíram que existe variação circadiana significativa, e que o horário esperado de maior pico é o de 15 horas.

Vigushin et al. (1993) utilizaram-se da injeção de PCR marcada com iodo radioativo ( $^{125}\text{I}$ ) para determinar sua meia vida sérica em indivíduos saudáveis e pacientes acometidos por doenças inflamatórias, e concluíram que ela é de 19 horas.

Dados sobre a cinética da PCR em resposta a determinados estímulos geradores de inflamação endotelial são escassos. Em relação ao exercício físico, que é um estímulo capaz de gerar inflamação, com elevação moderada dos níveis das proteínas de fase aguda (Gabay e Kushner, 1999), não houve aumento dos seus níveis 2h após o final de um



ciclo de exercício extenuante , apesar de ter havido aumento substancial da IL-6, um dos principais estímulos para sua síntese pelo fígado (Czarkowska-Paczek et al, 2005). Em maratonistas que percorreram os 246km da corrida *Spartathlon* , Margeli et al. (2005) verificaram níveis de PCR muito aumentados (152 vezes o valor basal) logo após o término do exercício, permanecendo aumentados (108 vezes o valor basal) após 48h do término do exercício. Os demais mediadores da resposta inflamatória que foram dosados, como IL-6 e SAA, já haviam retornado aos valores basais naquele momento, apesar de terem sofrido um aumento de 8000 e de 100 vezes, respectivamente, em relação aos níveis basais.

Não conhecemos estudos em animais ou humanos sobre a cinética da PCR após o estímulo hipóxico agindo isoladamente. O horário padronizado para a coleta da PCR, que foi de 8h após o final do experimento (aproximadamente às 18h), baseou-se nos resultados dos experimentos piloto, que apontavam para um resultado significativo, além da dificuldade do voluntário em retornar ao laboratório por mais um dia.

#### Liberação de superóxido

Verificamos que os ciclos de hipóxia e reoxigenação é capaz de aumentar a liberação do ânion superóxido em cultura de neutrófilos, em células estimuladas e não estimuladas com o acetato de forbol miristato (PMA). O PMA é empregado com a finalidade de promover o *burst* oxidativo, ou seja, a liberação de uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio em células que tenham sido sensibilizadas por algum

estímulo, fenômeno conhecido como *priming*. *Priming* é o mecanismo no qual células dormentes adquirem um estado de pré-ativação, o qual permite uma resposta mais intensa quando em contato com um estímulo (Guthrie et al., 1984).

Verificamos que os neutrófilos de voluntários no momento após a hipóxia respondem de forma mais exuberante ao PMA, em relação ao basal, sugerindo que o experimento sensibiliza estas células para a produção aumentada de EROx.

Modelos de hipóxia crônica e intermitente, como o da SAOS, cursam com maior grau de estresse oxidativo vascular, conforme já citado. O tratamento da SAOS é eficaz em reverter este quadro, que contribui sobremaneira para a disfunção do endotélio. Nestes trabalhos, boa parte da população estudada era composta por indivíduos que sofriam de alguma doença geradora de disfunção endotelial, como hipertensão arterial e diabetes, além de indivíduos fumantes.

Um mecanismo possivelmente implicado na maior liberação de ânion superóxido em neutrófilos é a ativação simpática. Já foi ressaltado o papel da adrenalina e de agonistas adrenérgicos em desencadear estresse oxidativo em modelos de cultura celular (Costa Rosa et al., 1992) e modelos animais (Zhang et al., 2005), respectivamente.

Embora não ocorra isquemia e reperfusão em nosso modelo, como também não ocorre na SAOS, alguns dados obtidos neste trabalho se assemelham aos elementos fisiopatológicos integrantes do fenômeno

isquemia-reperfusão, ressaltando o conceito de que a hipoxemia e reoxigenação sistêmicas de fato mimetizam o fenômeno de isquemia e perfusão e que provocam alterações envolvidas na fisiopatologia da doença cardiovascular associada à SAOS.

Concluimos que a hipóxia e reoxigenação aplicada a indivíduos saudáveis é deflagradora da maior geração de resposta oxidativa em neutrófilos, mesmo isolada de outros elementos fisiopatogênicos da SAOS, como a hipercapnia e os picos de liberação simpática. Esta promoção de maior estresse oxidativo pode estar implicada na fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica, aterosclerose associadas à SAOS.

#### Hemodinâmica e dados neurovegetativos

Quanto aos dados hemodinâmicos, verificamos que nosso modelo induziu o aumento pressórico em relação ao período pré hipóxia, e este aumento foi sustentado durante os seis ciclos de hipóxia, sendo discretamente atenuado nos intervalos de HPX4 e HPX5, por influência da queda da resistência vascular periférica. A elevação do débito cardíaco é que provocou a elevação da pressão arterial, embora houvesse queda da resistência vascular periférica que, em parte, contrabalançaram a elevação do débito cardíaco.

Estas alterações hemodinâmicas foram acompanhadas de um predomínio da atividade simpática, verificada já no primeiro intervalo de hipóxia, que se manteve elevada por todo o período do experimento, com máxima resposta ao final. Esta alteração correlacionou-se significativamente

com os níveis de saturação de oxigênio. Além disso, a variabilidade da frequência cardíaca também sofreu queda, apontando para uma menor contribuição do vago em resposta ao estímulo de hipóxia. Tais alterações ocorreram em resposta a níveis de saturação de oxigênio de no mínimo 62%, com o indivíduo respirando (ou seja, com a influência da respiração na modulação vagal atuante). Pacientes com a SAOS costumam ter hipoxemia em resposta à apnéia, que por si só incrementa a atividade simpática, além do que a duração da apnéia pode durar quase um minuto, e a saturação de oxigênio pode atingir 40%. Ou seja, detectamos alterações na modulação autonômica para o coração que constituem um marcador de mau prognóstico, e estas alterações foram detectadas em um modelo muito menos agressivo que o da SAOS.

### **Limitações do estudo**

No desenvolver deste trabalho nossa intenção era acrescentar um grupo *sham* que, após randomização, se submeteria a todo o protocolo do experimento, porém receberia ar ambiente pelo sistema durante todo o protocolo, sem hipóxia. A dificuldade de captação de voluntários não permitiu a inclusão deste grupo.

No entanto, o voluntário aqui foi controle dele mesmo, e os resultados obtidos com a coleta após o experimento puderam ser comparados com o tempo inicial. Ademais, boa parte das dosagens de mediadores inflamatórios tiveram amostra controle nos dois períodos de sua coleta, o que diminuiu a falta do grupo *sham*.

### **Trabalhos futuros**

Uma vez demonstrada a eficácia do esquema experimental desenvolvido nesta tese em desencadear resposta inflamatória, iremos prosseguir explorando este modelo e testá-lo em outras populações, como por exemplo pacientes obesos, que têm propensão para o desenvolvimento da síndrome da apnéia do sono e pacientes que já sofrem da síndrome da apnéia do sono. Além disso, podemos testar a influência de determinados fármacos, como beta-bloqueadores e/ou estatinas sobre o desencadeamento das alterações aqui descritas.

### **Sumário e conclusões**

Este trabalho contribuiu para o conhecimento das alterações cardiovasculares presentes na SAOS ao criar uma modelo original de indução de hipóxia e reoxigenação. A análise dos dados obtidos a partir deste modelo mostraram que:

1. A hipóxia aguda e reoxigenação é capaz de deflagrar aumento do número de células envolvidas na inflamação e na injúria de reperfusão. O número de células polimorfonucleares dobrou em relação ao valor inicial logo após a hipóxia, e o de células mononucleares teve acréscimo de 50%. Não houve alteração no número de células inflamatórias dos controles de cada experimento.

2. A hipóxia aguda e reoxigenação é capaz de deflagrar aumento do estresse oxidativo, traduzido por um aumento da geração do ânion superóxido em neutrófilos. Os valores iniciais eram de  $469,3 \pm 49,6$  e atingiram  $741,1 \pm 135$ , ( $p < 0,05$ ) ao final do experimento. Nos controles não houve aumento em relação ao período anterior.

3. A hipóxia aguda e reoxigenação gera alterações na modulação autonômica para o coração, caracterizada por um predomínio do componente simpático sobre a atividade neural, que perpetuou-se durante os ciclos sucessivos de hipóxia.

Os dados permitem concluir que o modelo de hipóxia intermitente que foi padronizado é útil para detectar alterações precoces no controle neurovegetativo e no estresse oxidativo provocados pela hipóxia.

**Anexos**

---

## Anexo A: Dados clínicos da população estudada

	Idade (a)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	IAH (/h)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
MM	27	69	1,70	23,88	3,2	129.0	76.
EB	32	68	1,80	20,99	0,2	132.5	94,96
JM	32	69	1,74	22,79	3,7	121.9	72.1
ST	19	71	1,75	23,02	0,9	114.4	68.3
RN	28	60	1,58	24,15	4	115.1	64.8
GG	33	61	1,64	22,68	1,1	125.4	76.6
SA	48	67	1,65	24,61	3	135.5	74.8
AL	48	69	1,67	24,74	0,9	123.6	81.6
IC	46	54	1,60	21,09	0,7	147.7	81.8
MJ	33	48	1,60	18,75	2	111.7	65.9
EZ	42	59	1,59	23,34	2	105.2	62.3
MA	31	70	1,75	22,86	0	106.9	89.8
IP	28	62	1,80	19,14	0	103.2	70.9
BS	27	55	1,61	21,22	3	125.7	59,91
RO	28	59	1,70	20,42	0,2	106.9	66,4
EF	39	66	1,69	23,11	4	135.1	68,9
Média ± ep	33.8 ± 2,1	62.9 ± 1,6	1.67 ± 0,01	22.46 ± 0,45	1,80±0,3	113,56 ±3	74,14 ±2,8



## ANEXO B: Dados laboratoriais da população estudada

	Col (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	LDL-c (mg/dl)	TG (mg/dl)	Glicemia (mg/dl)
MM	182	38	123	104	94
EB	215	35	141	197	100
JM	138	41	81	79	89
ST	135	35	83	85	87
RN	131	32	84	75	84
GG	148	38	94	79	85
AS	158	57	94	36	84
AL	154	62	85	33	99
IC	155	58	83	74	95
MJ	158	56	84	91	97
EZ	158	54	84	102	93
MA	186	41	127	89	105
IP	159	53	97	43	98
BS	161	46	92	114	80
RO	195	52	123	100	94
EF	139	36	91	58	114
Média ± ep	160 ± 5,60	45,88 ± 2,41	97,88 ± 4,67	84,9 ± 9,34	93,62 ± 2,13

ANEXO C: Valores de saturação de oxigênio (SpO<sub>2</sub>) durante o experimento (média de cada minuto)

	MM	EB	JM	ST	RN	GG	SA	AL	IC	MJ	EZ	MA	IRI	BR	RO	EF
AA 1 (1)	100	99	100	99	100	100	99	99	99	99	99	98	99	99	98	99
AA 1 (2)	99	100	99	99	99	99	100	99	99	100	100	98	99	99	98	99
HPX 1 (1)	90	91	100	99	99	97	100	98	86	97	92	92	93	91	98	92
HPX 1 (2)	89	78	92	97	92	92	91	90	90	93	92	88	91	87	97	92
HPX 1 (3)	87	78	92	91	81	90	81	91	85	83	91	86	91	84	98	91
HPX 1 (4)	88	75	91	85	83	85	79	86	85	81	90	83	90	80	98	90
HPX 1 (5)	85	70	89	81	77	83	78	87	89	81	90	83	89	78	96	90
AA 2 (1)	76	78	86	78	75	83	72	85	90	88	88	92	97	78	99	96
AA 2 (2)	94	92	87	94	82	95	88	92	96	96	93	93	98	88	99	98
HPX 2 (1)	96	88	90	97	87	93	95	96	84	95	90	77	93	92	96	90
HPX 2 (2)	77	86	93	96	90	93	92	94	73	92	87	79	88	81	94	87
HPX 2 (3)	73	78	86	82	84	90	78	90	69	91	86	79	86	76	91	86
HPX 2 (4)	66	76	84	79	83	85	71	83	71	81	90	75	89	70	91	86
HPX 2 (5)	62	70	84	82	74	82	68	88	69	73	85	79	87	70	87	85
AA 3 (1)	85	82	82	76	75	80	65	86	90	94	85	95	84	78	88	85
AA 3 (2)	94	92	85	91	83	95	71	89	95	96	95	91	93	88	94	95
HPX 3 (1)	93	94	92	90	93	98	94	93	85	94	94	89	95	90	97	94
HPX 3 (2)	76	79	93	95	93	94	91	91	70	80	85	81	87	82	94	85
HPX 3 (3)	67	73	86	90	79	82	81	79	68	74	82	79	83	75	86	82
HPX 3 (4)	67	73	87	88	77	82	69	77	60	69	81	78	81	71	83	81
HPX 3 (5)	67	69	86	88	69	81	64	75	62	66	80	76	80	68	81	80
AA 4 (1)	87	80	83	82	67	79	67	72	91	91	85	88	83	84	81	85
AA 4 (2)	91	89	87	84	82	91	83	88	97	96	94	90	93	89	95	94
HPX 4 (1)	78	86	93	87	90	95	93	95	82	95	95	86	95	92	96	95
HPX 4 (2)	66	76	93	91	94	84	96	85	68	83	84	79	84	82	90	84
HPX 4 (3)	61	71	86	80	81	80	86	78	67	74	80	79	81	77	84	80
HPX 4 (4)	65	68	87	76	75	78	73	73	66	69	79	77	79	73	82	79
HPX 4 (5)	65	72	83	76	74	76	77	79	63	65	77	74	80	72	81	77
AA 5 (1)	71	78	82	78	76	83	67	70	85	76	83	84	86	68	80	83
AA 5 (2)	95	93	85	90	92	96	69	81	96	90	94	90	92	81	96	94
HPX 5 (1)	91	88	91	94	96	98	86	87	85	90	95	85	95	93	97	95
HPX 5 (2)	79	78	94	96	87	91	88	92	72	83	84	80	91	83	97	84
HPX 5 (3)	74	74	82	89	74	80	71	77	71	77	81	78	89	77	94	81
HPX 5 (4)	69	78	82	87	65	78	64	74	77	69	79	74	84	72	90	79
HPX 5 (5)	70	76	81	82	69	74	62	73	73	69	80	74	76	66	89	80
AA 6 (1)	85	86	79	87	68	82	69	71	91	79	86	88	86	78	91	86
AA 6 (2)	92	92	86	84	79	93	81	84	96	92	92	90	92	88	96	92
HPX 6 (1)	80	87	94	92	90	99	92	94	84	90	95	85	93	91	97	95
HPX 6 (2)	71	80	92	95	90	95	94	83	73	82	91	80	91	78	95	91
HPX 6 (3)	67	77	87	86	81	87	71	74	65	71	89	80	89	71	87	89
HPX 6 (4)	66	72	83	86	79	78	63	74	64	68	84	77	84	68	87	84
HPX 6 (5)	62	75	88	85	80	76	61	71	64	68	76	77	76	65	83	76

Anexo D: Contagem de células polimorfonucleares em voluntários, antes e após a hipóxia, e em seus controles

	Controle antes	Controle após	Voluntário pré HPX	Voluntário pós HPX
MM	44	49	50	61
EB	22,4	20	29	44
JM	15	15	11	30
ST	60	40	16	62
RN	31	51	138	5
GG	125	150	50	75
AS	34	34	10	60
AL	40	41	17	30
IC	25	45	5	47
MJ	37	38	40	49
EZ	20	23	37	39
MA	34	40	17	22
IP	30	30	27	32
BS	18	19	36	39
RO	29	27	17	19
EF	33	30	59	56
Media ± EP	40,21 ± 6,89	42,25 ± 8,04	33,43 ± 6,70	48,93 ± 6,05

Anexo D: Contagem de células mononucleares em voluntários, antes e após a hipóxia, e em seus controles

	Controle antes	Controle após	Voluntário pré HPX	Voluntário pós HPX
MM	10	8,6	1,4	2,4
EB	21	22	49	15
JM	18	14	6,4	21
ST	22	27	16	24
RN	19	23	23	53
GG	20	21	12	16
SA	20	20	22	37
AL	34	33	9	15
IC	23	22	37	39
MJ	51	50	21	29
EZ	26	24	66	76
MA	10	11	12	15
IP	15	14	8	10
BS	25	27	14	18
RO	36	33	13	15
EF	28	32	7	18
Media ± EP	24,53 ± 9,90	24,86 ± 9,67	21,02 ± 17,09	26,73 ± 17,96

## Anexo F: Dosagem do ânion superóxido em células polimorfonucleares

	Controle antes	Controle após	Voluntário pré HPX	Voluntário pós HPX
EB	391	360	319	287
JM	1109	212	279	232
ST	471	279	330	319
RN	383	363	334	359
GG	395	406	531	535
SA	351	1726	345	396
AL	332	802	319	341
IC	316	311	485	623
MJ	313	266	529	549
EZ	355	287	339	574
MA	329	317	353	424
IP	338	375	318	366
BS	366	332	366	635
RO	338	375	318	366
EF	1201	904	1046	2392
Media ± EP	445.5 ± 73,16	395,88 ± 101	469,3 ± 49,6	741,1 ± 135

Anexo G: Dosagem da PCR<sub>us</sub> nos períodos pré e pós hipóxia (mg/l)

	Pré HPX	Após 8h
MM	0,02	0,02
EB	0,02	0,02
JM	0,04	0,04
ST	0,13	0,15
RN	0,1	0,12
GG	0,08	0,08
SA	0,04	0,05
AL	0,10	0,14
IC	0,05	0,05
MJ	0,07	0,06
EZ	0,06	0,05
MA	0,19	0,18
IP	0,79	0,81
BS	0,09	0,06
RO	0,22	0,18
EF	2,23	2,31
Media ± EP	0.26 ± 0,13	0.27 ± 0,14

## Anexo H: Valores individuais de pressão sistólica (mmHg)

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
RN	123.6	127.5	129.0	128.6	129.9	128.7	128.2
GG	135.1	152.9	147.4	140.2	130.3	116.1	147.6
SA	105.2	135.7	136.5	140.0	133.3	138.5	140.9
AL	132.5	188.8	199.0	193.8	188.9	184.1	182.8
IC	125.4	125.5	138.8	137.0	131.0	138.8	142.8
MJ	147.7	144.2	135.0	139.6	137.6	128.2	135.2
EZ	121.9	119.6	123.4	115.9	121.3	121.8	119.3
MA	111.7	127.5	129.0	128.6	129.9	128.7	128.2
IP	129.0	112.7	115.6	120	117.8	120.8	118.9
BS	106.9	123.1	125.2	126.3	125.8	123.8	123.1
RO	135.5	134.0	137.1	138.3	126.6	136.7	129.9
Média ± ep	125 ± 3,94	135.6 ± 6,31	137 ± 6,66	133.8 ± 5,75	133,3 ± 5,56	133,3 ± 5,56	136,1 ± 5,47

## Anexo I: Valores individuais de pressão diastólica (mmHg)

	Pré HPX	HPX1	HPX2	HPX3	HPX4	HPX5	HPX6
RN	72.6	75.1	74.5	73.6	72.5	59.9	87.89
GG	62.3	77.9	76.9	78.1	75.6	77.9	76.36
SA	76.6	77.3	75.4	79.9	79.8	83.0	79.2
AL	70.9	70.4	68.2	66.1	66.9	85.5	85.21
IC	81.8	83.0	81.0	80.2	77.7	76.9	79.45
MJ	72.1	70.7	72.4	71.2	70.3	71.4	70.28
EZ	89.8	95.8	89.7	80.8	81.2	80.2	80.48
MA	64.8	66.1	67.1	66.8	64.8	66.4	72.42
IP	63.5	67.2	70.1	69.5	68.1	66.4	66.49
BS	68.3	68.9	69.3	71.0	69.9	69.4	67.44
RO	74.8	77.0	78.0	76.8	74.0	74.9	70.56
Média ± ep	72,5 ± 2,1	75,4 ± 2,1	74,8 ± 1,7	74 ± 1,4	72,8 ± 1,3	73,8 ± 2	75,98 ± 2.15

## Anexo J: Valores individuais de frequência cardíaca

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
MM	75,4	79	77,1	82,2	81,4	81,2	83,36
EB	67.2	65.8	68.3	72.1	70.5	70.1	66.77
JM	80.4	93.6	96.7	94	95	101.4	98.08
ST	67.6	73.9	79	79.4	81.9	79.2	77.41
RN	70.2	109.9	100	96.3	98.6	94.5	96.76
GG	62.6	64.9	69.7	66	70.2	67.2	61.22
SA	76.3	84.9	83.7	87.5	91.2	95.7	94.91
AL	83.9	90.8	105.1	104	106.6	98.3	98.77
IC	58	63.7	68.2	69.5	69.2	70.3	67.04
MJ	79.6	83.6	97.9	87.2	90.2	90.5	91.2
EZ	60	86.7	78.3	86.1	90.3	87.1	85.77
IP	64.4	70	80.2	80.8	82.7	78.5	81.77
BS	56.3	68.1	64.6	60.4	66.1	61.6	62.89
RO	74.7	84.5	85.1	82.9	79.1	85.7	85.05
EF	75.4	79	77.1	82.2	81.4	81.2	83.36

## Anexo L: Valores individuais de débito cardíaco (L/min)

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX4	HPX 5	HPX 6
JM	6,4	6,7	6,6	7,2	7,5	7,4	7,71
ST	5,4	5,4	5,8	6	5,9	4,5	4,98
RN	5,1	5,5	6,1	6,1	6,2	6	6,05
GG	5,9	6,1	6,1	5,8	6,1	5,8	5,41
AS	4,7	5,6	5,7	6,1	6,4	7	6,64
AL	5,9	6,1	6,1	6,7	6,1	5,8	6,14
IC	5,4	5,9	6,3	6,5	6,6	6,6	6,18
MJ	6,8	7,3	7,8	7,4	8	7,9	7,79
EZ	4,8	7	6,2	6,7	6,3	6,3	6,01
MA	5,8	7,7	8,2	8,3	8,6	8,1	8,36
IP	4,3	5,1	4,5	4	4,4	4,1	4,14
BS	6,6	8	8,2	8,2	7,8	8,1	8,17
RO	5,6	6,5	6,7	6,8	7	6,5	6.45
Média ± ep	5,59 ± 0,20	6,37 ± 0,20	6,48 ± 0,29	6,60 ± 0,30	6,68 ± 0,30	6,46 ± 0,35	6,46 ± 0,35

## Anexo M: Valores individuais de resistência vascular periférica

(dynas/seg/cm<sup>5</sup>)

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
JM	1	0,9	0,9	0,9	0,8	0,8	0,78
ST	1,1	1,1	1	1	1	1	0,4
RN	0,8	0,6	0,5	0,5	0,4	0,5	0,64
GG	1	1,1	1	1	1	1	1,02
AS	1	1	1	1,1	1,1	1,1	1,16
AL	1	0,9	0,9	0,8	0,8	0,9	0,93
IC	1,1	1,1	1	1	1	1	1,02
MJ	1	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8	0,86
EZ	1	1	0,9	0,8	0,8	0,8	0,78
MA	1,1	0,8	0,9	0,8	0,8	0,8	0,86
IP	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,65
BS	0,2	1	1,2	1,3	1,2	1,3	1,27
RO	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,73
Média ± ep	1 ± 0,03	0,91 ± 0,04	0,9 ± 0,04	0,88 ± 0,05	0,86 ± 0,05	0,88 ± 0,05	0,93 ± 0,06

## Anexo N: Valores individuais do balanço autonômico (LF/HF)

	Pré HPX	HPX 1	HPX 2	HPX 3	HPX 4	HPX 5	HPX 6
AL	1,18	1.31	1.3	1,5	1,61	2.45	2.95
EF	0.78	5.18	2.46	1.2	3.36	1.39	2.16
EZ	0.6	1.24	1.51	2.4	3.55	2.44	2.77
EB	1.57	2.38	2.08	1.46	1.99	2.33	1.97
GG	0.4	0.22	0.26	1.59	0.17	0.65	0.51
IC	0.97	1.32	1.97	0.95	2.82	3.36	3.84
JM	0.4	1.32	0.97	1.65	1.16	1.71	1.59
MJ	0.92	1.31	0.77	1.39	1.61	2.45	2.95
MM	0.9	4.66	2.04	3.94	3.01	1.37	2.34
RO	1.51	1.82	4.88	2.59	3.37	4.53	4.07
SA	0.8	1.2	2.08	0.55	1.66	1.46	3.23
Média ± ep	0.91 ± 0.11	1.99 ± 0.46	1.84 ± 0.36	1.74 ± 0.28	2.21 ± 0.32	2.19 ± 0.32	2.58 ± 0.30

Anexo O: Influência da hipóxia aguda e intermitente sobre a variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo, aferida pelo índice RMSSD  
(n=11)

	Pré HPX	HPX1	HPX2	HPX3	HPX4	HPX5	HPX6
AL	53.34	16.48	18.82	15.07	13.77	16.96	12.55
EF	20.02	20.27	27.72	21.97	18.05	17.63	15.06
EZ	51.05	36.89	27.82	28.74	20.68	40.14	35.88
EB	70.89	68.91	38.98	49.67	39.05	41.48	38.13
GG	57.31	93.51	65.39	89.11	71.66	47.29	69.42
IC	21.51	18.75	8.3	17.02	12.56	12.79	14.22
JM	51.02	49.13	38.88	54.68	36.62	35.01	40.92
MJ	63.34	16.48	18.82	15.07	13.77	16.96	12.55
MA	95.03	59.29	59.81	46.79	45.54	28.78	36.55
RO	26.89	28	22.47	22.54	21.79	23.64	20.41
SA	67.95	38.16	48.83	39.43	40.59	49.77	53.54
Média ± ep	52,57 ± 6,89	40,53 ± 7,55	34,16 ± 5,44	36,37± 6,85	30,37 ± 5,52	30,04 ± 4,03	31,74 ± 5,66



Anexo P: Influência da hipóxia aguda e intermitente sobre o componente de alta frequência (%HF)

	Pré HPX	HPX1	HPX2	HPX3	HPX4	HPX5	HPX6
AL	45,84	43,26	43,41	33,95	38,36	29,03	25,35
EF	56,23	16,19	28,91	45,39	22,93	41,91	31,63
EZ	62,38	44,69	39,88	29,42	21,98	29,07	26,52
EB	38,92	29,62	32,43	40,61	33,48	30,02	33,72
GG	71,63	81,75	79,34	38,63	85,34	60,67	66,12
IC	50,66	43,13	33,62	51,24	26,18	22,93	20,66
JM	71,49	43,18	50,81	37,77	46,30	36,88	38,67
MJ	52,12	43,26	56,59	41,87	38,36	29,03	25,35
MA	52,72	17,67	32,91	20,25	24,91	42,19	29,98
RO	39,90	35,47	17,01	27,85	22,90	18,09	19,71
SA	55,65	45,53	32,44	64,64	37,54	40,68	23,65
Média ± ep	54,32 ± 3,30	40,34 ± 5,24	40,66 ± 5,04	39,78 ± 3,59	36,20 ± 5,49	34,59± 3,51	31,03 ± 3,90

## **Referências**

---

**Referências:**

Angele MK, Schwacha MG, Smail N, Catania RA, Ayala A, Cioffi WG, Chaudry IH. Hypoxemia in the absence of blood loss upregulates iNOS expression and activity in macrophages. *Am J Physiol* 1999; 276(2 Pt 1): C285-90.

Albert CM, MA J, Rifai N, Stampfer MJ, Ridker PM. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation* 2002; 105 (22): 2595-9.

Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures. Polysomnography Task Force, American Sleep Disorders Association Standards of Practice Committee. *Sleep*. 1997; 20(6):406-22.

Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS LETT* 1992; 307(1): 97-101.

Bakovic D, Eterovic D, Saratlija-Novakovic Z, Palada I, Valic Z, Bilopavlovic N, Dujic Z. Effect of human splenic contraction on variation in circulating blood cell counts. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32(11): 944-51.

Barreto-Filho JA, Consolim-Colombo FM, Guerra-Riccio GM, Santos RD, Chacra AP, Lopes HF, Teixeira SH, Martinez T, Krieger JE, Krieger EM. Hypercholesterolemia blunts forearm vasorelaxation and enhances the pressor response during acute systemic hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1660-6.

Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91(9): 2488-96.

Bilchick KC, Fetis B, Djoukeng R, Fisher SG, Fletcher RD, Singh SN, Nevo E, Berger RD. Prognostic value of heart rate variability in chronic congestive heart failure (Veterans Affairs' Survival Trial of Antiarrhythmic Therapy in Congestive Heart Failure). *Am J Cardiol* 2002; 90 (1): 24-8.

Bigger JT, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN. Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation* 1992; 85(1): 164-71.

Block AJ, Boysen PG, Wynne JW, Hunt LA. Sleep apnea, hypopnea and oxygen desaturation in normal subjects. A strong male predominance. *N Engl J Med* 1979; 300(10): 513-7.

Boyum A Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968; 97:7.

Bradley TD, Floras JS. Sleep apnea and heart failure: Part II: central sleep apnea. *Circulation* 2003; 107(13): 1822-6.

Brooks D, Horner RL, Kozar LF, Render-Teixeira CL, Phillipson EA. Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model. *J Clin Invest* 1997; 99(1): 106-9.

Brooks B, Cistulli PA, Borkman M, Ross G, McGhee S, Grunstein RR, Sullivan DE, Yue DK. Obstructive sleep apnea in obese noninsulin-dependent diabetic patients: effect of continuous positive airway pressure treatment on insulin responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1681-5.

Channon KM, Qian H, George SE. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury: insights from experimental gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(8): 1873-81

Charuruks N, Laohajinda B, Rujiwanitgun S, Chaiworaporn M. Reference value for C-reactive protein and its distribution pattern in thai adults. *Circ J* 2005; 69(3): 339-44.

CHO HJ, XIE QW, CALAYCAY J, CHO HJ, XIE QW, MUMFORD RA, SWIDEREK KM, LEE TD, NATHAN C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 1992;176 (2):599-604.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003; 42 (6): 1206-52.

Chor D, Fonseca MJM, Andrade CR, Waissman W, Lotufo PA - Doenças cardiovasculares, panorama da mortalidade no Brasil. In: Minayo MC (org) - Os Muitos Brasis. Saúde e População na Década de 80. Hucitec/ABRASCO. São Paulo-Rio de Janeiro, 1995: 57-86.

Costa Rosa LF, Safi DA, Cury Y, Curi R. Effect of epinephrine on glucose metabolism and hydrogen peroxide content in incubated rat macrophages. *Biochem Pharmacol.* 1992 ;44(11):2235-41.

Coutinho V, Coutinho MA. Leucocitoses e leucopenias. Alterações morfológicas e funcionais dos leucócitos. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: Fundamentos e Prática.* São Paulo: Atheneu; 2001. 88- 95.

Cowley Jr AC, Franchini KG. Autonomic control of blood vessels In: Robertson D, ed. *Primer on the Autonomic Nervous System.* San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1996; 49-55.

Czarkowska -Paczek B, Bartłomiejczyk I, Gabrys T, Przybylski J, Nowak M, Paczek L. Lack of relationship between interleukin-6 and CRP levels in healthy male athletes. *Immunol Lett* 2005; 99(1): 136-40.

De Beer FC, Hind CR, Fox KM, Allan RM, Maseri A, Pepys MB. Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br Heart J* 1982; 47(3): 239-43.

Drager LF, Bortolloto LA, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi GF. *Am J Resp Crit Care Med* 2007 176(7):706-12.

Fauchier L., Babuty D, Cosnay P, Autret ML, Fauchier JP. Heart rate variability in idiopathic dilated cardiomyopathy: characteristics and prognostic value. *J Am Coll Cardiol* 1997 30(4): 1009-14.

Ferreiro CR., Chagas AC, Carvalho MH, Dantas AP, Jatene MB, Bento de Souza LC, Lemos da Luz P. Influence of hypoxia on nitric oxide synthase activity and gene expression in children with congenital heart disease: a novel pathophysiological adaptive mechanism. *Circulation* 2001; 103(18): 2272-6.

Flemons WW. Clinical practice. Obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2002; 347(7): 498-504.

Fletcher, EC. Effect of episodic hypoxia on sympathetic activity and blood pressure. *Respir Physiol* 2000; 119(2-3): 189-97.

Franchini KG, Krieger EM. Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic-denervated rats. *Am J Physiol*. 1992; 262(4 Pt 2):R677-83.

Fukuto JM, Wink DA. Nitric oxide (NO): formation and biological roles in mammalian systems. *Met Ions Biol Syst* 1999; 36: 547-95.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999 340(6): 448-54.

George CF. Diagnostic techniques in obstructive sleep apnea. *Prog Cardiovasc Dis* 1999; 41(5): 355-66.

Groggaard B Schurer L, Gerdin B, Arfors KE. Delayed hypoperfusion after incomplete forebrain ischemia in the rat. The role of polymorphonuclear leukocytes. *Stroke* 1989; 9(4): 500-5.

Guthrie LA, Mcphail LC, Henson PM, Johnston RB. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1984; 160: 1656-1671.

Guzzetti S, Iosa D, Pecis M, Bonura L, Prosdocimi M, Malliani A. Impaired heart rate variability in patients with chronic Chagas' disease. *Am Heart J* 1991; 121 (6 Pt 1): 1727-34.

Hallenbeck JM, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Thompson CB, Obrenovitch TP, Contreras TJ. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke*. 1986 Mar-Apr;17(2):246-53.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>a</sup> ed. Oxford: Oxford University Press; 2001. 22-23.



Hedner J, Bengtsson-Boström K, Peker Y, Grote L, Rastam L, Lindblad U. Hypertension prevalence in obstructive sleep apnoea and sex: a population-based case-control study. *Eur Resp J* 2006, 27(3):564-70.

Ip MS, Lam B, Ng MM, Lam WK, Tsang KW, Lam KS. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(5): 670-6

Iversen PO, Stokland A, Rolstad B, Benestad HB. Adrenaline-induced leucocytosis: recruitment of blood cells from rat spleen, bone marrow and lymphatics. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1994;68(3):219-27.

Lopes HF, Silva HB, Consolim Colombo FM, Barreto Filho JA, Riccio GMG, Giorgi DMA, Krieger EM. Autonomic abnormalities demonstrable in young normotensive subjects who are children of hypertensive parents. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 51-4, 2000.

Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky D, Yan SD, Anderson M, Sunouchi K, Major J, Hamilton T, Kuwabara K. Stem Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest* 93 1994 93 (4): 1564-70.

Kato M, Roberts-Thomson P, Phillips BG, Haynes WG, Winnicki M, Accurso V, Somers VK. Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 2000; 102 (21): 2607-10.

Kheirandish-Gozal L, Capdevila OS, Tauman R, Gozal D. Plasma C-reactive protein in nonobese children with obstructive sleep apnea before and after adenotonsillectomy. *J Clin Sleep Med* 2006 2(3): 301-4.

Koch AE, Kunkel SL, Pearce WH, Shah MR, Parikh D, Evanoff HL, Haines GK, Burdick MD, Strieter RM. Enhanced production of the chemotactic cytokines interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 1993; 142 (5): 1423-31.

Lauer T., Kleinbongard P, Kelm M. Indexes of NO bioavailability in human blood. *News Physiol Sci* 2002; 17: 251-5.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105(9): 1135-43.

Malhotra A, White DP. Obstructive sleep apnoea *Lancet* 2002; 360(9328): 237-45.

Mancia G, Grassi G, Parati G, Zancheti A. The sympathetic nervous system in human hypertension. *Acta Physiol Scand* 1997 Suppl 640: 117-21.

Margeli A, Skenderi K, Tsironi M, Hantzi E, Matalas AL, Vrettou C, Kanavakis E, Chrousos G, Papassotiriou I. Dramatic elevations of interleukin-6 and acute-phase reactants in athletes participating in the

ultradistance foot race spartathlon: severe systemic inflammation and lipid and lipoprotein changes in protracted exercise. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 90(7): 3914-8.

Mayo Clinic Newsletter [on-line] (2003). Novel risk factors: Identifying new culprits in heart disease. Retrieved June 27, 2003:

Mazzeo RS, Donovan D, Fleshner M, Butterfield GE, Zamudio S, Wolfel EE, Moore LG. Interleukin-6 response to exercise and high-altitude exposure: influence of alpha-adrenergic blockade. *J Appl Physiol* 2001; 91(5): 2143-9.

McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol* 1994; 267(5 Pt 2): H1921-7.

Meier CR, Jick SS, Derby LE, Vasilakis C, Jick H. Acute respiratory-tract infections and risk of first-time acute myocardial infarction. *Lancet* 1998; 351(9114): 1 467-71.

Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Price N, Dinges DF, Mullington JM. Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem* 2001; 47 (3): 426-30.

Momboull JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(1): 61-74.

Narkiewicz K, Pesek CA, Kato M, Phillips BG, Davison DE, Somers VK. Baroreflex Control of Sympathetic Nerve Activity and Heart Rate in Obstructive Sleep Apnea. *Hypertension*. 1998;32:1039-1043.

Narkiewicz K, van de Borne PJ, Pesek CA, Dyken ME, Montano N, Somers VK. Selective Potentiation of Peripheral Chemoreflex Sensitivity in Obstructive Sleep Apnea. *Circulation*. 1999;99:1183-1189.

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78(6): 915-8.

Nave H, von Horsten S, Brabant G, Helfritz F, Drube J, Pabst R. Leukocyte mobilization induced by hypervolemia is due to a combined alpha- and beta-adrenoceptor activation. *Comp Med*. 2000 ; 50(5):495-7.

Nielsen HB, Secher NH, Kristensen JH, Christensen NJ, Espersen K, Pedersen BK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1997; 272: R1847-R1852.

Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, D'Agostino R, Newman AB, Lebowitz MD, Pickering TG. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *Jama* 2000; 283(14): 1829-36.

Odemuyiwa O, Poloniecki J, Malik M, Farrell T, Xia R, Staunton A, Kulakowski P, Ward D, Camm J. Temporal influences on the prediction of

postinfarction mortality by heart rate variability: a comparison with the left ventricular ejection fraction. *Br Heart J* 1994 71(6): 521-7.

Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102 (18): 2165-8.

Penáz J. Photoelectric measurement of blood pressure, volume and flow in the finger. In: Albert R, Vogt WS, Helberg W, editors. Digest of the International Conference on Medicine and Biological Engineering. Dresden: Conference Committee of the X<sup>th</sup> International Conference on Medicine and Biological Engineering 1973;104.

Peppard PE., Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 2000 342(19): 1378-84.

Phillips BG, Somers VK. Neural and humoral mechanisms mediating cardiovascular responses to obstructive sleep apnea. *Respir Physiol* 2000 119 (2-3): 181-7.

Polysomnography Task Force, American Sleep Disorders Association Standards of Practice Committee. Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures. *Sleep* 1997; 20: 406-22.

Prabhakar NR. Sleep apneas: an oxidative stress? *Am J Respir Crit\_Care Med* 2002 165(7): 859-60.

Rey S, Del Rio R, Alcayaga J, Iturriaga R. Chronic intermittent hypoxia enhances cat chemosensory and ventilatory responses to hypoxia. *J Physiol* 2004 15; 560(Pt 2):577-86.

Reynolds GD, Vance RP. C- reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111(3): 265-9.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342(12): 836-43.

Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347(20): 1557-65.

Ross R. Atherosclerosis -- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2): 115-26.

Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Silbershatz H, Massaro JM, D'Agostinho RB, Franzblau C, Wilson PW. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. *Stroke* 2001; 32(11): 2575-9.

Rudnicka AR, Rumley A, Lowe GD, Strachan DP. Diurnal, seasonal, and blood-processing patterns in levels of circulating fibrinogen, fibrin D-dimer, C-reactive protein, tissue plasminogen activator, and von Willebrand factor in a 45-year-old population. *Circulation* 2007; 115 (8): 996-1003.

Schulz R, Schmidt D, Blum A, Lopes-Ribeiro X, Lucke C, Mayer K, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F. Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy. *Thorax* 2000; 55(12): 1046-51.

Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K, Sibelius U, Olschewski H, Mayer K, Seeger W, Grimminger F. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(2 Pt 1): 566-70. (2000b)

Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep* 1999; 22(5): 667-89.

Simonini A, Moscucci M, Miller DW, Bates ER, Pagani FD, Buerdick MD, Strieter R. IL-8 is an angiogenic factor in human coronary atherectomy tissue. *Circulation* 101(13): 1519-26.

Sin DD, Fitzgerald F, Parker JD, Newton G, Floras JS, Bradley TD. Risk factors for central and obstructive sleep apnea in 450 men and women with congestive heart failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160: 1101–1106.

Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, Hubbard R, Farrington P, Vallance P. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med* 2004; 351(25): 2611-8.

Soares Barreto - Filho JA, Consolim – Colombo FM, Lopes HF, Guerra Riccio GM, Krieger EM. Dysregulation of peripheral and central chemoreflex responses in Chagas' heart disease patients without heart failure. *Circulation* 2001 104 (15): 1792-8.

Somers VK, Dyken ME, Clary MP, Abboud FM. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 1995; 96 (4) 1897-904.

Stein PK, Bosner MS, Kleiger RE, Conger BM. Heart rate variability: a measure of cardiac autonomic tone. *Am Heart J* 1994; 127(5): 1376-81.

Svatikova A, Wolk R, Shamsuzzaman AS, Kara T, Olson EJ, Somers VK. Serum amyloid a in obstructive sleep apnea. *Circulation* 2003; 108(12): 1451-4.



Tamura DY, Moore EE, Partrick DA, Johnson JL, Offner PJ, Silliman CC. Acute hypoxemia in humans enhances the neutrophil inflammatory response. *Shock* 2002;17 (4):269-73.

Tan S, Zhou F, Nielsen VG, Wang Z, Gladson CL, Parks DA. Increased injury following intermittent fetal hypoxia-reoxygenation is associated with increased free radical production in fetal rabbit brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58 (9): 972-81.

Task force European Society of Cardiology and North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*, 1996; 93: 1043–65.

Tommasi S, Carluccio E, Bentivoglio M, Buccolieri M, Mariotti M, Politano M, Corea L. C-reactive protein as a marker for cardiac ischemic events in the year after a first, uncomplicated myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1999; 83(12): 1595-9.

Van Ravenswaaij-Arts CMA, Kollée LAA, Hopman JCW, Stoeltinga GBA, van Geijn HP. Heart rate variability. *Ann Intern Med* 1993; 118:436-47.

Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; 105(5): 546-9.

Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest* 1993;91(4):1351-7.

Vgontzas AN., Tan TL, Bixler EO, Martin LF, Shubert D, Kales A. Sleep apnea and sleep disruption in obese patients. *Arch Intern Med* 1994; 154(15): 1705-11.

Wada Y, Sugiyama A, Yamamoto T, Naito M, Noguchi N, Yokoyama S, Tsujita M, Kawabe Y, Kobayashi M, Izumi A, Kohro T, Tanaka T, Taniguchi H, Koyama H, Hirano K, Yamashita S, Matsuzawa Y, Niki E, Hamakubo T, Kodama T. Lipid accumulation in smooth muscle cells under LDL loading is independent of LDL receptor pathway and enhanced by hypoxic conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(10): 1712-9.

Wesseling, KH. Finger arterial pressure measurement with Finapres. *Z Kardiol* 1996; v.85, Suppl 3, 38-44.

Wyss, JM. The role of the sympathetic nervous system in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993; 2(2): 265-73.

Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, Mohsenin V. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med* 2005; 353(19): 2034-41.

Yamauchi-Takahara K, Ihara Y, Ogata A, Yoshizaki K, Azuma J, Kishimoto T. Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation* 1995; 91(5): 1520-4.

Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, Oda N, Minoguchi H, Yoshino G, Hirano T, Adachi M. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 2003; 107(8): 1129-34.

Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993; 328(17): 1230-5.

Zhang GX, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Yao L, Nagai Y, Fujisawa Y, Miyatake A, Abe Y. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovasc Res* 2005;65:230–238.

Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001; 103(9): 1194-7.