

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - PIPGCF UFSCar/UNESP

PALOMA GRAZIELE BITTENCOURT DA SILVA

HIPÓXIA INTERMITENTE DURANTE O PERÍODO PÓS-NATAL E
MECANISMOS EPIGENÉTICOS: IMPLICAÇÕES A LONGO PRAZO NA
VENTILAÇÃO PULMONAR E NO PADRÃO MOTOR RESPIRATÓRIO

ARARAQUARA
2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - PIPGCF UFSCar/UNESP**

PALOMA GRAZIELE BITTENCOURT DA SILVA

**HIPÓXIA INTERMITENTE DURANTE O PERÍODO PÓS-NATAL E
MECANISMOS EPIGENÉTICOS: IMPLICAÇÕES A LONGO PRAZO NA
VENTILAÇÃO PULMONAR E NO PADRÃO MOTOR RESPIRATÓRIO**

Dissertação submetida ao Programa
Interinstitucional de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP da
Universidade Federal de São Carlos para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Fisiologia.
Orientador: Prof. Dr. Daniel B. Zoccal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

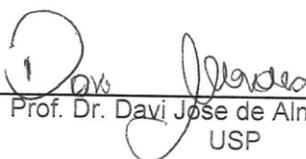
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Paloma Grazielle Bittencourt da Silva, realizada em 09/05/2019:



Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal
UNESP



Prof. Dr. Davi José de Almeida Moraes
USP



Profa. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar sabedoria e força para seguir este caminho. Agradeço a vida de todos os animais que usei neste trabalho.

Agradeço minha família, por todo amor e apoio. Agradeço a minha mãe, ao meu pai, aos meus irmãos, ao meu avô e a minha avó. Agradeço a todas da república Panapaná, minha segunda família.

Agradeço professor Daniel B. Zoccal, por me ensinar tanto. Agradeço sua orientação, por sempre contrabalancear minha teimosia com paciência e a minha ansiedade com segurança e por acreditar em sorvetes ao invés de feijão.

Agradeço a todos que participaram e me ajudaram neste trabalho direta ou indiretamente. Agradeço aos meus colegas, professores e funcionários do laboratório de fisiologia da FOAr/UNESP pelo companheirismo. Agradeço aos porteiros e entregadores, por me ajudarem com os cilindros de gases.

Agradeço a Alexandra Elbakyan, por providenciar acesso ilimitado ao conhecimento científico.

Agradeço as agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Agradeço em especial a Priscila, Maria Eugenia, Laryssa e Bolival, que compartilharam comigo minhas alegrias e minhas angústias.

“Se pude ver mais longe, foi porque estive sob ombros de gigantes”

Isaac Newton.

Dedico esta dissertação à minha avó,

Um sinônimo de amor

AUXÍLIO FINANCEIRO

Este trabalho foi conduzido com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, auxílios 2013/17.251-6; 2013/06077-5) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Durante o período pós-natal, há um período importante de desenvolvimento e amadurecimento da rede respiratória, o qual é crítico para o funcionamento completo de mecanismos neurais da geração do padrão e ritmo respiratório. Períodos de apneias são comumente observados em prematuros, e sugere-se tais eventos sejam um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiorrespiratórias em adultos. Neste estudo, investigamos alterações respiratórias de ratos jovens e adultos previamente expostos a hipóxia crônica intermitente pós-natal (pCIH), bem como a participação da metilação de DNA na indução destas alterações. Para isso, ratos recém-nascidos (P1) foram submetidos à pCIH (6% O₂ por 30 s a cada 10 min, 8 horas por dia) durante os dez primeiros dias de vida, enquanto que animais controle foram mantidos em normóxia. Foram realizadas injeções de decitabina (inibidor da metilação de DNA, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo nos dias P1, P4, P7 e P10. Após este período, os animais foram mantidos em normóxia até o dia dos experimentos de pletismografia de corpo inteiro e registro da atividade motora. Os animais pCIH apresentaram quando jovens e adultos, em condições basais durante a pletismografia, aumento do volume corrente e da ventilação minuto, associado a presença de irregularidades na frequência respiratória. As preparações *in situ* descerebradas e perfundidas artificialmente de ratos pCIH apresentaram, em condições basais, aumento da atividade do nervo frênico associado a redução da atividade eferente vagal. Além disso, as preparações de animais pCIH apresentam maior limiar apnêico e menor sensibilidade à hipercapnia de 7% de CO₂, mas não 10% CO₂. As respostas respiratórias à estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN nas preparações *in situ* de ratos pCIH foram similares às respostas do grupo controle. A inibição da metilação do DNA foi capaz de prevenir as alterações na ventilação pulmonar e no padrão motor respiratório em ratos jovens, bem como as alterações ventilatórias em ratos adultos que foram submetidos à pCIH. Diante desses resultados, concluímos que a exposição a hipóxia intermitente durante o período pós-natal modifica o funcionamento do sistema respiratório e promove alterações persistentes na ventilação pulmonar. A hipóxia intermitente, presente em apneias da prematuridade, pode ser um fator que predispõe a patologias respiratórias em adultos, como a apneia obstrutiva do sono. Concluímos também que mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA participam ativamente das alterações promovidas pela pCIH.

ABSTRACT

During the postnatal period, the respiratory network undergoes through developmental and maturational processes that are critical for the proper functioning of central mechanisms that controls breathing. Periods of apnea are commonly observed in preterm infants and it is suggested to be an important risk factor for the development of cardiorespiratory diseases in adults. In this study, we investigated the changes in pulmonary ventilation and respiratory motor outputs of juvenile and adult rats exposed to post-natal intermittent chronic hypoxia (pCIH), as well as the participation of DNA methylation processes in the induction of these alterations. To reach these goals, newborn rats (P1) were exposed to pCIH [6% O₂ for 30 s every 10 min, 8 hours per day (9:30 - 5:30)] during the first 10 days of life, whereas control animals were maintained in normoxia. Injections of decitabine (DNA methylation inhibitor, 1 mg/kg, i.p.) or vehicle were performed on days P1, P4, P7 and P10. After this period, the animals were kept in normoxia until the day of the experiments. When young, pCIH animals presented, under basal conditions, increased tidal volume and minute ventilation, associated with irregularities in the respiratory frequency. Decerebrated, artificially perfused *in situ* preparations of pCIH rats exhibited, at resting conditions, an increase in phrenic burst amplitude associated with reduced vagal efferent activity. No significant differences were observed in HN activity. The *in situ* preparations of pCIH animals also presented higher apneic threshold and lower sensitivity to hypercapnia at 7% CO₂, but not at 10% CO₂. The respiratory responses to stimulation of carotid body chemoreceptors with KCN in the pCIH *in situ* preparations were similar to controls. In adulthood, pCIH rats also exhibited increased tidal volume and irregularities in the respiratory frequency. Inhibition of DNA methylation during pCIH prevented the changes in pulmonary ventilation and respiratory motor activity of juvenile rats, as well as the modifications in pulmonary ventilation of adult rats. We therefore conclude that the exposure to intermittent hypoxia during the postnatal period modifies the functioning of the respiratory network and promotes persistent changes in respiratory pattern and pulmonary ventilation. Intermittent hypoxia, observed in the apnea of prematurity, may be a relevant factor predisposing to respiratory pathologies in adults, such as obstructive sleep apnea. We conclude that epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, actively promote and sustain the changes induced by pCIH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo respiratório <i>in vivo</i>	15
Figura 2. Distribuição anatômica dos núcleos respiratórios da ponte e do bulbo.	20
Figura 3. Linha do tempo experimental.	31
Figura 4. Protocolo pCIH.	33
Figura 5. Registro representativo da ventilação pulmonar.	35
Figura 6. Registros originais e integrados (J), representativo do grupo controle, da atividade do nervo frênico (PN), hipoglosso (HN) e vago (cVN) durante a preparação <i>in situ</i>	37
Figura 7. Protocolo experimental durante a preparação <i>in situ</i>	38
Figura 8. Efeitos da pCIH e do tratamento com a decitabina no peso corporal.	41
Figura 9. Padrão respiratório de ratos jovens expostos ao pCIH.	42
Figura 10. A exposição ao pCIH aumenta a ventilação pulmonar em ratos jovens.	43
Figura 11. Coeficiente de variação de frequência de <i>bursts</i> do PN.	44
Figura 12. Padrão de atividade motora respiratória de preparações <i>in situ</i>	44
Figura 13. A pCIH modifica as atividades do nervo frênico e vago por mecanismos dependentes da metilação do DNA.	47
Figura 14. Tempos respiratórios da preparação <i>in situ</i>	48
Figura 15. Animais pCIH apresentam correlação negativa entre a atividade do PN e cVN <i>in situ</i>	49
Figura 16. A exposição a pCIH modifica a amplitude de resposta a hipercapnia.....	51
Figura 17. A exposição a pCIH e o tratamento com decitabina alteram a resposta a hipocapnia.	53
Figura 18. Registros representativos da atividade do PN a exposição a hipocapnia. A seta representa início da exposição a 1% de CO ₂	54
Figura 19. A exposição a pCIH não altera a resposta ao KCN na preparação <i>in situ</i>	55

Figura 20. Ratos adultos expostos a pCIH apresentam elevado volume corrente e irregularidades respiratórias.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Magnitude das respostas (% em relação ao basal) dos diferentes tempos respiratórios de preparações *in situ* de animais dos grupos controle (n=4), pCIH (n=11), controle + decitabina (n=8) e pCIH + decitabina (n=8) à hipercapnia 7% CO₂.....50

Tabela 2. Magnitude das respostas (% em relação ao basal) dos diferentes tempos respiratórios de preparações *in situ* de animais dos grupos controle (n=4), pCIH (n=11), controle + decitabina (n=8) e pCIH + decitabina (n=8) à hipercapnia 10% CO₂.....50

Tabela 3. Gasometria arterial de animais adultos. pH, pressão parcial de oxigênio (PaO₂), saturação de oxigênio (sO₂), pressão parcial de dióxido de carbono (CO₂), concentração de íon bicarbonato (HCO₃⁻) e concentração de lactato do sangue arterial.56

Tabela 4. Sumário das principais alterações ventilatórias encontradas em animais pCIH57

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância

AOS - apneia obstrutiva do sono

BötC - complexo Bötzinger

CIH – hipóxia crônica intermitente, do inglês *chronic intermitent hypoxia*

CONCEA -Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CO₂ – dióxido de carbono

CPG - centro gerador de padrão, do inglês *center pattern generator*

cVN - nervo vago, do inglês cervical *vagus nerve*

cVRG - grupo respiratório ventral caudal, do inglês *caudal ventral respiratory group*

DNMT – DNA metil-transferase

DRG – grupo respiratório dorsal, do inglês *dorsal respiratory group*

E1 - primeiro estágio da expiração

E2 - segundo estágio da expiração

FiO₂ - fração inspirada de oxigênio

f_R - a frequência respiratória

HBR - reflexo de Hering-Breuer

HCO₃⁻ - ânion bicarbonato

HI - hipóxia intermitente

HIF-1 α - fator induzido pela hipóxia tipo 1-alfa, do inglês *hypoxic induce fator*

HN – nervo hipoglosso, do inglês *hypoglossal nerve*

KCN - cianeto de potássio

KF - Kölliker-Fuse

N₂ - nitrogênio

NTS - núcleo do trato solitário

O₂ - oxigênio

PaCO₂ - pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial

PaO₂ – pressão parcial de oxigênio no sangue arterial

PB – núcleo Parabraquial

pCIH - hipóxia intermitente durante o período pós-natal, do inglês *postnatal chronic intermittent hypoxia*

pFRG - grupamento respiratório parafacial, do inglês *parafacial respiratory group*

PN - nervo frênico, do inglês *phrenic nerve*

pré-BötC – complexo pré-Bötzinger

PRG - grupo respiratório pontino, do inglês *pontine respiratory group*

RTN - núcleo retrotrapezóide, do inglês *retrotrapezoid nucleus*

rVRG - grupo respiratório ventral rostral, do inglês *rostral ventral respiratory group*

s - segundo

SNC - sistema nervoso central

sO₂ - saturação oxigênio-hemoglobina

SOD - superóxido dismutase

TASK2 - canais para potássio sensíveis à prótons, do inglês *Twik-related acid-sensitive*

V_e - ventilação pulmonar

vLTF - facilitação ventilatória de longo prazo, do inglês *ventilatory long-term facilitation*

VRG – grupo respiratório ventral, do inglês *ventral respiratory group*

V_T - volume corrente, do inglês *tidal volume*

Sumário

INTRODUÇÃO	15
<i>A respiração em mamíferos</i>	15
<i>Desenvolvimento do sistema respiratório</i>	24
<i>Hipóxia intermitente pós-natal</i>	26
<i>Mecanismos epigenéticos e hipóxia intermitente pós-natal</i>	28
OBJETIVO	31
<i>Objetivos Específicos</i>	31
MATERIAIS E MÉTODOS	32
<i>Animais e aprovação ética</i>	32
<i>Hipóxia intermitente crônica pós-natal (pCIH)</i>	33
<i>Administração do inibidor da metilação do DNA</i>	34
<i>Registros da atividade elétrica de nervos motores na preparação in situ coração tronco-cerebral isolados</i>	36
<i>Gasometria arterial</i>	40
<i>Análise estatística</i>	40
RESULTADOS	41
<i>Efeitos da pCIH sobre o peso corporal de ratos jovens e adultos</i>	41
<i>Alterações no padrão respiratório motor de ratos jovens expostos à pCIH</i>	45
<i>Alterações motoras durante o basal</i>	45
<i>Correlação entre as atividades PN e cVN durante o basal</i>	50
<i>Respostas à hipocapnia</i>	54
<i>Respostas motoras respiratórias à estimulação dos quimiorreceptores periféricos</i>	55
<i>Ventilação pulmonar de ratos adultos expostos à pCIH</i>	56
<i>Gasometria arterial de ratos adultos expostos à pCIH</i>	59
DISCUSSÃO	60
<i>Alterações respiratórias em animais pCIH</i>	60
<i>A exposição hipóxia intermitente pós-natal promove aumento do volume corrente e da atividade motora do nervo frênico</i>	61
<i>A exposição a pCIH promove irregularidades respiratórias associada a redução da atividade motora para os músculos laringeais</i>	63
<i>pCIH e controle quimiossensível central e periférico na preparação in situ</i>	66
<i>Efeitos da pCIH sobre o ganho de peso dos animais</i>	69
<i>pCIH e mecanismos epigenéticos: implicações nas alterações a longo prazo</i>	70
<i>pCIH + decitabina: outras considerações</i>	72

CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75

INTRODUÇÃO

A respiração em mamíferos

A manutenção do metabolismo celular, e conseqüentemente da vida, depende do oxigênio (O₂) captado do meio externo, necessário para a produção de energia, e da eliminação do excesso de dióxido de carbono (CO₂), produzido a partir dos processos celulares de oxidação. Um humano de aproximadamente 70 kg consome, em média de 250 ml de O₂ por minuto, para manter sua taxa metabólica em repouso. Para isso, a cada minuto, ele realiza cerca de 12 respirações (West 2012). Por meio da entrada e saída de ar dos pulmões, o sistema respiratório é capaz de captar de O₂ do ar alveolar para o sangue arterial, e transportar o excesso de CO₂ do sangue arterial para o ar alveolar. A geração dos fluxos de entrada (inspiração) e saída (expiração) do ar nos pulmões dependem da contração e relaxamento de músculos respiratórios, cujo controle é coordenado ritmicamente pelo sistema nervoso central (SNC), desde antes do nascimento até a morte (Richter and Smith 2014; Lindsey et al. 2012). As propriedades intrínsecas e sinápticas das células que compõem a rede neural respiratória presente no SNC, juntamente com informações sensoriais provenientes dos vasos sanguíneos e trato respiratório, trabalham para manter as pressões parciais de O₂ e CO₂ no sangue arterial e nos tecidos em níveis fisiológicos (Bavis et al. 2007). A capacidade dos organismos de adaptar a respiração frente às demandas metabólicas, e de manter a homeostase dos gases no sangue e tecidos, é vital e requer o bom funcionamento do sistema respiratório. (Guyton and Hall 2006).

O trato respiratório é composto por uma porção inicial chamada de zona condutora, que conduz e condiciona o ar ambiente até a zona respiratória (bronquíolos respiratórios e alvéolos pulmonares), permitindo o processo de hematose (Guyton and Hall 2006). As vias que fazem parte da zona condutora (nariz, boca, faringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos terminais) são importantes para aquecimento e umidificação do ar, proteção contra partículas e controle do diâmetro da via respiratória, regulando a resistência à passagem do ar inspirado e expirado (West 2012). Contudo esta região não é capaz de realizar trocas gasosas e, portanto, constitui o espaço morto anatômico (Guyton and Hall 2006). Bronquíolos mais distais (ou bronquíolos respiratórios) e os alvéolos compõem a zona respiratória, e estão em íntimo contato com capilares pulmonares, permitindo a realização das trocas gasosas (O₂ e CO₂) entre o espaço alveolar e o sangue, a favor de um gradiente de pressão parcial (West 2012).

A renovação do ar alveolar, e conseqüentemente no sangue arterial, é diretamente proporcional ao volume de ar trocado a cada ciclo respiratório (volume corrente, do inglês *tidal volume*, V_T) e a frequência respiratória (f_R). Em conjunto, esses parâmetros determinam a ventilação pulmonar (V_e , onde: $V_e = V_T \times f_R$). O V_T e a f_R são determinados pela intensidade das contrações dos músculos respiratórios e pela frequência com que as contrações/relaxamentos rítmicas acontecem. A respiração em repouso, também chamada de eupneia (do grego, *eu* – normal; *pnein* – respirar), pode ser dividida em 3 fases: inspiração, pós-inspiração e expiração final (figura 1), as quais são distintamente controladas pela rede neural respiratória do SNC (Del Negro et al. 2018; St.-John and Paton 2003).

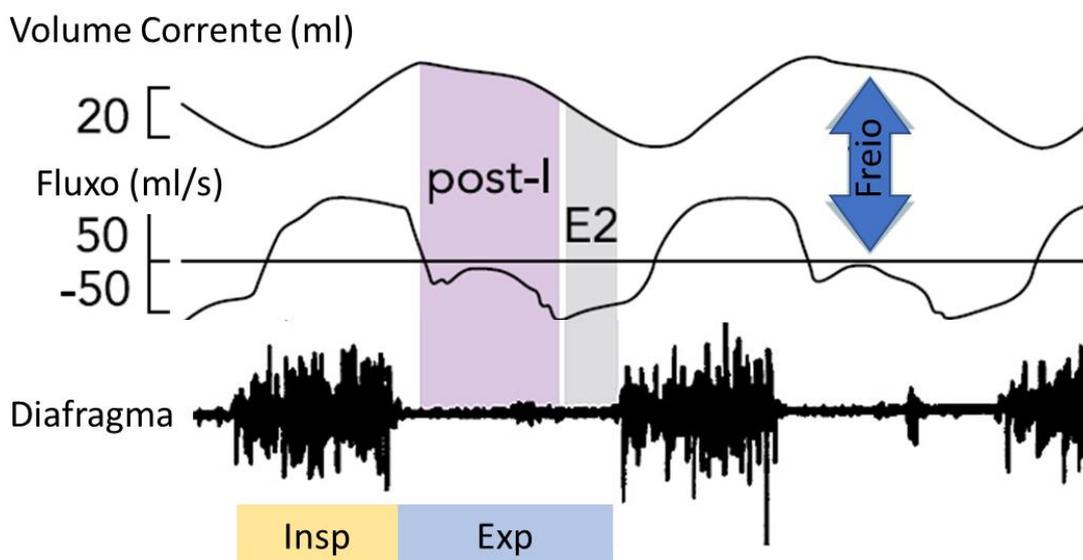


Figura 1. Ciclo respiratório *in vivo*. Registro da ventilação pulmonar e da atividade muscular do diafragma de cordeiros sob anestesia. Observa-se que atividade do diafragma determina o período inspiratório (insp), concomitante com aumento do fluxo e volume corrente e o silenciamento do diafragma determina o período expiratório (exp) com a redução do fluxo e volume corrente. O período expiratório é composto pela pós-inspiração (post-I) e pela expiração final (E2). Durante a pós-inspiração, há o freio do fluxo durante a pós-inspiração, determinado pela atividade muscular laringeal (não mostrado). Modificado Richter and Smith, 2014.

Fases respiratórias e controle muscular durante o repouso

A fase inspiratória é marcada pela contração dos músculos inspiratórios que promovem a expansão da caixa torácica, gerando fluxo de ar para dentro dos pulmões (Guyton and Hall, 2006). Os principais músculos inspiratórios responsáveis pela expansão da caixa torácica, e conseqüentemente pela diminuição da pressão interalveolar, são o diafragma e os intercostais externos. O relaxamento destes músculos, durante a expiração em repouso, promove a diminuição do volume da caixa torácica, que é suficiente para causar a saída de ar (Del Negro et al. 2018). Em adição a contração dos músculos da caixa torácica, músculos abdutores faríngeos e laríngeos das vias aéreas superiores também se contraem durante a inspiração, promovendo a dilatação das vias aéreas e, assim, diminuindo a resistência a passagem do ar (Richter and Smith 2014). Como exemplo, podemos citar a musculatura da língua, como os músculos genioglosso, estiloglosso, transverso, superior longitudinal e genio-hióide, que, quando contraídos, promovem a protrusão e depressão da língua (Fregosi and Fuller 1997). Há também os músculos do palato mole, como o elevador e tensor velopalatino, e os músculos abdutores da laringe, como o músculo cricoaritenóideo posterior e o lateral, que, quando contraídos, exercem papel na dilatação da faringe e da laringe, respectivamente (Kuna et al. 1991). Interessantemente, a contração desses músculos se iniciam alguns milissegundos antes da contração do diafragma (período denominado de pré-inspiração), e continuam, de forma crescente, durante a inspiração, auxiliando na apropriada entrada de ar, assim como mantendo livre de obstrução durante a fase inspiratória (Del Negro et al. 2018). O prejuízo do controle destes músculos ocorre em casos de apneia obstrutiva do sono (AOS), que estão associados a alterações respiratórias e cardiovasculares (Halloran et al. 2016; Hakim et al. 2012; Zoccal et al. 2008; Bailey et al. 2001).

A fase pós-inspiratória, ou também denominada de primeiro estágio da expiração (E1), ocorre logo após a inspiração. Neste período, o fluxo de saída de ar dos pulmões é gerado de forma passiva, devido ao relaxamento dos músculos diafragma e intercostais externos, e às forças elásticas de retração do tecido pulmonar e da caixa torácica (Del Negro et al. 2018; Richter and Smith 2014). Além disso, há também a contração de músculos adutores da laringe, como tireoaritenóideo, que causam a diminuição do diâmetro interno das vias aéreas superiores, aumentando a resistência à passagem do ar durante sua saída dos pulmões (Bailey 2006; Kuna et al. 1988; Dutschmann and Herbert 2006). A contração laríngea pós-inspiratória promove a

desaceleração do fluxo expiratório, aumentando o tempo que o ar permanece nos pulmões, beneficiando assim as trocas gasosas alveolares, além de criar um fluxo de ar expiratório laminar que diminui a probabilidade de colapso das vias aéreas (Bautista 2012; Dutschmann and Dick 2012). A modulação da resistência das vias aéreas durante a pós-inspiração também contribui para os reflexos defensivos, como a tosse e comportamentos não respiratórios, como a deglutição e vocalização (Bautista 2012; Dutschmann and Dick 2012). A fase expiratória final, também chamada de segundo estágio da expiração (E2), corresponde a um período onde não há contração de músculos respiratórios e a velocidade do fluxo expiratório é baixa e constante (Richter and Smith 2014).

Em condições de repouso, portanto, respiração pode ser descrita, do ponto de vista motor, por uma fase inspiratória ativa, e uma fase expiratória passiva (ou parcialmente passiva) (Richter and Smith 2014; Del Negro et al. 2018; Bautista 2012), a qual é adequada para manter as demandas metabólicas do organismo. No entanto, em casos de desafios, como durante aumento da concentração de CO₂ (hipercapnia) ou diminuição da concentração de O₂ (hipóxia) do ar ambiente, ocorre o aumento da atividade motora inspiratória, e a expiração torna-se um processo ativo, com a contração dos músculos intercostais internos e, principalmente, da musculatura abdominal (Lemes and Zoccal 2014; Abdala et al. 2009). As musculatura abdominais, ao se contraírem, empurram o conteúdo abdominal e o diafragma em direção a caixa torácica, acelerando o esvaziamento pulmonar e diminuindo o volume da caixa torácica, especialmente durante a fase E2, intensificando o processo de saída de ar (Jenkin and Milsom 2014).

Controle neural da ventilação

A coordenação dos músculos respiratórios decorre da atividade sincrônica e acoplada dos diferentes grupos neuronais que compõe a rede neural respiratória, a qual é responsável por controlar o ritmo e o padrão respiratório de forma autônoma, além de integrar informações sensoriais aferentes decorrentes de, por exemplo, estímulos hipóxicos, pressóricos, nocivos, tóxicos e comportamentais (Duffin 2004; Del Negro et al. 2018). Os neurônios motores que controlam a musculatura respiratória do tórax e abdômen estão localizados em núcleos presentes na medula espinal, enquanto que os

corpos celulares dos neurônios motores que inervam a musculatura das vias aéreas superiores estão localizados em núcleos no tronco encefálico (Bianchi et al. 1995).

O nervo frênico é responsável por inervar o músculo diafragma, e seu núcleo motor está localizado na porção cervical da medula espinhal, na região C2-C5 (Devinney et al. 2015). O nervo hipoglosso é responsável pela inervação da musculatura da língua (genioglosso) e o núcleo motor do hipoglosso (XII) está localizado na porção dorsal do bulbo (Sica et al. 1984). A musculatura da laringe, tanto a abduzora (ex. cricoaritenóide) quando a adutora (tireoaritenóide), é inervada pelo nervo laríngeo recorrente superior, um ramo descendente do nervo vago, cujos corpos celulares estão localizados no núcleo ambíguo, na porção ventral do bulbo (Bianchi et al. 1995; Del Negro et al. 2018) (ver figura 1). A musculatura abdominal é inervada por nervos motores (ex. iliohipogástrico), cujos núcleos se localizam na região tóraco-lombar da coluna vertebral (Abdala et al. 2009; da Silva et al. 2019). A atividade destes diferentes neurônios motores respiratórios é controlada sinápticamente por neurônios provenientes de outras regiões do SNC (Duffin 2004). A atividade dos nervos motores respiratórios, portanto, reflete a atividade muscular e o controle da ventilação pelo tronco encefálico. De uma perspectiva experimental, a respiração é um comportamento especial, pois é possível estudar sua atividade em preparações reduzidas *in vitro* em animais vertebrados, já que os centros geradores da respiração se localizam no tronco encefálico e atuam de forma intrínseca e autônoma mesmo isolados (Johnson et al. 1994). Ao estudar a atividade motora dos nervos, podemos compreender a circuitaria central que coordena a respiração, bem como suas adaptações e plasticidades – um assunto que ainda demanda de estudos para sua plena compreensão (Feldman et al. 2003).

A atividade dos motoneurônios respiratórios são controladas por neurônios do centro gerador do padrão respiratório (*center pattern generator*, CPG), que, por meio de sinapses inibitórias e excitatórias geram o padrão motor respiratório de forma autônoma, porém modulado por informações aferentes (Smith et al. 2007). Sugere-se que o CPG é constituído, principalmente, por três grupamentos neuronais respiratórios: grupamento respiratório ventral (*ventral respiratory group*, VRG), grupamento respiratório pontino (*pontine respiratory group*, PRG) e grupamento respiratório dorsal (*dorsal respiratory group*, DRG) (ver figura 2) (Lindsey et al. 2012; Smith et al. 2007). Estes três grupamentos estabelecem sinapses mútuas que, por meio da liberação de neurotransmissores e neuromoduladores distintos, coordenam a ativação e a transição das

contrações musculares durante a inspiração e expiração, de forma a gerar a respiração eupnéica e as respostas ventilatórias reflexas (Duffin 2004).

Evidências indicam que o VRG contém os neurônios necessários para a ritmogênese respiratória (Del Negro et al. 2018). Esta região é formada por colunas bilaterais que se localizam na superfície ventrolateral do bulbo, estendendo-se do nível do núcleo facial (VII) até próximo à junção espino-medular (Del Negro et al. 2018). O VRG é composto (figura 2), da direção rostral a caudal, pelo núcleo retrotrapezóide (RTN), grupamento respiratório parafacial (pFRG), complexos de Bötzing (BötC) e de pré-Bötzing (pré-BötC) e grupos respiratórios ventrais rostral (rVRG) e caudal (cVRG) (Duffin 2004; Del Negro et al. 2018). A região pré-BötC possui neurônios importantes para geração do ritmo respiratório, pois são capazes de se auto-despolarizarem ritmicamente e gerar *in vitro*, de forma espontânea, uma atividade semelhante a respiração (Smith et al. 2007). Além disso, a inibição seletiva e aguda dos neurônios do pré-BötC *in vivo* promove parada respiratória (Tan et al. 2008; Gray et al. 2001), reforçando o papel dessa região como centros gerador do ritmo respiratório. Sugere-se que neurônios do pré-BötC sejam ritmogênicos e responsáveis por fornecer estímulos excitatórios e inibitórios para outras populações de neurônios respiratórios localizados em núcleos distintos do tronco cerebral e que fazem parte do CPG (Smith et al. 2007; Yang and Feldman 2018).

A região do BötC contém neurônios inibitórios que despolarizam durante o período expiratório (Bianchi et al. 1995), sendo alguns de forma decrescente, ou seja, com pico de despolarização no início da expiração (neurônios pós-inspiratórios), e outros de forma crescente e com máxima despolarização durante a fase final da expiração (neurônios expiratórios *aug-E*, do inglês *augmenting expiratory neurons*). Alguns autores propõem que as interações inibitórias recíprocas entre BötC e pré-BötC formariam um chamado anel inibitório, o qual, em conjunto a atividade intrínseca dos neurônios do pré-BötC, seria fundamental para gerar as oscilações respiratórias primárias responsáveis pela geração do ritmo respiratório de repouso e pela transição das fases inspiratória e expiratória (Smith et al. 2007; Richter and Smith 2014). O rVRG e cVRG são regiões que contém neurônios pré-motores inspiratórios e expiratórios, respectivamente. Os neurônios do rVRG enviam projeções para o núcleo motor do frênico e núcleo ambíguo, enquanto que o cVRG contém neurônios que enviam projeções para núcleos motores abdominais (Smith et al. 2007; Duffin 2004).

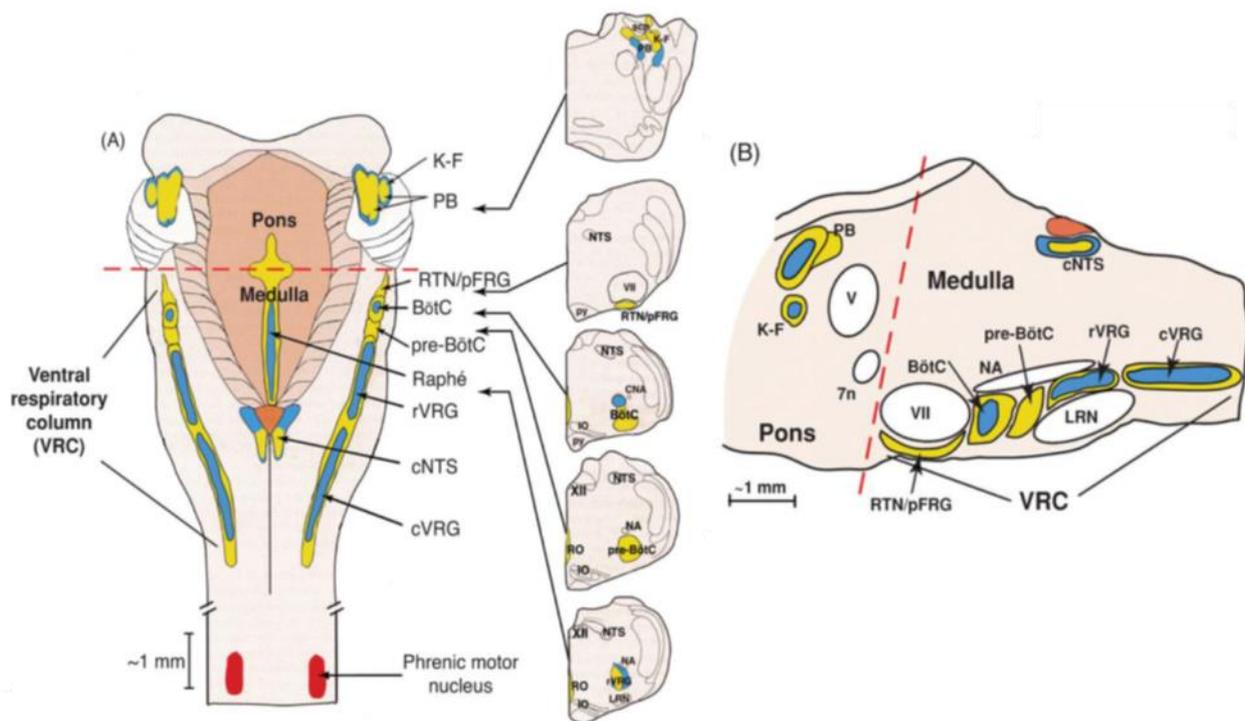


Figura 2. Distribuição anatômica dos núcleos respiratórios da ponte e do bulbo, em cortes dorsal (A, esquerda), coronal (A, direita) e sagital (B). Visão dorsal do tronco cerebral em A com estruturas respiratórias projetadas no plano horizontal e cortes coronais em série em níveis que mostram as regiões dorsolateral pontinha, como Kolliker Fuse (KF) e parabraquial (PB) do grupo respiratório pontino (PRG) e as regiões mais caudais do bulbo na coluna respiratória ventral (VRC), o núcleo retrotrapezoide (RTN) e o grupo respiratório parafacial (pFRG), Bötzinger (BötC), pré Bötzinger (pré-BötC), além dos grupos respiratórios ventrais rostral (rVRG) e caudal (cVRG). Regiões dorsomediais (DRG) com o núcleo do trato solitário (NTS) e sua parte caudal (cNTS) estão indicadas em A (à esquerda). São indicadas distribuições de neurônios pré-motores respiratórios (com conexões diretas para motoneurônios, azul) e interneurônios (com conexões propriobulbares, amarelo). Outras abreviaturas: IO, núcleo olivar inferior; V, núcleo motor trigeminal; NA, núcleo ambíguo; CNA, divisão compacta do NA; py, trato piramidal; RO, Rafe obscuro; Sep, pedúnculo cerebelar superior; 7n, nervo facial. Modificado de Lindsey et al. 2012.

A região do RTN/pFRG participa do controle da expiração ativa e do controle químico, sensível ao CO_2 , da ventilação. Atualmente, os autores separam o RTN do pFRG que apesar da proximidade anatômica (figura 2), apresentam propriedades funcionais diferentes (Zoccal et al. 2018). O RTN contém neurônios com atividade sensível a variação de PaCO_2/pH (Mulkey et al. 2004). Os neurônios do RTN são caracterizados por serem glutamatérgicos e apresentarem o fator de transcrição Phox2b (Gestreau et al. 2015). Estes neurônios sensíveis à CO_2 apresentam de canais para potássio sensíveis à prótons (canais do tipo TASK, *Twik-related acid-sensitive*) que promovem a despolarização devido ao aumento H^+ e integram a resposta ao aumento CO_2 (Moreira et al. 2006). A deleção de neurônios do RTN diminui significativamente o volume corrente

e eleva a PaCO₂ em repouso (Takakura et al. 2014; Souza et al. 2018), o que demonstra a importância deste núcleo na regulação de CO₂. A região do pFRG, por sua vez, contém neurônios que não são quimiossensíveis mas que desencadeiam potenciais de ação durante a expiração tardia, concomitantemente à atividade abdominal (expiração ativa), chamados de neurônios late-E (Abdala et al. 2009; Silva et al. 2016; de Britto and Moraes 2016). Além do RTN/pFRG há outros centros bulbares, pontinos e hipotalâmicos (como *Locus Coeruleus*, núcleos da Rafe, hipotálamo lateral) que também são considerados quimiorreceptores centrais e participam da resposta ventilatória a hipercapnia (Guyenet and Bayliss 2015).

Outra região da CPG, fundamental para a geração do padrão eupnêico, é o grupo respiratório pontino (PRG) (Dutschmann and Dick 2012). Na porção dorsolateral da ponte localizam-se os núcleos Kölliker-Fuse (KF) e parabraqial (PB) (figura 2), os quais parecem ter um importante papel no controle da respiração. Estudos mostram que a inibição farmacológica do KF (Barnett et al. 2018; Bautista and Dutschmann 2014; Dutschmann et al. 2009) ou a desconexão ponte-bulbo (Smith et al. 2007) modifica drasticamente o padrão respiratório, transformando-o em um padrão de duas fases. Tais evidências funcionais, associado a evidências anatômicas de projeções da região dorsolateral da ponte para importantes núcleos respiratórios do CPG (Dutschmann and Dick 2012; Geerling et al. 2016) demonstram a importância desta região para a geração da respiração, principalmente pela geração e controle do componente pós-inspiratório (Barnett et al. 2017b; Bautista and Dutschmann 2014). O KF contém neurônios pré-motores excitatórios que controlam os motoneurônios do núcleo ambíguo que regulam a constrição glótica (Bautista and Dutschmann 2014). Além disso, os neurônios do KF participam efetivamente da regulação da transição entre a inspiração e a expiração, mediado, em parte, por informação aferentes provenientes dos receptores de estiramento pulmonar (reflexo de Hering-Breuer) (Dutschmann et al. 2009), sendo o KF um dos principais sítios de projeções do núcleo do trato solitário (NTS) (Bautista 2012). O PRG também é um importante sítio sináptico de informações descendentes de regiões do encéfalo, permitindo a adaptação da respiração ao comportamento, ao estado emocional ou ao ciclo sono-vigília (Dutschmann and Dick 2012). Esta região participa de processos protetores das vias aéreas e processos não-respiratórios como a vocalização, deglutição, tosse e até mesmo defecação (Dutschmann and Dick 2012; Bautista and Dutschmann 2014).

E por fim, o grupo respiratório dorsal (DRD), composto principalmente pelo NTS, também participa do controle da respiração eupneica, uma vez que é a porta de entrada das mais diversas aferências sensoriais periféricas (Forster et al. 2000; Del Negro et al. 2018). Informações sensoriais de quimiorreceptores periféricos, receptores de estiramento pulmonar (PSR, *pulmonar stretch receptors*) e barorreceptores arteriais realizam a primeira sinapse no NTS, que processa e integra estas informações e envia projeções a diversos sítios no tronco encefálico (Barnett et al. 2017).

As informações sensoriais periféricas contribuem para manutenção da atividade da rede neural respiratória, de forma a melhor ajustar a atividade motora respiratória. Como exemplo, podemos citar os ajustes respiratórios desencadeados pelos níveis da PaO₂ e pelo grau de insuflação pulmonar. Os quimiorreceptores periféricos são células sensoriais capazes de monitorar os níveis de pH, PaCO₂ e, especialmente, de PaO₂ (Lahiri et al. 2006; Forster et al. 2000). Estas células, localizadas principalmente nos corpúsculos carotídeos, despolarizam e liberam neurotransmissores em resposta a redução da PaO₂ (Lahiri et al. 2006), promovendo a ativação das terminações nervosas do nervo do seio carotídeo. Os quimiorreceptores também podem ser encontrados no arco aórtico, próximos as artérias pulmonares ou subclávia e próximos a artéria celíaca (de Burgh Daly, 1997). As informações aferentes dos quimiorreceptores carotídeos ao chegarem no NTS, são integradas e sinais excitatórios e inibitórios são deflagrados para o CPG (Barnett et al. 2017; Forster et al. 2000) A ativação do nervo do seio carotídeo pela hipóxia ou estimulação elétrica promove o aumento da atividade inspiratória (aumento da frequência e amplitude do nervo frênico, aumento da atividade do nervo hipoglosso) e também aumento da atividade expiratória (aumento da atividade do nervo abdominal), que leva ao aumento do volume corrente e da frequência (Lemes and Zoccal 2014). Drogas como o cianeto de potássio (KCN), que causam hipóxia celular por inibir, reversivelmente, a cadeia respiratória mitocondrial (Kumar, and Prabhakar 2012), são largamente utilizadas para estudar o quimiorreflexo. Diversos estudos mostram que os corpúsculos carotídeos e outros quimiorreceptores são sujeitos a plasticidades (Barnett et al. 2017). A exposição a fatores ambientais, como alta altitudes, exercício físico, apneia do sono deflagram alterações respiratórias associadas a plasticidade sensorial dos quimiorreceptores carotídeos (Barnett et al. 2017). O corpúsculo carotídeo é especialmente importante durante o sono, e disfunções desse órgão sensorial estão associadas às síndromes de apneia do sono e hipoventilação (Guyenet 2014).

O reflexo de Hering-Breuer (HBR) também é um importante mecanismo periférico para o controle da ventilação. Este reflexo é deflagrado pela ativação de receptores de estiramento pulmonar – mecanorreceptores localizados no parênquima pulmonar, que geram potenciais de ação em função do grau de insuflação pulmonar e promovem respostas de inibição motora inspiratória (Dutschmann et al. 2014). A remoção do feedback do HBR, por meio da vagotomia bilateral, instantaneamente transforma o padrão respiratório em um ritmo respiratório mais lento com aumento da amplitude inspiratória e maior duração da expiração (Lemes and Zoccal 2014). Este reflexo é uma forma de proteger o pulmão contra lesões, contudo é frequentemente considerado como um *feedback* sensorial inibitório que molda o padrão do motor respiratório, visto que este reflexo controla a profundidade da inspiração e promove a transição da inspiração para a expiração (Dutschmann and Dick 2012). Os sinais aferentes deste reflexo realizam suas primeiras sinapses no NTS, em células de segunda-ordem chamadas de *pump-cells* (Kubin et al. 2006). As *pump-cells*, por sua vez, enviam projeções para a VRG, promovendo a inibição dos neurônios inspiratórios (Kubin et al. 2006; Ezure and Tanaka 2004) e, assim, promovendo o término da inspiração (Bianchi et al., 1995; Kubin et al., 2006). Estudos mostram também que os músculos da laringe, da língua e do palato musculatura das vias aéreas são profundamente inibidas pela insuflação pulmonar, demonstrando que o HBR também desempenha um papel importante na regulação da atividade da musculatura das vias aéreas (Bailey et al. 2010; Sica et al. 1984).

Portanto, a ventilação é um processo altamente regulado e que requer a coordenação entre informações aferentes e a rede neural respiratória para o controle rítmico e coordenado dos músculos respiratórios, garantindo assim a manutenção da homeostase sanguínea dos gases.

Desenvolvimento do sistema respiratório

Ao longo da vida, há períodos críticos para o desenvolvimento e diferenciação do organismo, como visto durante a gestação, o período pós-natal e a puberdade (Papalia and Feldman 2013). Nesses períodos, o organismo se torna mais suscetível a sofrer mudanças no desenvolvimento (plasticidades), decorrente de influências ambientais (Gluckman et al. 2005). O sistema respiratório de mamíferos exibe a capacidade de “aprender” com a

experiências prévias, alterando o padrão das respostas ventilatórias (Feldman et al. 2003). De particular interesse, o período pós-natal é considerado um período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso central, no qual fatores ambientais, como por exemplo a hipóxia, podem alterar as propriedades estruturais e funcionais do aparelho respiratório (Martin and Abu-Shaweesh 2005; Peña and Ramirez 2005). As respostas e adaptações ao ambiente podem implicar em alterações fisiológicas persistentes, ou até mesmo patologias, na idade adulta (Champagnat et al. 2011). Para entender as adaptações que ocorrem em períodos críticos é importante entender como ocorre o desenvolvimento e quais fatores promovem plasticidades.

O início do desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso respiratório ocorre durante a vida embrionária (Champagnat et al. 2011). O início do desenvolvimento do CPG e dos motoneurônios respiratórios ocorre no período pré-natal, para apoiar a geração de movimentos respiratórios fetais intra-útero e, posteriormente, a respiração sustentada no nascimento (Borday et al. 1997; Champagnat et al. 2011). Portanto, durante a vida intra-uterina, os circuitos neurais responsáveis pelo controle da atividade respiratória já estão formados e ativos. Contudo tais circuitos encontram-se imaturos, pois a conectividade neuronal e as propriedades neuronais de excitabilidade não estão completamente desenvolvidas (Greer et al. 2006). Após o nascimento, durante os estágios iniciais da vida pós-natal, a rede neural respiratória continua a sofrer processos de amadurecimento neuronal, com a consolidação de sinapses, alterações na árvore dendrítica e modificações na excitabilidade neuronal (Champagnat et al. 2011). Além disso, há estudos em ratos mostrando que há alterações no balanço entre neurotransmissores excitatórios e inibitórios até o 15º dia de vida pós-natal (Luján et al. 2005). O NTS, por exemplo, apresenta aumento da excitabilidade neuronal em neonatos quando comparado a adultos, com rápidas alterações na morfologia durante o período pós-natal (Donnelly 2005).

Além dos mecanismos centrais, importantes modificações pós-natais são observadas nos mecanismos periféricos de controle da respiração. A maturação dos quimiorreceptores carotídeos, por exemplo, ocorre após o nascimento, deflagrado pela substituição do ambiente hipóxicos intra-útero (23-27 mmHg) pelo ambiente normóxico externo (95 - 100 mmHg) (Kumar and Prabhakar 2012). A atividade sensorial das células do corpúsculo carotídeo são, portanto, definidas de acordo com a exposição ao O₂ pós-natal (Gluckman et al. 2005). Assim, a maturação da atividade sensorial do corpúsculo

carotídeo durante o período pós-natal é acompanhada pelo desenvolvimento da resposta ventilatória à hipóxia, sendo, assim, menor em neonatos em relação à vida adulta (Moss 2000; Donnelly 2005).

Fica claro que desenvolvimento pós-natal consiste em um período crítico para o desenvolvimento da rede neural respiratória, tanto em aspectos centrais como periféricos. A maturação da rede neural respiratória, bem como dos sensores de oxigênio, garantem o funcionamento eficiente e coordenado afim de atender as demandas metabólicas do corpo e coordenar a respiração com outros comportamentos motores (Greer and Funk 2005). Por se tratar de uma janela crítica de desenvolvimento, insultos durante o período pós-natal estão associados ao desenvolvimento de alterações plásticas persistentes no funcionamento respiratório, alguns com repercussões patológicas sobre o organismo (Feinberg 2007; Barnett et al. 2017). Sugere-se que um maior risco de doença é criado por um descompasso entre o ambiente previsto durante a fase plástica (período pós-natal) do desenvolvimento e o ambiente real vivenciado na fase pós-plástica (fase adulta) (Feinberg 2007). Há cada vez mais evidências de que plasticidades pós-natais e a prematuridade estão associadas a consequências de longo prazo (Gluckman et al. 2005). Neste trabalho, trazemos à tona a relevância de distúrbios da homeostase do oxigênio durante o período pós-natal sobre a maturação do sistema respiratório e a capacidade de gerar susceptibilidade a disfunções respiratórias.

Hipóxia intermitente pós-natal

Episódios de hipóxia são comumente observados durante a fase pós-natal (Abu-shaweesh and Martin 2008). Tais episódios resultam de pausas respiratórias recorrentes que são comumente observadas em prematuros, devido a uma imaturidade dos mecanismos de controle respiratório, como também em recém-nascidos que apresentam irregularidades durante o sono (Martin et al. 2012). Como resultado, tais prematuros e recém-nascidos são expostos a períodos de hipóxia intermitente (HI), ou seja, períodos de hipóxia intercalados por período de normóxia. Estudos mostram que a exposição à HI é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovascular em adultos (Stöwhas et al. 2019). Contudo, os efeitos da HI durante a fase pós-natal, e suas

implicações no controle da atividade motora respiratória na vida adulta ainda não foram elucidados.

Em adultos, episódios de HI são comumente observados em pacientes com apneia obstrutiva do sono (AOS) em funções dos episódios recorrentes de obstrução das vias aéreas superiores durante o sono (Stöwhas et al. 2019). Estudos em ratos demonstram que a exposição aguda (minutos-horas) à HI promove uma facilitação da atividade motora inspiratória, especialmente do nervo frênico, o qual seria determinante em promover um aumento persistente (até 1 h) da ventilação pulmonar – fenômeno chamado de *ventilatory long-term facilitation* (vLTF, ou facilitação ventilatória de longo prazo) (Devinney et al. 2013; Devinney et al. 2015; Lemes et al. 2016). De forma crônica (dias-semanas), a exposição a HI promove uma sensibilização dos quimiorreceptores carotídeos e uma potenciação da resposta ventilatória à hipóxia, por mecanismos dependentes da formação de estresse oxidativo e recrutamento do fator induzido por hipóxia tipo 1 alfa (HIF-1 α , do inglês *hypoxic induce fator*) (Peng and Prabhakar 2019; Peng et al. 2009; Prabhakar and Semenza 2012). Além disso, há evidências de que a HI crônica, em animais jovens, altera o padrão respiratório basal, deflagrando o padrão de expiração ativa (contrações abdominais) em condições de repouso por modificações em mecanismos centrais (Zoccal et al. 2008; Moraes et al. 2013).

Durante o período pós-natal, 50 a 70% dos prematuros são expostos à HI (Nieto et al. 2000). Estudos em ratos demonstram que a hipóxia intermitente durante o período pós-natal (pCIH, *postnatal chronic intermitent hypoxia*) promove aumento da ventilação pulmonar e aumento da sensibilidade a hipóxia a curto prazo (2^o e 10^o dia) (Peng et al. 2004; Julien et al. 2008). Diferentemente do que se é observado em adultos, à exposição à HI durante essa fase pós-natal parece introduzir alterações no sistema cardiorrespiratório, as quais parecem persistir na vida adulta, mesmo após a retirada do estímulo de HI – um fenômeno denominado de *developmental plasticity* ou *postnatal programming* (Nanduri and Prabhakar 2013; Gluckman et al. 2005). Em relação à atividade respiratória, evidências experimentais mostram que ratos expostos à HI durante as fases iniciais do período pós-natal apresentam, na vida adulta, uma exacerbação da sensibilidade periférica à hipóxia (Peng et al. 2004), maior resposta ventilatória à hipóxia (Prabhakar et al. 2007) e irregularidades respiratórias com períodos recorrentes de apneia (Nanduri et al. 2012). Entretanto, não há evidências se a exposição à HI durante a vida

pós-natal é capaz de modificar o padrão motor respiratório – modificações essas que poderiam afetar a ventilação pulmonar.

Mecanismos epigenéticos e hipóxia intermitente pós-natal

Efeitos duradouros de desafios ambientais são muitas vezes mediados por mecanismos intracelulares que promovem alterações persistentes da expressão gênica, sem causar mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA (Feinberg 2007). Tais modificações, denominadas como modificações epigenéticas, são essenciais para o desenvolvimento e para a diferenciação celular (Caldji et al. 2011). A regulação epigenética pode ser modificada por fatores ambientais, tais como alimentação, uso de drogas, exercício físico e estresse (Dolinoy et al. 2007), especialmente durante as janelas críticas de desenvolvimento, tais como a gestação e o período pós-natal (Feinberg 2007). Como exemplo, é observado que a desnutrição materna durante a gestação resultou em prole com menores pesos e alturas ao nascimento, bem como redução da circunferência da cabeça (Kitsiou-Tzeli and Tzetis 2017). Enquanto a exposição a fome durante a gestação resultou em um aumento de três vezes na doença coronariana, e neste caso genes envolvidos no metabolismo energético, adipogênese, homeostase da glicose, sinalização de insulina, codificação de hormônios (leptina) e receptores nucleares de fatores de transcrição adipogênica e lipogênica foram particularmente encontrados regulado por mecanismos epigenéticos nestes indivíduos (Jousse et al. 2011). Os quatro principais mecanismos da regulação epigenética são: 1) metilação do DNA; 2) modificação de histonas; 3) alterações na conformação de cromatina; e 4) padrões de RNAs não-codificantes (Mehler 2008). A metilação do DNA, principal mecanismo epigenéticos, é altamente regulada por fatores ambientais e proporciona aumento da afinidade do DNA com as histonas, o que leva aumento da condensação da cromatina (Miller et al. 2008). A metilação do DNA refere-se à incorporação de grupos metil, por meio das metiltransferases do DNA (DNMT), à citosina presentes, principalmente, nas ilhas de CpG (Mehler 2008). Como resultado, têm-se descrito que a metilação do DNA promove, normalmente, um silenciamento da transcrição gênica (Mehler 2008; Feinberg 2007).

Há evidências de que a HI, durante a vida pós-natal, parece estimular os processos de metilação do DNA, promovendo efeitos persistentes sobre a função cardiorrespiratória

(Nanduri et al. 2012; Nanduri et al. 2019). Estudos de Nanduri *et al.* demonstraram que a inibição do processo de metilação do DNA em ratos neonatos submetidos à HI durante a fase pós-natal preveniu o desenvolvimento das irregularidades respiratórias e hipersensibilidade dos quimiorreceptores periféricos em ratos jovens. De acordo com os autores, tais alterações induzidas pela HI pós-natal decorreram da hiper-metilação de genes codificadores de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) no corpúsculo carotídeo, devido a super-expressão das enzimas DNMT e do fator de transcrição HIF-1 α nas células quimiossensíveis.

Dessa forma, pode-se sugerir que o processo de metilação do DNA é um processo chave na indução de alterações cardiovascular induzidas pela HI na fase pós-natal. Nesse sentido, é possível considerar a hipótese de que as possíveis modificações no funcionamento e interação dos sistemas simpático e respiratório dependam de modificações epigenéticas, incluindo a metilação do DNA em neurônios simpático e respiratórios da superfície ventral do bulbo. Estudos recentes mostram que as alterações cardiorrespiratórias induzidas pela HI, em animais adultos, estão criticamente associadas com a ativação do fator de transcrição induzido pela hipóxia HIF-1 - fator de transcrição capaz de regular a transcrição de outros genes em resposta a hipóxia (Semenza and Prabhakar 2007; Prabhakar and Semenza 2012) Portanto, é provável que uma das possíveis repercussões moleculares das alterações epigenéticas induzidas pela HI pós-natal seja a o aumento dos níveis de HIF-1. Contudo, não há estudos na literatura mostrando a correlação entre HI, alterações epigenéticas e a expressão de HIF, especialmente em regiões da superfície ventral envolvidas com o controle da atividade simpática e respiratória. Tais observações experimentais indicam a participação dos mecanismos epigenéticos, especialmente aqueles relacionados à metilação do DNA, nas alterações na quimiossensibilidade carotídea induzidas pelas IH pós-natal. Entretanto, não há evidências se a metilação de DNA deflagrada pela IH pós-natal pode induzir alterações nos mecanismos de controle motor respiratório, com repercussões na ventilação pulmonar durante a vida jovem e adulta.

Diante das informações e observações apresentadas anteriormente, nesse estudo consideramos a hipótese de que a exposição à hipóxia intermitente pós-natal promove alterações persistentes no controle motor respiratório, as quais apresentam correlações diretas com as alterações na ventilação pulmonar, como, por exemplo, o surgimento de irregularidades respiratórias. Além disso, consideramos que tais alterações motoras

estejam relacionadas às modificações no CPG, induzidas por mecanismos epigenéticos associados à metilação do DNA.

OBJETIVO

Estudar as alterações respiratórias em ratos jovens e adultos promovidas pela exposição à hipóxia intermitente durante o período pós-natal e a contribuição dos mecanismos associados à metilação do DNA em tais modificações.

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o padrão da ventilação pulmonar, pelo método de pletismografia de corpo inteiro, em ratos jovens e adultos submetidos à hipóxia intermitente pós-natal.
- 2) Avaliar a atividade de nervos motores respiratórios, pelo método da preparação coração tronco-cerebral isolados, em ratos jovens submetidos à hipóxia intermitente pós-natal.
- 3) Verificar a participação de mecanismos epigenéticos, por meio da inibição dos mecanismos dependentes da metilação do DNA, no desenvolvimento das alterações ventilatórias em ratos jovens e adultos expostos à hipóxia intermitente durante o período pós-natal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e aprovação ética

Foram utilizados ratos e ratas Holtzman, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAR), Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Patologia, FOAR/UNESP, e acompanhados durante o período de cruzamento, gravidez e lactação, para controle do início dos procedimentos experimentais. Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humidade (50–60%), com ciclo claro/escuro de 12:12h (luzes acessas às 07:00 h); e com livre acesso a ração e a água. Todos os procedimentos experimentais estão em conformidade com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório publicado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara (protocolo CEUA 14/2015). Todas as ações de cuidado e manejo com os animais foram realizadas de forma a evitar qualquer estresse não intencional, principalmente para as mães e os recém-nascidos. O protocolo experimental iniciava-se um dia após o nascimento (P1), no qual a ninhada era reduzida a 7-8 filhotes machos por mãe e era submetida aos protocolos de normóxia ou hipóxia intermitente, conforme descrito posteriormente. A partir do vigésimo primeiro dia (P21), os animais foram desmamados e utilizados para as avaliações de peso corporal, para a avaliação da atividade dos nervos respiratórios e da ventilação pulmonar quando jovens (P21-P45); e avaliação da ventilação pulmonar quando adultos (P90-99) (figura 3).

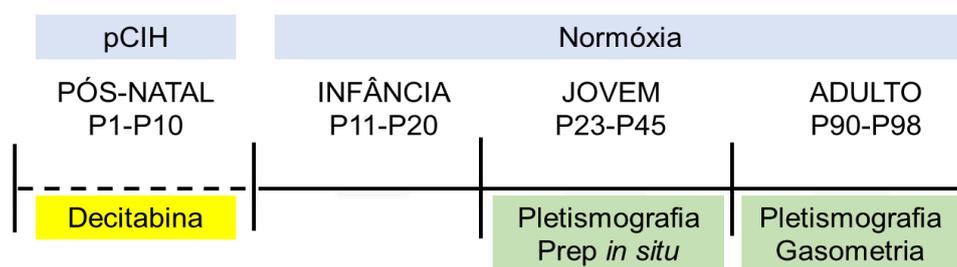


Figura 3. Protocolo experimental. A exposição a pCIH foi realizada durante o período pós-natal, assim como o tratamento com decitabina. Após o período pós-natal, os animais eram mantidos em normóxia. Os registros de ventilação feitos na pletismografia foram realizados em jovens e adultos. A preparação *in situ* (prep *in situ*) foi realizada apenas em jovens e as medidas de gasometria arterial foram realizadas apenas em animais adultos.

Hipóxia intermitente crônica pós-natal (pCIH)

O protocolo de hipóxia intermitente crônica pós-natal (pCIH, do inglês: *post-natal chronic intermittent hypoxia*) foi realizado durante os 10 primeiros dias de vida (P1-P10). No primeiro dia de vida pós-natal (P1), os filhotes de ratos juntamente com suas mães foram alojados em gaiolas coletivas e colocados dentro de câmaras (volume: 100 L) que permitiram o controle da fração inspirada de oxigênio (FiO_2), por meio de um sistema computadorizado (Oxycycler, Biospherix, Lacona, NY, EUA) acoplado a sensores para oxigênio (O_2) e válvulas solenoide que comandavam, automaticamente, injeções de O_2 e nitrogênio (N_2) puros (White Martins, Sertãozinho, Brasil) nas câmaras. As condições de temperatura, umidade, ciclo claro/escuro e acesso a alimentos/água no interior das câmaras foram mantidas conforme mencionado anteriormente. Ratos do grupo pCIH foram expostos a ciclos periódicos de hipóxia (FiO_2 de 6% por 30-40 s), induzido por injeções de N_2 dentro da câmara por 4 min. Após esse período hipóxico, o O_2 era injetado dentro da câmara para retornar e manter a FiO_2 em 20,8% por 5 min (ver figura 4). Estes ciclos de 9 min ocorreram durante 8 horas / dia (9:30 - 17:30). Nas 16 horas restantes, os animais do grupo pCIH foram mantidos sob condições de normóxia. Os animais do grupo controle foram mantidos nas condições descritas acima, exceto que a FiO_2 fora mantida em 20,8% (normóxia) durante todo o protocolo experimental (P1-P10), por meio das injeções constantes de O_2 e N_2 dentro das câmaras (ver figura 4). Injeções de gases foram realizadas na porção superior das câmaras para evitar que os jatos de ar atingissem diretamente os animais. Após a exposição à pCIH ou normóxia, os animais retornaram ao biotério setorial, e foram mantidos em normóxia até o dia dos experimentos. Grupos separados de animais foram expostos a pCIH por 15 dias (de P1 a P15) (n=13). Como os parâmetros fisiológicos avaliados foram semelhantes entre os grupos de animais expostos à pCIH por 10 e 15 dias (em relação aos respectivos grupos normóxia), esses diferentes subgrupos experimentais foram agrupados em um único grupo pCIH.

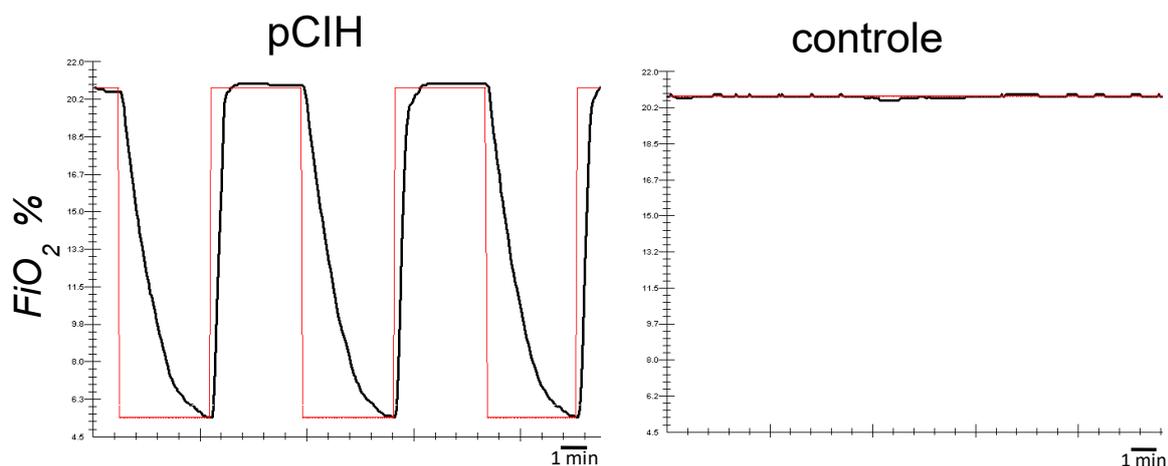


Figura 4. Protocolo pCIH. Registros contínuos da fração de oxigênio do ar inspirado (FiO_2) dentro das câmaras nas quais os animais foram submetidos à pCIH (painel à esquerda) ou mantidos em normóxia (painel à direita). A linha laranja representa o ciclo teórico de abertura e fechamento das válvulas dos gases, enquanto que a linha preta representa a medida da FiO_2 .

Administração do inibidor da metilação do DNA

Com o objetivo de investigar a participação dos mecanismos dependentes da metilação do DNA, os animais expostos à pCIH ou mantidos em normóxia (controle) receberam injeções i.p. do inibidor da enzimas responsáveis pela metilação do DNA (DNMT, do inglês *DNA methyl-transferases*), a decitabina (5-azacitidina, Sigma-Aldrich, 1 mg/kg) ou solução veículo (solução de Ringer, composição descrita abaixo). A administração de decitabina ou veículo foi realizada a cada 3 dias (em P1, P4, P7 e P10), 15 minutos antes do início da exposição à pCIH (figura 3). A dose e o protocolo de administração utilizados nesse estudo foram baseados em estudos prévios da literatura (Nanduri et al., 2012; Oki et al., 2007).

Medidas de ventilação pulmonar

A ventilação pulmonar foi medida em ratos jovens e adultos pelo método de pletismografia de corpo inteiro (Emka Technologies, Paris, França; ou PowerLab 8/35, ADInstruments, Sydney, Australia), conforme descrito anteriormente (Flor et al., 2018). Os animais foram mantidos individualmente em uma câmara de acrílico (5 L) conectada a um transdutor de pressão de alta sensibilidade e a uma bomba de exaustão que, continuamente, renovava ar no interior da câmara (fluxo: 1,5 L/min), mantendo constantes as concentrações fracionais dos gases, temperatura e umidade no interior da câmara. Para tanto, a câmara possuía um pequeno orifício, o qual era parcialmente vedado

utilizando um filtro apropriado. Por se tratar de um sistema aberto, as oscilações da pressão geradas a partir da respiração permitiram estimar os fluxos inspiratório e expiratório. Os sinais relacionados à respiração foram amplificados e adquiridos a 1 kHz (IOX, versão 2.8, Emka Technologies; ou LabChart, versão 7, módulo de espirometria, ADInstruments). A temperatura da câmara, a umidade e a pressão atmosférica foram monitoradas continuamente durante os experimentos por meio de sensores acoplados a câmara e a bomba de exaustão.

No dia dos experimentos, os animais foram colocados dentro da câmara e um período de 45 a 60 minutos foi permitido para estabilização animal e aclimação. Após esse período, a ventilação pulmonar de repouso foi monitorada por 20-30 min. Em alguns animais, a ventilação inicial foi registrada por 45 a 60 minutos para análises da variabilidade respiratória (descritos a seguir). Os parâmetros avaliados foram: (i) intervalo de tempo entre picos de fluxo inspiratório consecutivos (expressos em s), utilizados para calcular a frequência respiratória média (f_R , $breath.min^{-1}$, respirações por minuto) e analisar o padrão temporal da variabilidade da frequência respiratória; (ii) volume corrente (V_T , $ml.kg^{-1}$), estimado a partir da área sob a curva do fluxo inspiratório, utilizando como referência um volume de ar calibrado injetado a partir de uma seringa de 5 mL (ver figura 5); (iii) ventilação minuto (V_e , $ml.kg^{-1}.min^{-1}$).

Análises da f_R , V_T e V_e em repouso foram realizadas durante períodos de respiração tranquila. Para a análise da variabilidade da frequência respiratória, a duração de cada ciclo respiratório (ao longo de um período de, pelo menos, 15 min) foi determinada e plotada em função da duração do ciclo respiratório posterior (*breath-to-breath variability*), gerando o gráfico de dispersão (diagrama de *Poincaré*). Neste diagrama, foram quantificados dois valores de desvio padrão, relacionados à distribuição dos pontos: i) SD1, definido como a dispersão de pontos ao longo da linha de identidade; e ii) SD2, definido como a dispersão de pontos perpendiculares à linha de identidade através do centro do gráfico.

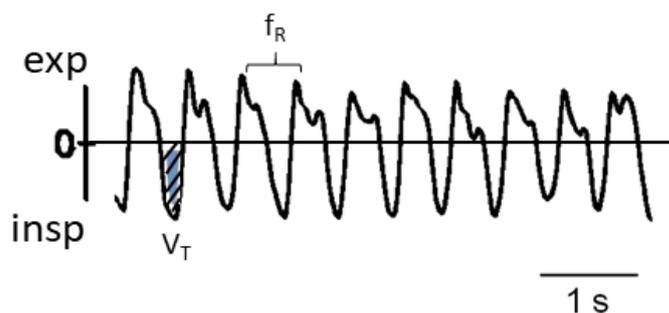


Figura 5. Registro representativo da ventilação pulmonar. O EMKA é um método de pletismografia de corpo inteiro de sistema aberto, no qual são evidenciadas as oscilações relacionadas à inspiração (valores negativos) e à expiração (valores positivos). Estima-se a frequência respiratória a partir do intervalo entre sucessivos ciclos respiratórios. Em azul e rachurado, está representado a área do fluxo inspiratório, utilizado para o cálculo do volume corrente.

Registros da atividade elétrica de nervos motores na preparação *in situ* coração tronco-cerebral isolados

Ratos jovens foram cirurgicamente preparados para obter preparações *in situ*, como descrito anteriormente (Flor et al., 2018; Paton, 1996; Zoccal et al., 2008). Os animais foram inicialmente anestesiados com isoflurano (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil) até a perda do reflexo de retirada da pata, seccionados caudalmente ao diafragma, submersos em solução gelada de Ringer (em mM: NaCl, 125; NaHCO₃, 24; KCl, 3,75; CaCl₂, 2,5; MgSO₄, 1,25; KH₂PO₄, 1,25; glicose, 9,9) e decerebrados a nível pré-colicular. Os pulmões e o coração foram removidos e, posteriormente, a preparação foi transferida para uma câmara de registro para que a aorta descendente foi canulada com um cateter de duplo lúmen para a realização da perfusão retrograda utilizando uma bomba peristáltica (Watson-Marlow 502s, Falmouth, Cornwall, UK). O perfusato consistiu em solução de Ringer contendo 1,25% de polietilenoglicol (um agente oncótico, Sigma, St Louis, EUA) e bloqueador neuromuscular (brometo de vecurônio, 3-4 µg / mL, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda). A solução foi gaseificada continuamente com 95% de O₂ - 5% de CO₂ para fornecimento de gás (PO₂ 300-350 mmHg e PCO₂ 35-40 mmHg) e manutenção do pH (7,40), aquecida à 31-32 ° C e filtrada com malha de nylon (tamanho do poro: 25 µm). A pressão de perfusão foi monitorada através do segundo lúmen do cateter (conectado a um transdutor de pressão; MLT06070, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e mantida entre 50-70 mmHg, ajustando o fluxo de perfusão (21-25 mL/min)

e adicionando vasopressina ao perfusato (0,6 - 1,2 nM, Sigma, St. Louis, MO, EUA) para promover vasoconstrição.

Após o início da perfusão, os nervos frênico (PN), hipoglosso (HN) e vago (cVN) foram isolados e suas atividades eferentes registradas simultaneamente usando eletrodos de sucção de vidro bipolar mantidos em manipuladores 3D (Narishige, Tóquio, Japão). O PN esquerdo foi isolado em sua inserção no diafragma; o HN direito (HN) foi isolado abaixo da mandíbula e o cVN direito foi isolado na porção cervical, abaixo da bifurcação da artéria carótida. Os sinais bioelétricos foram amplificados (CP511 Amplificador, Grass Technologies, RI, EUA), filtrados (0,3-3 kHz) e adquiridos por conversor A/D (amostragem de 5000, micro1401, Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, Inglaterra) em um computador usando o software Spike 2 (versão 7, Cambridge Electronic Design). As análises das atividades nervosas foram realizadas *off-line* em sinais retificados e “integrados” (*smoothed*, constante de tempo de 50 ms) utilizando *scripts* apropriados para o software Spike 2.

A atividade do PN foi analisada pela amplitude (μV), frequência (ciclos por minuto, cpm), duração (duração da inspiração, s), e intervalo (duração da expiração, s) dos seus *bursts* (conjunto de potenciais de ação). Ademais, foi analisado coeficiente de variação da frequência de disparos do PN, de forma a avaliar a variabilidade respiratória das preparações *in situ*. A atividade de HN foi avaliada pela sua amplitude dos *bursts* (μV) e duração (em s) da atividade que precedeu os *bursts* de PN (componente pré-inspiratório, pre-I) (ver figura 6). A atividade de cVN foi determinada como a atividade média (μV) durante as fases inspiratória (coincidente com os *bursts* do PN) e pós-inspiratória (atividade decrescente observada desde o início da expiração até o silenciamento da atividade vagal), bem como amplitude de pico do componente pós-inspiratório (μV) (Figura 6). O tempo pós-inspiratório foi analisado pela duração total (s) e normalizado pelo tempo expiratório total (%). Por fim, foi realizada a análise de

correlação entre as amplitudes (μV) do PN e cVN (pico pós-inspiratório), utilizando o método da correlação de Pearson.

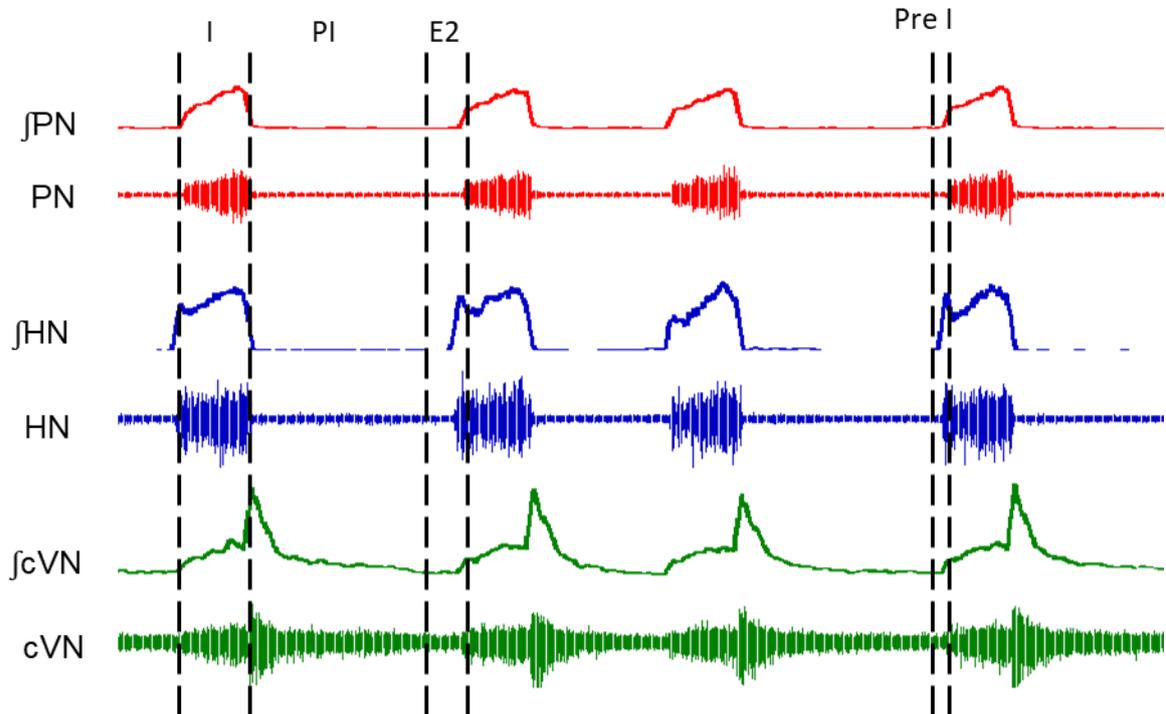


Figura 6. Registros originais e integrados (\int), representativo do grupo controle, da atividade do nervo frênico (PN), hipoglossal (HN) e vago (cVN) durante a preparação *in situ*. O nervo frênico inerva a musculatura do diafragma, o hipoglossal inerva a musculatura da língua e vago inerva musculatura abduzora e adutora da laringe. Nesta figura é indicado o período inspiratório (I), pós-inspiratório (PI), expiração final (E2) e pré-inspiratório (Pré-I). A sincronia da atividade motora se deve ao controle neural respiratório.

Respostas motoras à hipercapnia, hipocapnia e estimulação dos quimiorreceptores periféricos

Após estabilização das preparações (30-40 min após o início da perfusão), foram realizados os registros basais das atividades PN, HN e cVN (figura 6). Em seguida, as preparações *in situ* foram expostas à hipercapnia, por meio do aumento da concentração fracional de CO_2 do perfusato de 5% para 7% ou 10% (equilibrado com O_2) durante 5 min (figura 7). Os estímulos foram realizados seguindo protocolo preestabelecido e um

intervalo de pelo menos 10 min foi considerado entre estímulos sucessivos. As alterações máximas nas atividades dos nervos registrados foram observadas entre o 3º e o 5º minuto de exposição. Nesse período, os parâmetros foram então avaliados conforme descrito anteriormente, e as repostas foram expressas em percentual de variação em relação ao período basal correspondente. Após a exposição à hipercapnia, as preparações *in situ* foram também expostas à hipocapnia, a fim de avaliar possíveis alterações no *drive* de CO₂ necessário para a respiração (limiar apnêico). Para isso, as preparações foram expostas à 1% CO₂ (balanço com O₂) por 5-7 min. Foi quantificado o tempo (em segundos, s), a partir do início da perfusão com solução a hipocápica, necessário para promover o silenciamento, por no mínimo 20 s, do PN. Além disso, também foi avaliado o tempo necessário para o restabelecimento da atividade do PN após o retorno a normocapnia (5% CO₂).

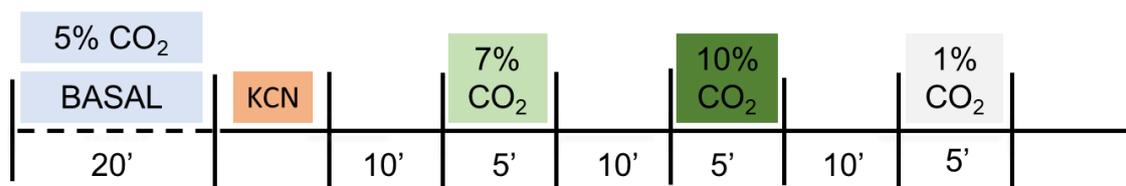


Figura 7. Protocolo experimental durante a preparação *in situ*. Após a estabilização da preparação, foi registrado 20 minutos de basal. Após injeção de KCN, hipercapnia 7% CO₂ (5 minutos), hipercapnia 10% CO₂ (5 minutos), hipocapnia 1% CO₂ havia períodos de recuperação (10 minutos).

Afim de avaliar a resposta respiratória à estimulação dos quimiorreceptores periféricos em preparações *in situ*, foi realizado injeções intra-arteriais de cianeto de potássio (KCN, 0,05%, 50-60 µL). Esse procedimento promoveu respostas transientes (6-10 s) de estimulação respiratória. As repostas foram avaliadas como variações absolutas e percentuais dos parâmetros respiratórios (conforme descrito anteriormente) entre as alterações máximas e a correspondente atividade basal.

Gasometria arterial

Um dia antes dos experimentos, os animais adultos (P90-99) foram anestesiados com cetamina (1mg/kg) e xilazina (2 mg/kg) para o implante de um cateter na artéria femoral (tubos de polietileno PE-10 soldados a tubos de polietileno PE-50), o qual foi fixado e posteriormente exteriorizado no dorso do animal. No dia seguinte, quando os animais apresentaram recuperados do procedimento cirúrgico, uma amostra de sangue arterial (0,15 mL) foi coletada, em condições de repouso (normoxia/normocapnia), para a análise da gasometria arterial utilizando um aparelho e cartuxo apropriados (aparelho: I-Stat – Abbot-Laboratory, IL, EUA, cartuxo: ECG7+). Foram avaliados os seguintes parâmetros: pH, pressão parcial de CO₂ (PaCO₂, mmHg), pressão parcial de O₂ (PaO₂, mmHg), saturação oxigênio-hemoglobina (sO₂, %), bicarbonato (HCO₃⁻, mmol/l) e lactato (mmol/l) plasmáticos.

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. A distribuição dos dados foi verificada antes das comparações usando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As alterações no peso corporal, ventilação pulmonar e variabilidade respiratória de ratos jovens e adultos e atividades dos nervos respiratórios *in situ* foram comparadas utilizando ANOVA de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni. As comparações foram feitas entre todos os grupos e estão descritas nos resultados, mas, por simplificação, a apresentação dos gráficos ilustra apenas a comparação dos animais pCIH com seus respectivos controles. O intervalo de confiança foi estabelecido em 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$. Operações gráficas e análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 8, GraphPad, La Jolla, EUA).

RESULTADOS

Efeitos da pCIH sobre o peso corporal de ratos jovens e adultos

Em P1, antes do início do protocolo experimental, os filhotes de todos os grupos apresentaram pesos corporais semelhantes [$7,8 \pm 0,7$ vs $8,1 \pm 0,9$ vs $8,1 \pm 0,9$ vs $7,6 \pm 0,5$ g, respectivamente grupos controle (n = 21), pCIH (n = 43), controle + decitabina (n = 34) e pCIH + decitabina (n = 20), Figura 8A]. A exposição à pCIH, assim como o tratamento com decitabina, reduziu o peso corporal de animais jovens [F (3, 138) = 123,1; P <0,001]. Após o desmame (P21-25), os ratos expostos ao pCIH exibiram menor peso corporal que os ratos controle [50 ± 3 vs 42 ± 8 g; respectivamente grupos controle (n=10) e pCIH (n=11), P <0,001; Figura 8B]. O tratamento com decitabina promoveu a redução do peso corporal dos animais pCIH e controle quando comparado aos animais que receberam veículo neste período, sendo que a combinação pCIH + decitabina causou redução adicional no peso corporal [43 ± 5 vs 26 ± 6 g; respectivamente grupos controle + decitabina (n=10) e pCIH + decitabina (n=8), P <0,001; Figura 8B]. Na idade de P40-P45, um padrão semelhante de diferenças de peso corporal foi observado entre os animais dos grupos experimentais [88 ± 3 vs 79 ± 2 vs 77 ± 3 vs 61 ± 2 g, respectivamente controle (n = 7), pCIH (n = 28), controle + decitabina (n = 17) e pCIH + decitabina (n = 8), F (3,56) = 8,238, P = 0,0001, Figura 8C]. Na idade adulta (P90-99), o peso corporal foi semelhante entre os grupos experimentais [358 ± 10 vs 343 ± 16 vs 342 ± 16 vs 338 ± 10 g, respectivamente controle (n = 5), pCIH (n = 5), grupos controle + decitabina (n = 6) e pCIH + decitabina (n = 5), F 3,17) = 0,1349; Figura 8D].

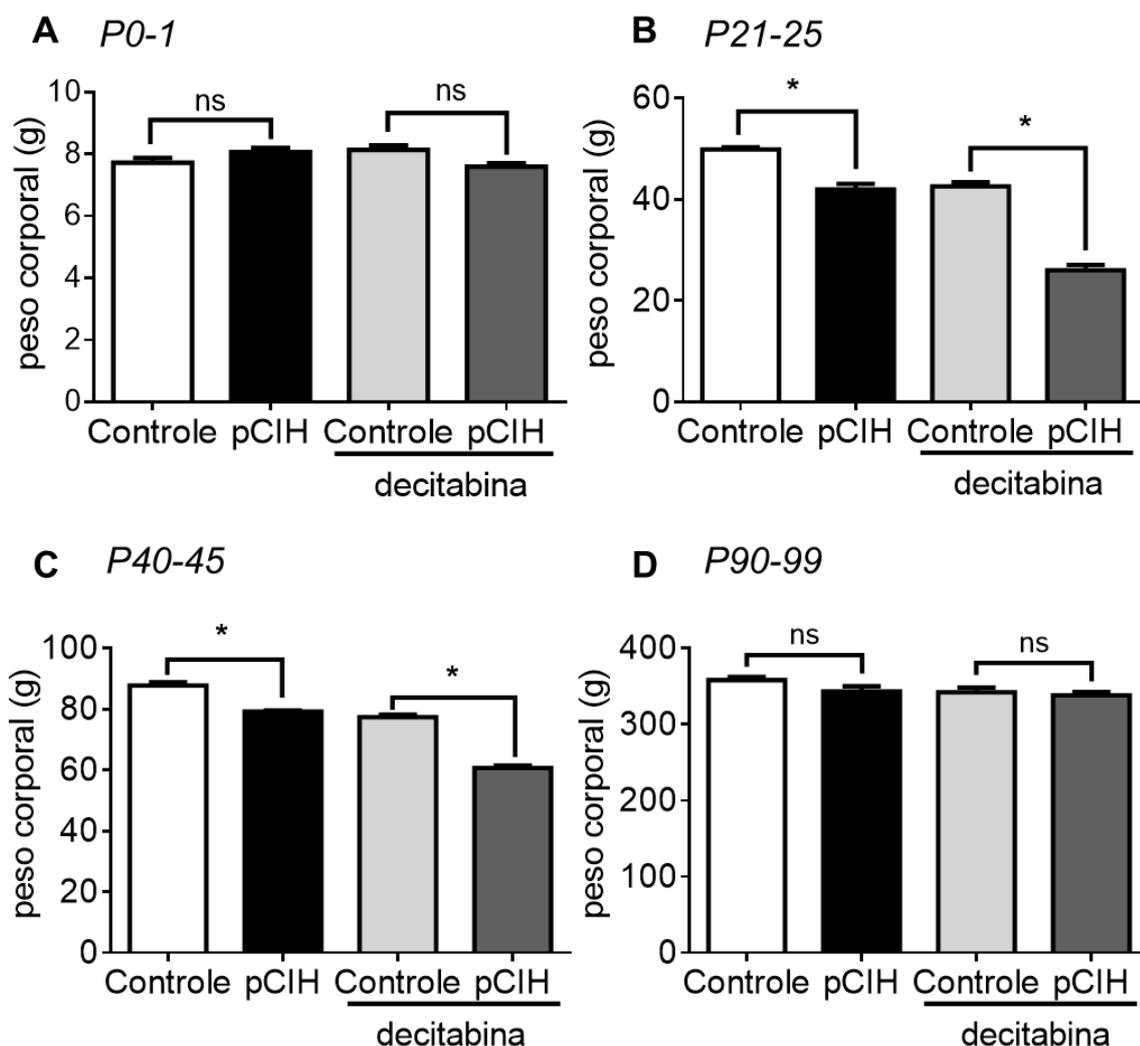


Figura 8. Efeitos da pCIH e do tratamento com a decitabina no peso corporal. Valores médios do peso corporal de ratos mantidos em normóxia (controle, n=21) ou expostos a hipóxia intermitente crônica durante o período pós-natal (de P1 a P10, pCIH, n= 43), que receberam tratamento com veículo (n=34) ou decitabina (1 mg / kg, n=20) ao longo das idades: após o nascimento (P0-1, A) e em P21-25 (B), P40-45(C) e P90-99 (D). Ns - não estatisticamente significativo; * - diferente do grupo controle correspondente, P <0,05.

Ventilação pulmonar de ratos jovens expostos à pCIH

Ratos expostos à pCIH apresentaram mudanças significativas na ventilação pulmonar em repouso, as quais foram marcadamente atenuadas pelo tratamento com decitabina (Figura 9). Especificamente, ratos expostos à pCIH (n = 28), durante respiração em repouso, apresentaram aumento na ventilação minuto comparado aos controles (n = 17) (1378 ± 168 vs 1844 ± 114 mL.min⁻¹.kg⁻¹; F (3,58) = 7,795, P = 0,0066; Figura 10A), devido a um aumento do volume corrente ($11,7 \pm 0,9$ vs $16,2 \pm 0,5$ mL.kg⁻¹; F (3,58) = 7,466, P = 0,0012; Figura 10B). A frequência respiratória foi semelhante

entre os grupos controle e pCIH (116 ± 5 vs 118 ± 2 breaths.min⁻¹; $P > 0,99$ Figura 10C). Os ratos controles que receberam o tratamento com decitabina de P1 a P10 ($n = 19$) exibiram parâmetros respiratórios semelhantes aos animais controles que receberam veículo (Figura.10A-C, $P > 0,05$). A ventilação minuto (1438 ± 84 vs 1732 ± 101 mL.min⁻¹.kg⁻¹; $P = 0,2324$; Figura 10A), o volume corrente ($13,5 \pm 0,6$ vs $15,9 \pm 0,7$ mL.min⁻¹; $P = 0,2569$; Figura 10B) e frequência respiratória (107 ± 4 vs 109 ± 5 breaths.min⁻¹; $P > 0,99$; Figura 10C) de ratos pCIH tratados com decitabina ($n = 7$) também não foram estatisticamente diferentes do grupo controle + decitabina, contudo quando comparado ao grupo controle que recebeu veículo, os animais pCIH + decitabina apresentaram maior volume corrente.

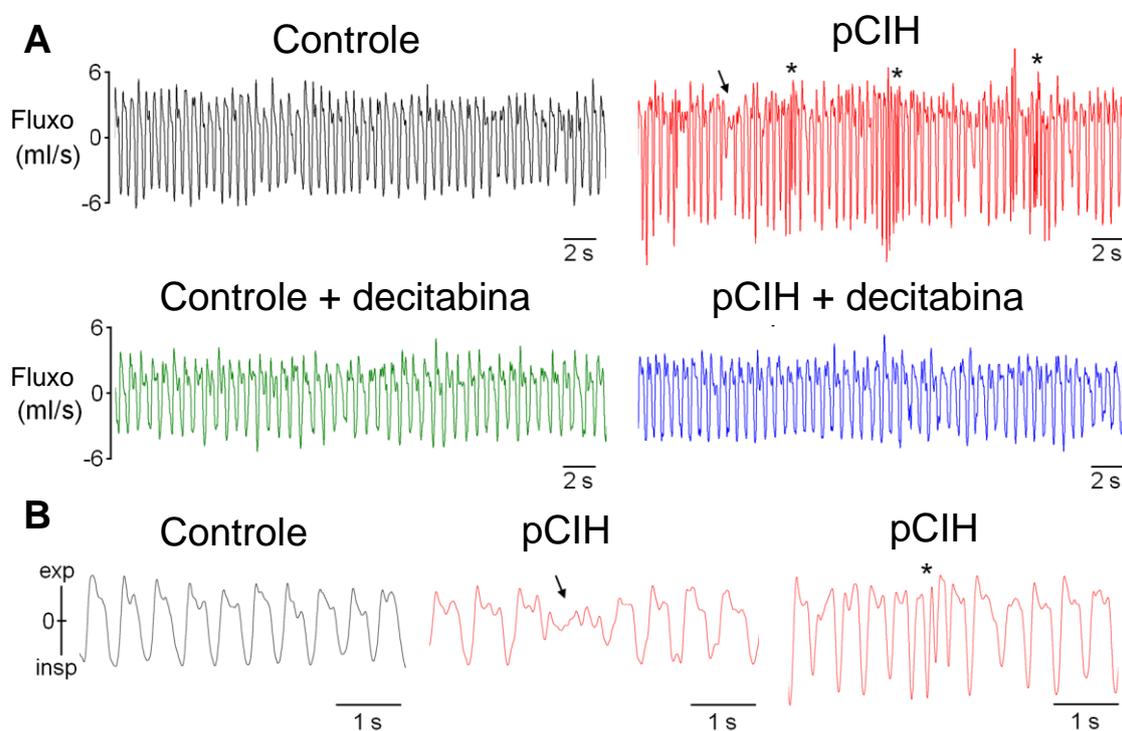


Figura 9. Padrão respiratório de ratos jovens expostos ao pCIH. A. Registros representativos de seus respectivos grupos experimentais de ventilação pulmonar, ilustrando as alterações no padrão respiratório induzido pela pCIH (seta indica uma pausa expiratória curta e os asteriscos indicam períodos de alta frequência respiratória) e os efeitos tratamento com decitabina (1 mg / kg). B. Registros expandidas dos traçados superiores do painel A, demonstrando o padrão de respiração dos animais de controle e as irregularidades respiratórias observadas nos ratos pCIH.

Além da ventilação basal aumentada, os ratos pCIH ($n = 7$) exibiram irregularidades respiratórias (Figura 9A-B), caracterizadas por episódios de frequência respiratória elevada e períodos curtos de fluxo aéreo reduzido ou ausente

(hipopneia/apnéia; Figura 9B). Estas irregularidades não foram observadas em ratos controles (n = 7; 9A-B). Como resultado, os animais do grupo pCIH exibiram uma variabilidade respiratória aumentada, quando analisado a relação da duração de sucessivos ciclos respiratórios (*breath-to-breath variability*), em comparação com o grupo controle (SD1: $0,085 \pm 0,008$ vs $0,154 \pm 0,018$ s; $F(3, 24) = 7,973$, $P = 0,0017$, Figura. 10D e E ; SD2: $0,102 \pm 0,006$ vs $0,124 \pm 0,011$ s; $F(3, 24) = 2,719$, $P = 0,0669$, Figura 10D e F). O tratamento com decitabina não modificou a regularidade respiratória de ratos controle (n = 7), porém foi capaz de prevenir as irregularidades respiratórias de ratos expostos à pCIH (n = 7) (SD1: $0,091 \pm 0,008$ vs $0,093 \pm 0,006$ s; $P > 0,99$, Figura. 10D e E; SD2: $0,127 \pm 0,007$ vs $0,1329 \pm 0,007$ s; $P > 0,99$, Figura 10D-F).

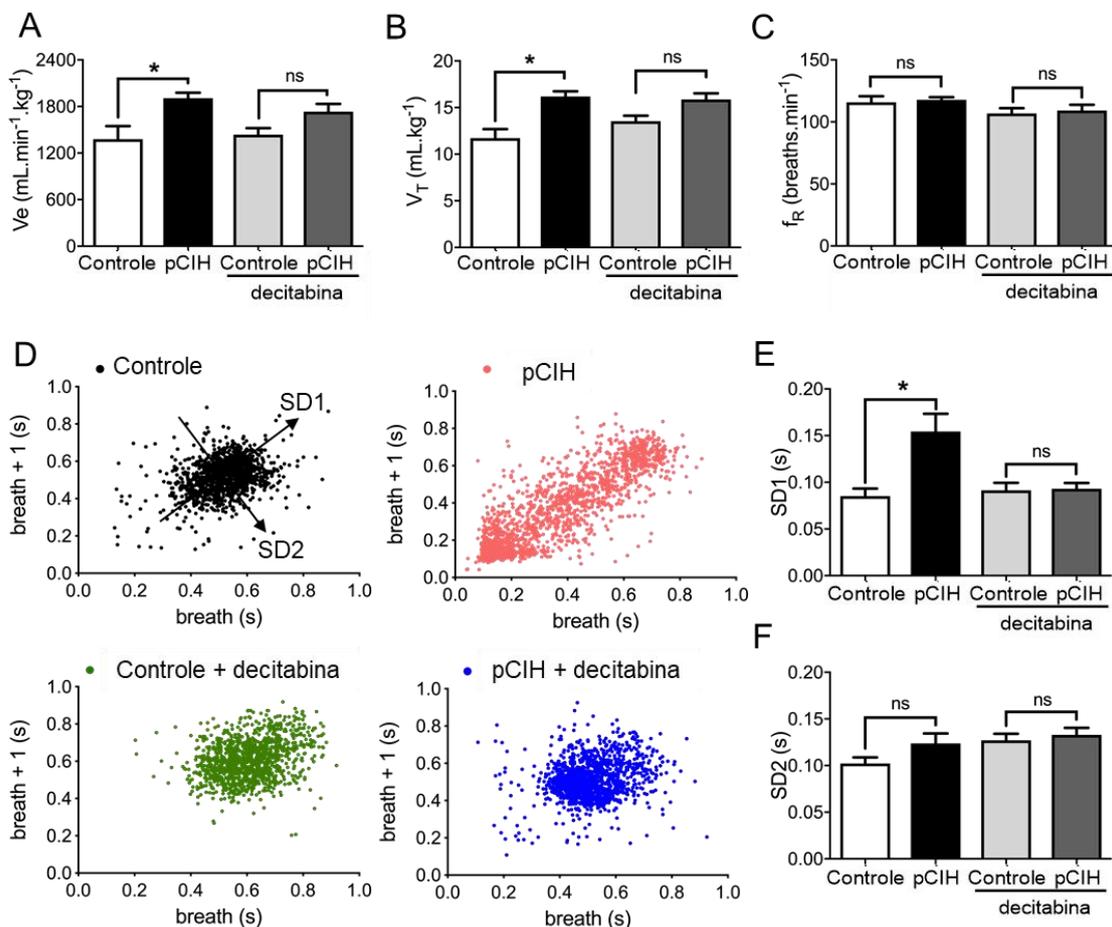


Figura 9. A exposição ao pCIH aumenta a ventilação pulmonar em ratos jovens. Valores médios de ventilação minuto inicial (A), volume corrente (B) e frequência respiratória (C) de ratos juvenis mantidos sob normóxia (controle, ou expostos a hipóxia intermitente crônica pós-natal (pCIH), que receberam veículo (controle: n = 7; pCIH: n = 28) ou tratamento com decitabina (1 mg / kg, ip) (controle: n = 17; pCIH: n = 8). D: Gráfico de Poincaré da variabilidade respiração-a-respiração (*breath/breath+1*) dos ratos controle e pCIH, representativos de seus respectivos grupos experimentais. E e F: Valores médios do desvio padrão (SD1 e SD2) da variabilidade respiração-a-respiração de todos os grupos experimentais. Ns - não estatisticamente significativo; * - diferente do grupo controle correspondente, $P < 0,05$.

Alterações no padrão respiratório motor de ratos jovens expostos à pCIH

Alterações motoras durante o basal

As preparações *in situ* de todos os grupos experimentais exibiram um padrão motor respiratório semelhante ao eupnêico (*eupneic-like*), caracterizado pela presença de atividade *bursts* do PN em rampa, atividade pré-inspiratória da HN (precedendo a atividade do PN) e atividades inspiratórias e pós-inspiratórias da atividade cVN (figura 11). Além disso, verificamos que todos os grupos experimentais apresentaram uma variabilidade respiratória baixa e equivalente, como mostra o gráfico de coeficiente de variação da frequência dos *bursts* do PN ($9,8 \pm 1,0$ vs $11,3 \pm 0,9$ vs $8,9 \pm 1,0$ vs $9,5 \pm 1,7$ %, respectivamente controle (n =10), pCIH (n=11), controle + decitabina (n=10), pCIH + decitabina (n=8), $p > 0,05$, Figura 11)

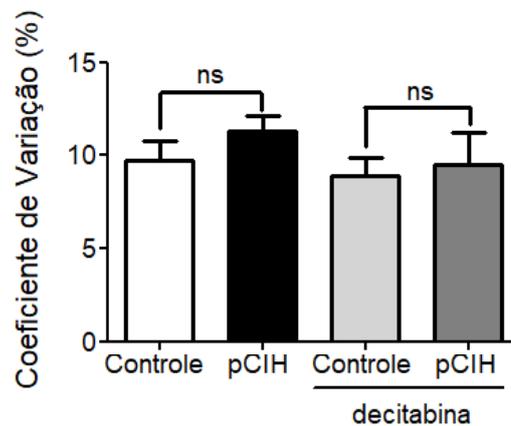


Figura 11. Coeficiente de variação de frequência de *bursts* do PN. Variação da frequência respiratória durante a preparação *in situ* não apresenta diferença entre os grupos. Ns -não significativo, $p > 0,99$.

Em comparação ao grupo de controle, as preparações *in situ* de ratos pCIH exibiram: i) amplitude dos *bursts* do PN aumentada ($11,8 \pm 1,4$ vs. $21,0 \pm 3,2$; $F(3, 31) = 4,947$, $P = 0,0365$, Fig. 13A); ii) atividade média do cVN diminuída, tanto do componente inspiratório ($44,3 \pm 2,9$ vs $29,4 \pm 5,2$ μV ; $F(3, 31) = 2,494$, $P = 0,0214$, Figura 13C), quanto do componente pós-inspiratório ($40,5 \pm 2,6$ vs $25,9 \pm 5,1$ μV ; $F(3,$

31) = 2,862, $P = 0,0396$, Figura 13D); iii) redução da atividade máxima (pico) da atividade pós-inspiratória vagal ($70,1 \pm 5,7$ vs $38,1 \pm 9,8$, $F(3, 31) = 3,154$, $P = 0,0387$, Fig. 13E); e iv) amplitude dos *bursts* do HN semelhante ($29,2 \pm 5,3$ vs $22,5 \pm 3,7 \mu\text{V}$; $F(3,31) = 0,5119$, $P > 0,99$; Figura 13B). O grupo controle decitabina não apresentou diferenças estatísticas na atividade dos nervos quando comparada ao controle. Além disso, as preparações *in situ* de ratos pCIH tratados com decitabina ($n = 7$) também não mostraram alterações na amplitude dos *bursts* do PN ($9,8 \pm 1,8$ vs $13,3 \pm 1,9 \mu\text{V}$, $P > 0,99$, Figura 13A), e na atividade vagal inspiratória ($37,3 \pm 3,5$ vs $35,3 \pm 3,5 \mu\text{V}$, $P > 0,99$, Figura 13C) e pós-inspiratória ($32,1 \pm 2,9$ vs $31,3$ vs $2,3 \mu\text{V}$, $P > 0,99$, Figura 13D) em comparação com o grupo controle + decitabina. A amplitude do HN ($26,5 \pm 4,3$ vs $28,9 \pm 4,3 \mu\text{V}$, $P > 0,99$, Figura 13B) também foi similar entre os grupos controle e pCIH tratados com decitabina.

Além disso, os animais pCIH e controle decitabina apresentam frequência respiratória semelhante ao controle, entretanto a frequência dos animais pCIH tratados com decitabina foi maior quando comparado aos outros grupos (20 ± 2 vs 20 ± 1 vs 22 ± 2 vs 29 ± 2 bpm, respectivamente controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, $F(3, 33) = 5,146$, $P = 0,0050$, Figura 14A), isto porque o tempo expiratório total apresentou reduzido apenas nestes animais ($2,43 \pm 0,23$ vs $2,58 \pm 0,22$ vs $2,01 \pm 0,26$ vs $1,49 \pm 0,29$ s, respectivamente controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, $F(3,31) = 5,291$, $p = 0,0046$, Figura 14D). Por outro lado, o tempo inspiratório não apresenta diferenças significativas entre os grupos ($0,766 \pm 0,054$ vs $0,748 \pm 0,049$ vs $0,766 \pm 0,054$ vs $0,748 \pm 0,049$ s, respectivamente controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, $P > 0,99$, Figura 14C). O tempo pós-inspiratório dos animais pCIH + decitabina também mostrou-se significativamente menor ($1,88 \pm 0,24$ vs $1,95 \pm 0,18$ vs $1,6 \pm 0,26$ vs $0,83 \pm 0,17$, respectivamente controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, $F(3, 31) = 4,438$, $P = 0,0105$, Fig.14E); entretanto este período continuou representando 2/3 do tempo expiratório total ($73,4 \pm 3,4$ vs $74,0 \pm 2,6$ vs $74,4 \pm 4,7$ vs $67,7 \pm 4,6$ s, $p > 0,05$, respectivamente controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, $P > 0,99$, Fig. 14F). Em relação ao período pré-inspiratório, a exposição a pCIH ou o tratamento com decitabina não promove alterações significativas na duração de disparo do HN ($0,302 \pm 0,046$ vs $0,330 \pm 0,024$ vs $0,226 \pm 0,050$ vs $0,194 \pm 0,054$ s, respectivamente controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, $F(3, 31) = 2,057$, $P > 0,99$, Fig.14B)

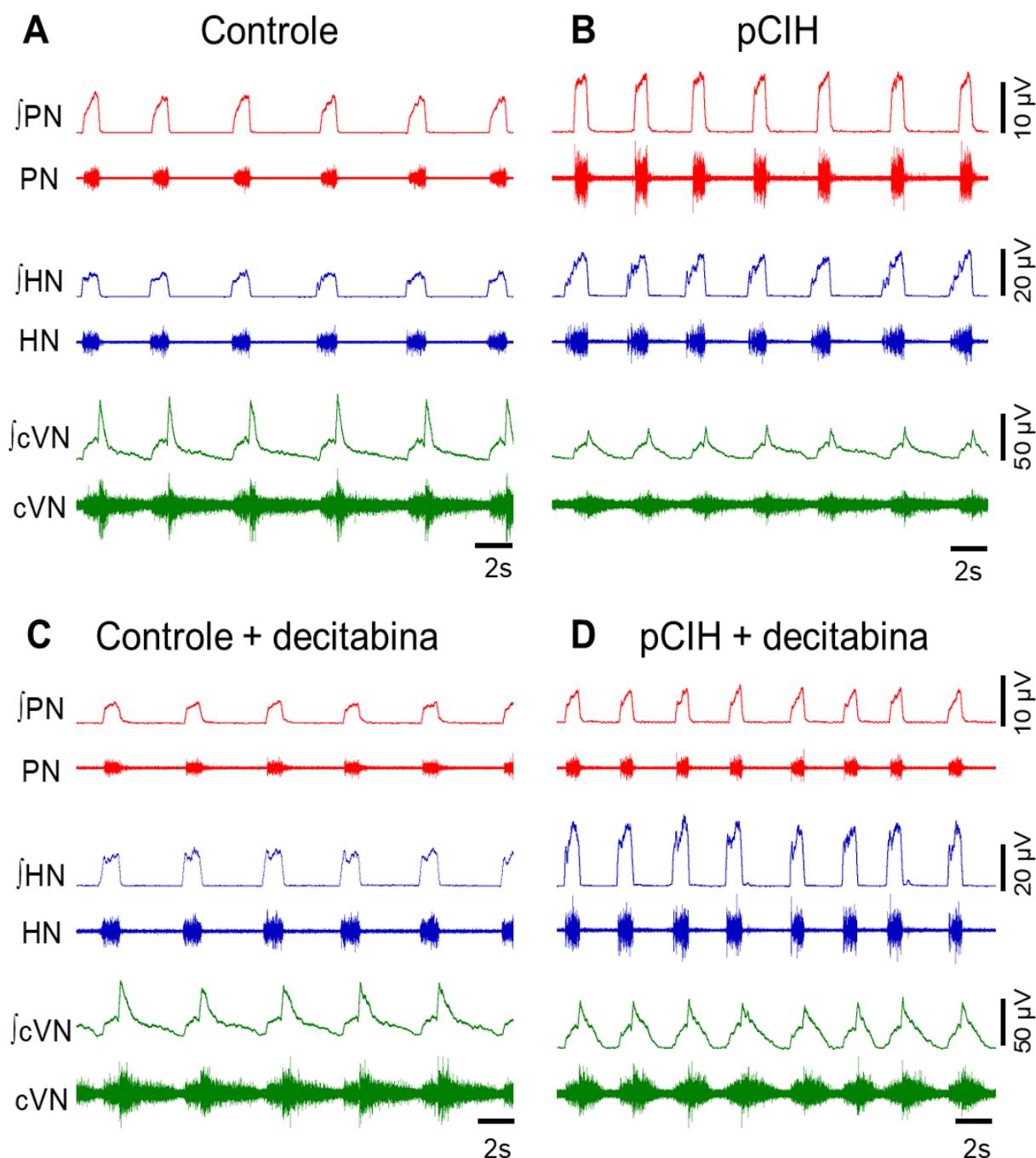


Figura 12. Padrão de atividade motora respiratória de preparações in situ. Registros brutos e integrados (\int) do nervo frênico (PN), hipoglossal (HN) e porção cervical do nervo vago (cVN) de preparações in situ, representativas de seus respectivos grupos experimentais, de ratos mantidos em normóxia (controle, A, n=10), ratos expostos a hipóxia crônica intermitente pós-natal (pCIH, B, n=11), ratos mantidos em normóxia tratados com decitabina (1 mg / kg, C, n=10) e ratos pCIH tratados com decitabina (D, n=8).

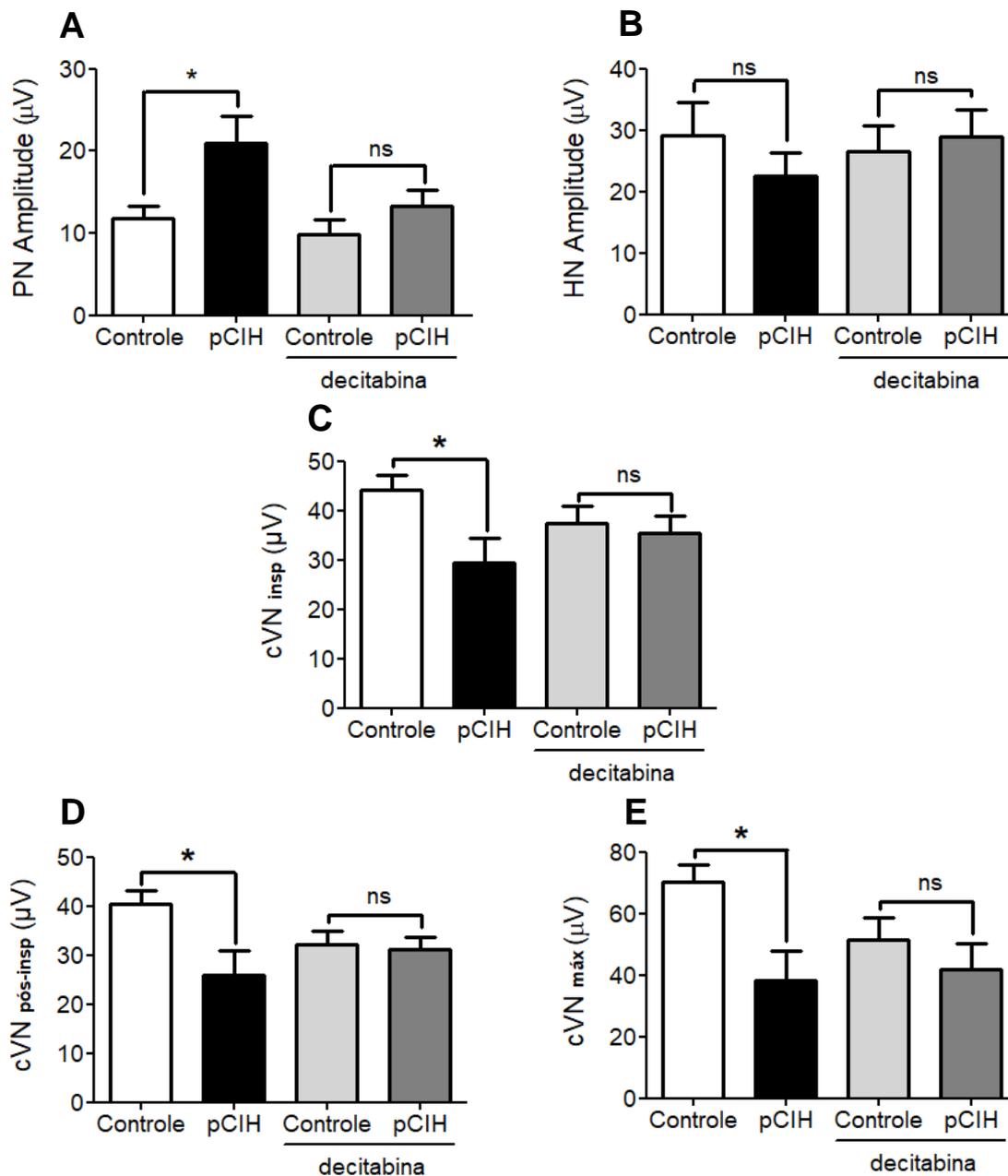


Figura 13. A pCIH modifica as atividades do nervo frênico e vago por mecanismos dependentes da metilação do DNA. Valores médios de amplitude do frênico (A), amplitude do hipoglosso (B), atividade inspiratória (C), pós-inspiratória (D) e amplitude máxima do vago (E) de preparações in situ ratos mantidos em normóxia (controle, n=10), ratos expostos a hipóxia crônica intermitente pós-natal (pCIH, n=11), ratos mantidos em normóxia tratados com decitabina (1 mg / kg, n=10) e ratos pCIH tratados com decitabina (n=10). Ns - não estatisticamente significativo; * - diferente do grupo controle correspondente, $P < 0,05$.

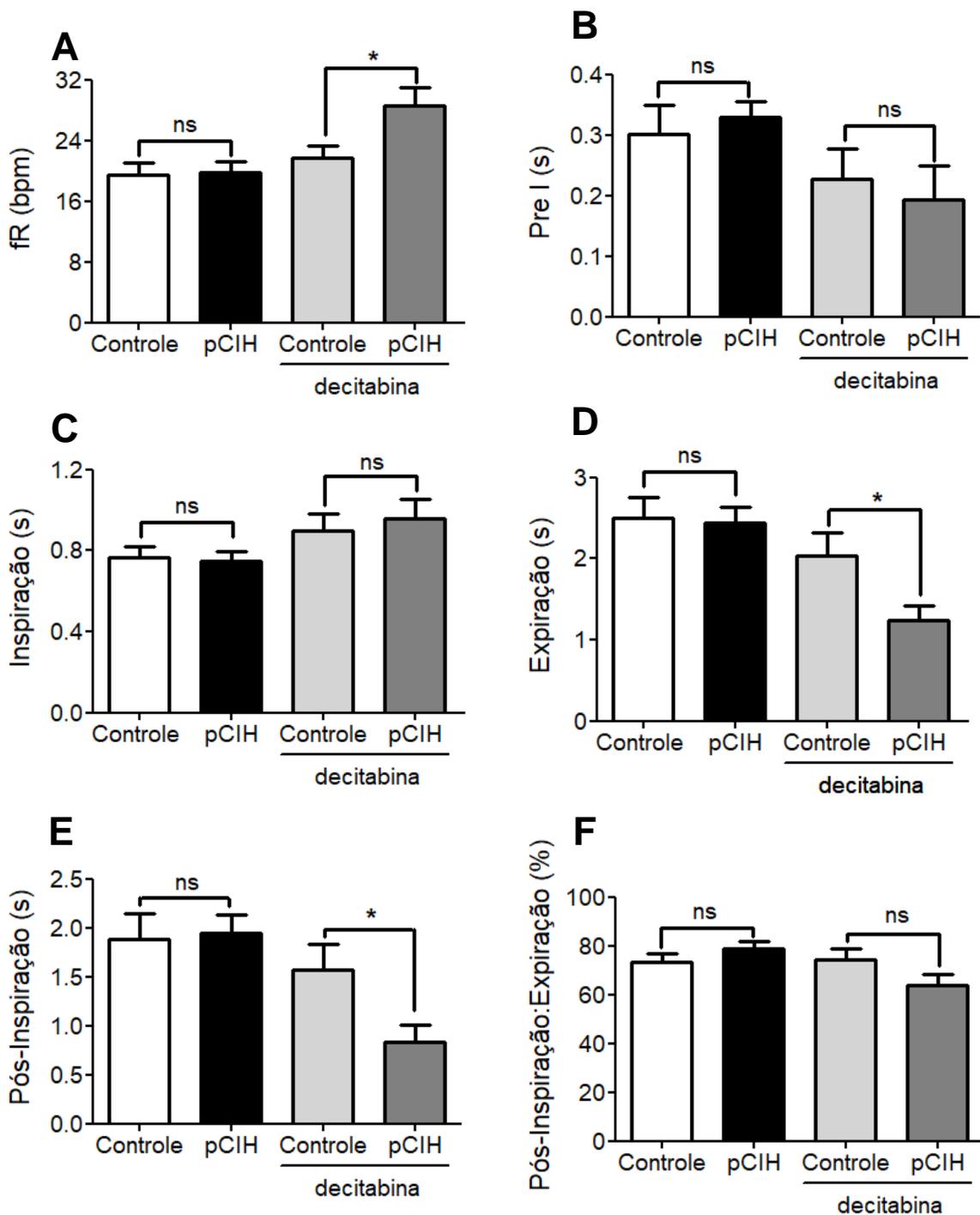


Figura 14. Tempos respiratórios da preparação *in situ*. Valores médios durante o basal da frequência respiratória (A), tempo pré-inspiratório (B), inspiratório (C), expiração total (D), pós-inspiração (E) e tempo pós-inspiratório normalizado pelo tempo expiratório (F) de ratos mantidos em normóxia (controle, n=10), ratos expostos a hipóxia crônica intermitente pós-natal (pCIH, n=11), ratos mantidos em normóxia tratados com decitabina (1 mg / kg, n=10) e ratos pCIH tratados com decitabina (n=8). Ns - não estatisticamente significativo; * - diferente do grupo controle correspondente, $P < 0,05$.

Correlação entre as atividades PN e cVN durante o basal

Os animais pCIH apresentam uma correlação negativa entre as amplitudes dos *bursts* do PN e do pico pós-inspiratório do cVN durante o basal ($R^2 = 0,65$, $p = 0,0026$), demonstrando que quanto maior a atividade do PN menor a atividade do cVN neste grupo. Tal correlação significativa não é observado nas *preparações in situ* dos grupos controle ($R^2 = 0,15$, $p = 0,26$), controle + decitabina ($R^2 = 0,01$, $p = 0,76$ e pCIH + decitabina ($R^2 = 0,32$, $p = 0,14$) (Figura 15).

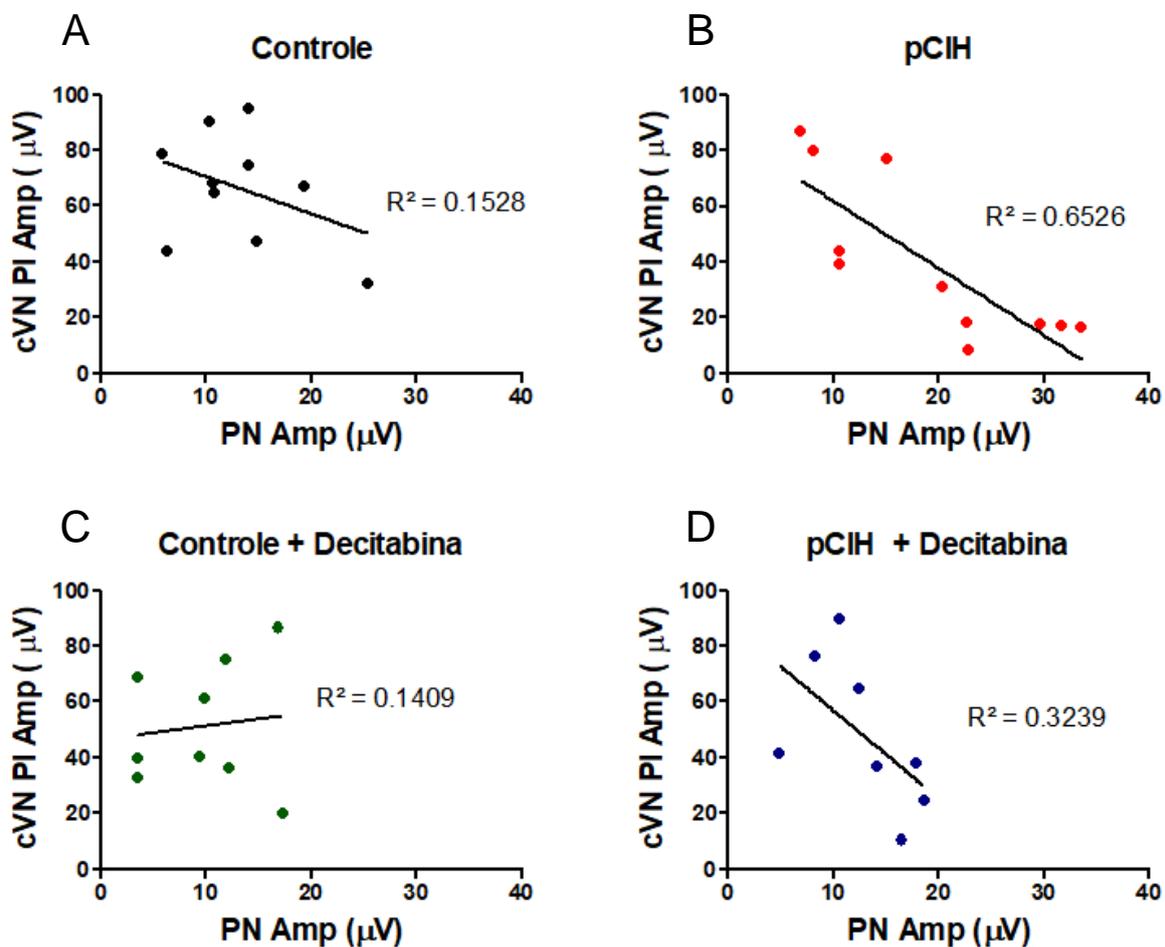


Figura 15. Animais pCIH apresentam correlação negativa entre a atividade do PN e cVN *in situ*. Correlação feita entre a amplitude o PN (PN Amp) no eixo x e amplitude do pico pós-inspiratório do cVN (cVN PI Amp) no eixo y, por meio do método de Pearson. Cada ponto nos gráficos representa um animal e seus valores de PN e cVN durante o basal da preparações *in situ* de ratos mantidos em normóxia (controle, $n=10$), ratos expostos a hipóxia crônica intermitente pós-natal (pCIH, $n=11$), ratos mantidos em normóxia tratados com decitabina ($n=10$) e ratos pCIH tratados com decitabina ($n=8$).

Respostas motoras respiratórias à hipercapnia

O aumento da concentração de CO₂ de 5% para 7% na solução de perfusão das preparações *in situ* promoveu aumento significativo na amplitude do PN, HN e cVN em todos os grupos. Entretanto, variação de amplitude do PN dos animais pCIH foi menor quando comparada à resposta do controle, a qual foi prevenida pelo tratamento com decitabina (13,8 ± 3,7 vs 2,6 ± 1,0 vs 10,9 ± 3,4 vs 10,5 ± 2,4%, respectivamente controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, p=0,01, F (3, 26) = 4,480, figura 16A). A variação nas amplitudes do HN (6,5 ± 3,4 vs 1,4 ± 2,8 vs 8,4 ± 3,8 vs 15,34 ± 8,9, controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, p>0,05; Figura 15 C) e do cVN (4,3 ± 7,2 vs 0,4 ± 1,7 vs 2,1 ± 4,6 vs 15,21 ± 11,41% ,controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, p<0,05; Figura 16E) foram semelhantes entre os grupos experimentais. Em relação ao tempo inspiratório, expiratório total, pós-inspiratório e pré-inspiratório e também a frequência respiratória, a exposição a hipercapnia branda de 7% CO₂ promoveu variações semelhantes em todos os grupos [controle (n=4), pCIH (n=11), controle + decitabina (n=8), pCIH + decitabina (n=8), p>0,05, tabela 1).

Durante a exposição à 10% CO₂, a magnitude da variação de amplitude do PN [13,5 ± 5,6 vs 9,2 ± 1,6 vs 16,1 ± 3,6 vs 17,8 ± 4,5%, respectivamente controle (n=4), pCIH (n=11), controle + decitabina (n=8), pCIH + decitabina (n=7), p>0,05; Figura 16B], do HN (6,6 ± 4,5 vs 2,8 ± 3,1 vs 17,11 ± 7,7 vs 27,9 ± 15,1%, respectivamente controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, p>0,99; Figura 16D) e do cVN (1,2 ± 5,6; 2,4 ± 1,3; 4,7 ± 5,3 vs 40,3 ± 31,9%, respectivamente controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, p>0,05; Figura 16F) foram semelhante entre os grupos experimentais.

Quanto as alterações dos tempos respiratórios, nossos resultados demonstraram a exposição a pCIH não alterou a resposta a hipercapnia de 10% quando comparado ao grupo controle (tabela 2). Entretanto, o tratamento com a decitabina, tanto nos animais controle quando nos animais pCIH, promoveu aumento na variação do tempo expiratório total, pós-inspiratório e pré-inspiratório quando comparado aos animais que receberam veículo (vide tabela 2). O tempo inspiratório foi reduzido de forma similar em todos os grupos (tabela 2). A variação da frequência respiratória dos animais pCIH foi similar ao controle (tabela 2), entretanto os animais pCIH + Decitabina sob condições de

hipercapnia apresentaram redução importante da frequência respiratória, mas não significativa [$p=0,06$, $F(3,28) = 2,733$, tabela 2].

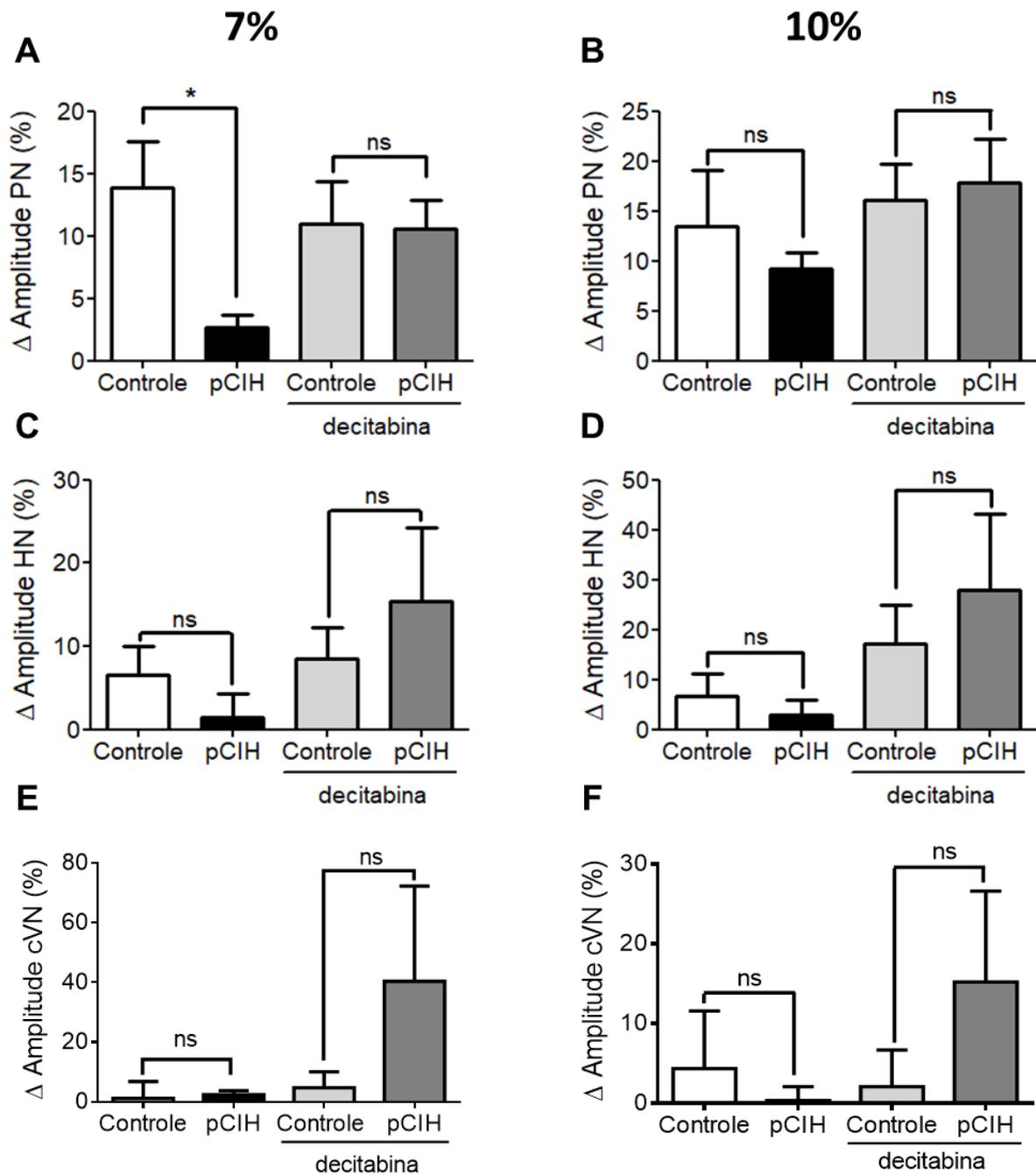


Figura 15. A exposição a pCIH modifica a amplitude de resposta a hipercapnia. Delta da resposta (em %) a hipercapnia de 7% CO₂ e 10% CO₂ da amplitude do frênico (A,B), hipoglossos (C,D) e pico pós-inspiratório do vago (E,F) de ratos mantidos em normóxia (controle, n=4), ratos expostos a hipóxia crônica intermitente pós-natal (pCIH, n=11), ratos mantidos em normóxia tratados com decitabina (1 mg / kg) e ratos pCIH tratados com decitabina (n=8) Ns - não estatisticamente significativo; * - diferente do grupo controle correspondente, P <0,05.

Tabela 1. Magnitude das respostas (% em relação ao basal) dos diferentes tempos respiratórios de preparações *in situ* de animais dos grupos controle (n=4), pCIH (n=11), controle + decitabina (n=8) e pCIH + decitabina (n=8) à hipercapnia 7% CO₂.

Tempo(Δ%)	Controle	pCIH	Controle + Decitabina	pCIH + Decitabina
pré-inspiração	107,1 ± 66,6	52,4 ± 16,2	65,0 ± 43,9	108,5 ± 35,6
inspiração	-7,15 ± 7,81	-14,59 ± 2,61	-7,825 ± 1,77	-17,09 ± 5,2
pós-inspiração	-6,3 ± 9,8	-4,9 ± 6,0	8,1 ± 11,28	30,1 ± 17,81
expiração total	0,01 ± 8,61	5,19 ± 5,65	11,18 ± 9,73	33,88 ± 15,03
freq. respiratória	3,48 ± 5,80	1,08 ± 3,73	-2,20 ± 5,07	-7,23 ± 6,34

Tabela 2. Magnitude das respostas (% em relação ao basal) dos diferentes tempos respiratórios de preparações *in situ* de animais dos grupos controle (n=4), pCIH (n=11), controle + decitabina (n=8) e pCIH + decitabina (n=8) à hipercapnia 10% CO₂.

Tempo (Δ%)	Controle	pCIH	Controle + Decitabina	pCIH + Decitabina
pré-inspiração	68,0 ± 27,4	61,8 ± 18,2	182,7 ± 76,5*	208,3 ± 60,1*
inspiração	-8,2 ± 4,1	-10,9 ± 2,2	-3,4 ± 3,6	-15,9 ± 5,2
pós-inspiração	-5,9 ± 11,4	-2,1 ± 12,5	36,4 ± 22,5*	94,9 ± 43,4*
expiração total	5,6 ± 11,4	1,6 ± 8,6	36,4 ± 18,2	80,4 ± 33,1*
freq. respiratória	1,50 ± 6,54	3,02 ± 6,54	-12,41 ± 7,94	-21,79 ± 6,41

* diferente do respectivo grupo veículo, p<0,05

Respostas à hipocapnia

A diminuição da concentração de CO₂ do perfusato de 5% para 1% cessou, de forma persistente, a atividade respiratória motora (apneia). Na figura 18 é possível observar o silenciamento da atividade do PN. A hipocapnia promoveu apneias em 50% dos animais controles (n=4), 77,8% dos animais pCIH (n=7), 50% dos animais controle + decitabina (n=7) e de 71,4% dos animais pCIH + decitabina (n=7). O silenciamento do PN ocorreu de forma mais rápida nos animais pCIH em relação aos animais do grupo controle (447,5 ± 77,9 s vs 261,7 ± 19,8 s, tempo do início da perfusão com 1% CO₂ até o silenciamento; P= 0,0107, F= 5,502, Figura 17). No entanto, o tempo necessário para o retorno da atividade do PN aos valores basais foi semelhante entre os dois grupos experimentais (144,3 ± 11,4 s vs 175,5 ± 9,0 s, F= 4,850, Figura 17). O tratamento com decitabina não alterou o tempo até o início da apneia (358,8 ± 27,9 s vs 367,5 ± 20,1 s, F= 5,502, Figura 16.), contudo os animais pCIH + decitabina retomaram a atividade respiratória em menor tempo quando comparados apenas aos animais controle + decitabina (205,6 ± 19,5 s vs 136,3 ± 11,9 s, F= 4,850, Figura 17), mas não em relação aos demais grupos experimentais.

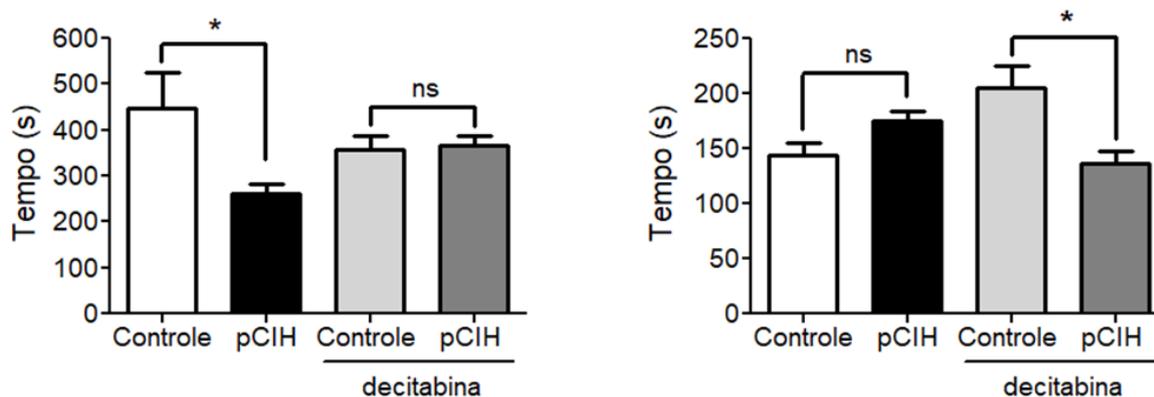


Figura 17. A exposição a pCIH e o tratamento com decitabina alteram a resposta a hipocapnia. O limiar apniéico foi analisado a partir do tempo do início do estímulo até a apneia (esquerda) e do tempo de retorno da atividade motora respiratória (direita) de ratos mantidos em normóxia (controle, n=4), ratos expostos a hipóxia crônica intermitente pós-natal (pCIH, n=7), ratos mantidos em normóxia tratados com decitabina (n=7) e ratos pCIH tratados com decitabina (n=7). Ns - não estatisticamente significativo; * - diferente do grupo controle correspondente, P < 0,05.

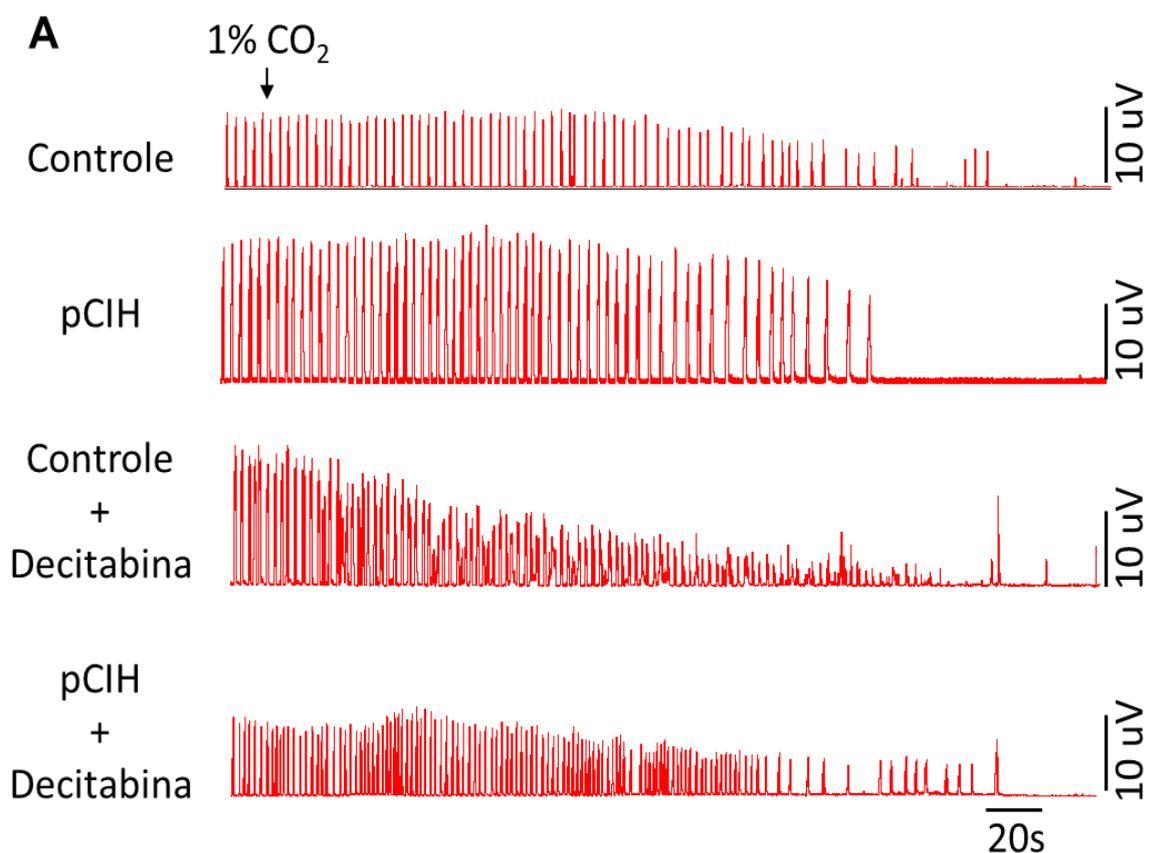


Figura 18. Registros da atividade integrada do PN durante a exposição a hipocapnia de preparações *in situ* representativas dos diferentes grupos experimentais. A seta representa início da exposição a 1% de CO₂.

Respostas motoras respiratórias à estimulação dos quimiorreceptores periféricos

Na preparação *in situ*, a administração de cianeto de potássio (KCN) promoveu o aumento da frequência respiratória e de amplitude do PN, HN e cVN em todos os grupos experimentais. No entanto, os animais pCIH tratados com decitabina apresentaram uma menor magnitude da resposta de taquipneia quando comparado com os animais controle e pCIH que receberam veículo [(145,6 ± 43,4, vs 127,5 ± 10,3 vs 90,5 ± 10,1 vs 36,4 ± 11,0%, respectivamente controle (n=6), pCIH (n=11), controle + decitabina (n=9), pCIH + decitabina (n=8), F (3, 26) = 4,820, P = 0,0085, Figura 19A]. Por outro lado, o aumento da amplitude dos *bursts* do PN (21,9 ± 6,7 vs 15,6 ± 5,2 vs 18,3 ± 4,2 vs 23,4 ± 6,1%, respectivamente controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, P>0,05, Figura 18 B), assim como o aumento da atividade do HN (14,7 ± 4,4 vs 12,5 ± 1,7 vs 16,1

$\pm 3,6$ vs $15,5 \pm 2,1$, respectivamente controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, $P > 0,05$, Figura 19C) e do cVN ($36,7 \pm 7,0$ vs $21,0 \pm 3,6$ vs $28,8 \pm 4,4$ vs $26,8 \pm 5,3$, respectivamente controle, pCIH, controle + decitabina, pCIH + decitabina, $P > 0,05$, Figura 19D) foram semelhantes entre os grupos experimentais.

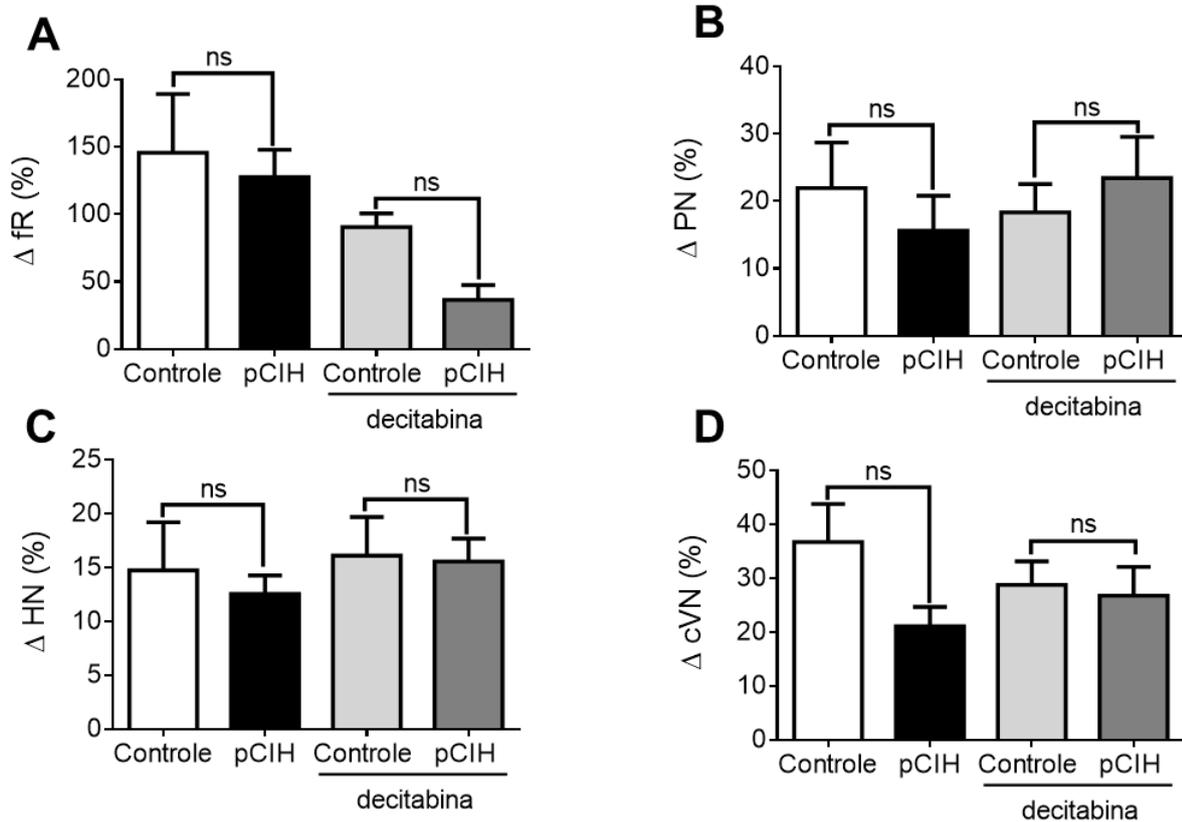


Figura 18. A exposição a pCIH não altera a resposta ao KCN na preparação in situ. Respostas ao KCN (cianeto de potássio, 0,06 ml) em delta (em %) da frequência respiratória (A), amplitude do PN (B), atividade média do HN (C), atividade média total do cVN (D) de ratos mantidos em normóxia (controle, n=6), ratos expostos a hipóxia crônica intermitente pós-natal (pCIH, n=11), ratos mantidos em normóxia tratados com decitabina (n=9) e ratos pCIH tratados com decitabina (n=8). Ns - não estatisticamente significativo; * - diferente do grupo controle correspondente, $P < 0,05$.

Ventilação pulmonar de ratos adultos expostos à pCIH

As alterações ventilatórias observadas em ratos jovens submetidos à pCIH persistiram até a vida adulta (Figura 20A). Ratos adultos (P90-99) expostos a pCIH (n = 5) apresentaram maior volume corrente [$2,7 \pm 0,3$ vs $3,8 \pm 0,2$ ml.kg⁻¹, $F(3, 17) = 9,946$, $P = 0,0458$, Figura 20B], mas similar frequência respiratória [106 ± 7 vs 96 ± 8

respirações.min⁻¹, F (3, 17) = 4,003, P = 0,5034, Figura 20C] e ventilação minuto [287 ± 15 vs 370 ± 34 ml.kg⁻¹.min⁻¹, F (3, 17) = 14,55, P = 0,4174, Figura 20D] quando comparados com grupo controle (n = 5). Além disso, semelhante ao grupo de pCIH jovem, ratos adultos pCIH exibiram irregularidades respiratórias (Figuras 20A, F e G), com curtos episódios de altas frequências respiratórias e curtos períodos de fluxo aéreo reduzido/ausente [SD1: 0,078 ± 0,009 vs 0,119 ± 0,002 s, F (3, 17) = 5,980, P = 0,0317, Figura 15F; SD2: 0,106 ± 0,001 vs 0,163 ± 0,004 s, F (3, 17) = 5,005, P = 0,0222, Fig. 20G]. O tratamento de decitabina em ratos controles adultos (n = 6) promoveu aumento volume corrente (2,7 ± 0,3 vs 4,9 ± 0,3; P = 0,0002) e ventilação minuto (P <0,0001), mas não alterou a frequência respiratória (P = 0,1728) em comparação ao grupo controle que recebeu veículo. Por outro lado, ratos pCIH tratados com decitabina apresentaram reduções no volume corrente (4,9 ± 0,3 vs 3,4 ± 0,3 ml.kg⁻¹, P = 0,0039, Figura 20B), frequência respiratória (122 ± 4 vs 103 ± 3 ciclos.min⁻¹, P = 0,0494, Figura 20C) e ventilação por minuto (598 ± 50 vs 350 ± 30 ml.kg⁻¹.min⁻¹, P = 0,0005, Figura 20D) em comparação com ratos controle tratado com decitabina. Além disso, o tratamento com decitabina eliminou as irregularidades respiratórias do grupo pCIH (SD1: 0,078 ± 0,009 vs 0,098 ± 0,008 s, P = 0,5677, Figura 18F; SD2: 0,111 ± 0,013 vs 0,138 ± 0,011 s, P = 0,6925, Figura 20G).

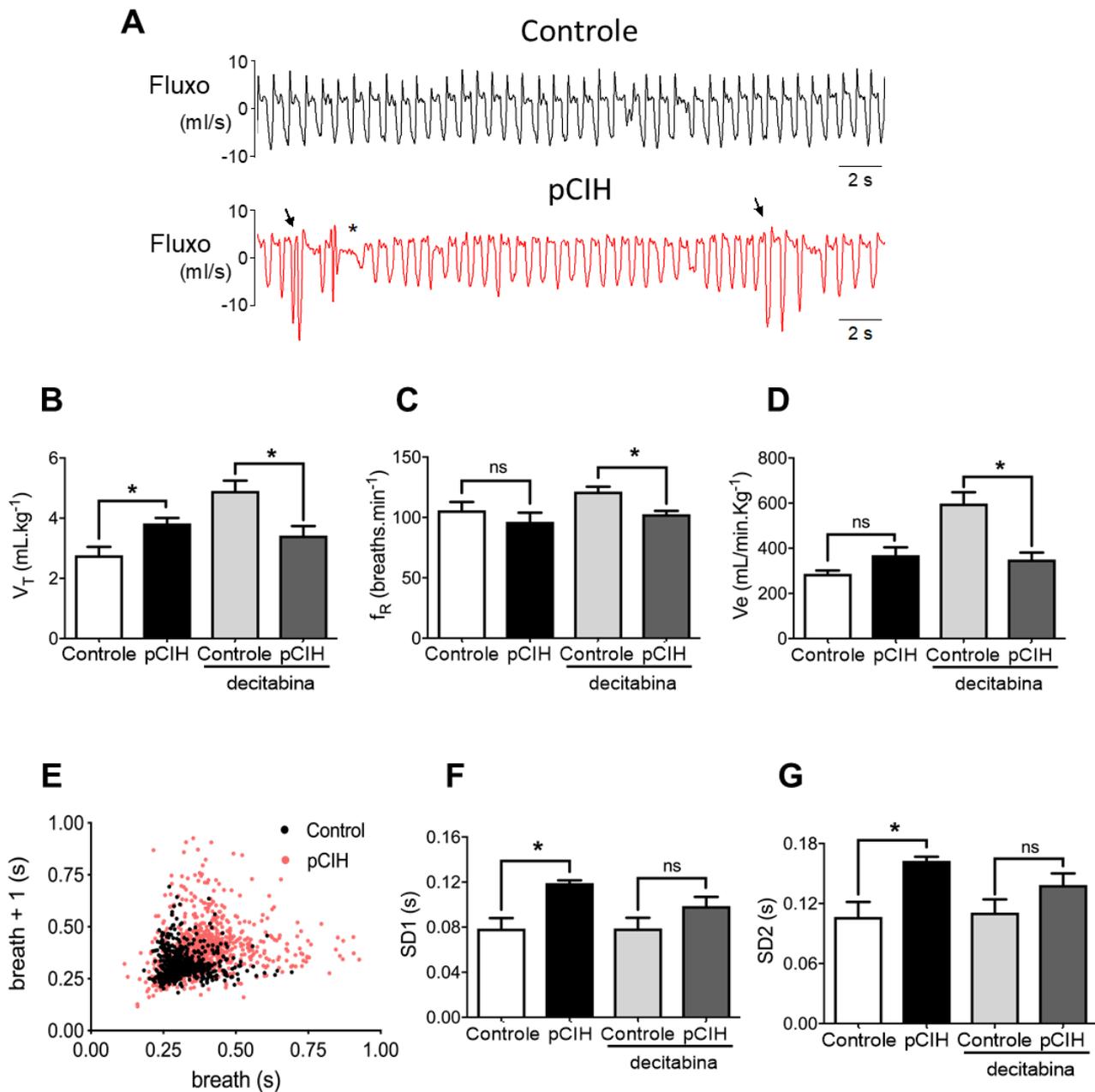


Figura 20. Ratos adultos expostos a pCIH apresentam elevado volume corrente e irregularidades respiratórias. A: Registros representativos de ventilação pulmonar de um controle e um rato adulto pCIH, ilustrando as mudanças no padrão respiratório no grupo pCIH. Valores médios do volume corrente basal (B), frequência respiratória (C) e ventilação minuto (D) de ratos mantidos em normóxia (controle, n=5), ratos expostos a hipóxia crônica intermitente pós-natal (pCIH, n=6), ratos mantidos em normóxia tratados com decitabina (n=5) e ratos pCIH tratados com decitabina (n=5). E: Gráficos de Poincaré da variabilidade respiração-a-respiração dos ratos controle e pCIH, representativos de seus respectivos grupos experimentais. F e G: Valores médios do desvio padrão (SD1 e SD2) da variabilidade da frequência respiratória (*breath-to-breath*) de todos os grupos experimentais. Ns - não estatisticamente significativo; * - diferente do grupo controle correspondente, $P < 0,05$.

Gasometria arterial de ratos adultos expostos à pCIH

As análises da gasometria arterial de ratos adultos (P90-99) demonstram que ratos expostos à pCIH não apresentam diferenças quanto aos valores de pH, PaCO₂, PaO₂, sO₂, HCO₃⁻ e lactato do sangue arterial, quando comparados aos demais grupos experimentais (tabela 3).

Tabela 3. Gasometria arterial de animais adultos. pH, pressão parcial de oxigênio (PaO₂), saturação de oxigênio (sO₂), pressão parcial de dióxido de carbono (CO₂), concentração de íon bicarbonato (HCO₃⁻) e concentração de lactato do sangue arterial.

	Controle n=3	pCIH n=3	Controle + Decitabina n=2	pCIH + Decitabina n=2
pH	7,462 ± 0,008	7,462 ± 0,022	7,455 ± 0,005	7,445 ± 0,015
PaO ₂ (mmHg)	64,18 ± 3,14	69,66 ± 3,75	60,00 ± 2,00	62,00 ± 11,00
sO ₂ (%)	92,33 ± 1,20	94,33 ± 1,20	91,50 ± 0,50	90,50 ± 4,50
PaCO ₂ (mmHg)	47,20 ± 2,08	42,86 ± 0,81	47,00 ± 0,13	44,15 ± 5,05
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	33,93 ± 1,52	30,83 ± 1,31	33,15 ± 0,85	30,65 ± 2,45
Lactato (mmol/l)	0,911 ± 0,099	0,736 ± 0,14	0,790 ± 0,04	0,815 ± 0,14

DISCUSSÃO

Alterações respiratórias em animais pCIH

Tabela 4. Sumário das principais alterações respiratórias encontradas em animais pCIH e pCIH decitabina *in vivo* e *in situ*

<i>In vivo</i> ventilação pulmonar	pCIH	pCIH + decitabina	<i>In situ</i> atividade motora	pCIH	pCIH + decitabina
V_T	↑ jovem e adulto	↔ jovem e adulto	<i>PN amplitude</i>	↑	↔
fR	↔ jovem e adulto	↔ jovem e adulto	<i>PN frequência</i>	↔	↑
V_e	↑ jovem ↔ adulto	↔ jovem e adulto	<i>HN amplitude</i>	↔	↔
<i>Irregularidades</i>	↑ jovem e adulto	↔ jovem e adulto	<i>cVN post-I</i>	↓	↔
<i>Gasometria arterial</i>	↔ adulto	↔ adulto	<i>Hipercapnia</i>	↓ PN amp	↔
			<i>KCN</i>	↔	↔
			<i>limiar apnêico</i>	↑	↔

↔ - semelhante ao respectivo grupo controle; ↑ - maior em relação ao respectivo grupo controle; ↓ - menor em relação ao respectivo grupo controle.

Em nosso estudo, verificamos que a exposição a hipóxia intermitente durante o período pós-natal (pCIH) promove o surgimento de alterações respiratórias relevantes em animais jovens e adultos, evidenciado em experimentos *in vivo* e *in situ*. Observamos que a exposição a pCIH induz aumento do volume corrente em repouso de ratos na adolescência e na vida adulta, além de promover o surgimento de irregularidades respiratórias. Além disso, constatamos que a pCIH promove o aumento da amplitude dos *bursts* do nervo frênico e a diminuição da atividade motora do nervo vago, sem promover alterações na atividade do nervo hipoglosso em condições basais. Em associação às alterações basais, verificamos que ratos expostos à pCIH apresentam menor resposta de aumento na atividade do nervo frênico à hipercapnia e um maior limiar apnêico hipocapnico *in situ*. De forma interessante, os efeitos da pCIH foram bloqueados pela administração de um agente hipometilante durante o período de exposição. Em conjunto,

nossos resultados mostram, de forma inédita, as alterações motoras que dão suporte às alterações ventilatórias induzidas pela exposição à hipóxia intermitente durante uma janela crítica do desenvolvimento respiratório, e a possível participação dos mecanismos epigenéticos, dependentes da metilação do DNA, na mediação das alterações respiratórias.

A exposição hipóxia intermitente pós-natal promove aumento do volume corrente e da atividade motora do nervo frênico

Estudos mostram que ratos recém nascidos expostos à hipóxia intermitente por 2 dias (até P2) apresentam, logo após o estímulo hipóxico, aumentos do volume corrente e da ventilação pulmonar basais, assim como uma sensibilização do corpúsculo carotídeo e aumento da resposta ventilatória à hipóxia (Peng et al. 2004). Em outro estudo, foi evidenciado que em dez dias de exposição, a pCIH promove aumento do volume corrente e redução da frequência respiratória em ratos com 10 dias de vida (P10) (Julien et al. 2008). Nanduri et al (2012) demonstrou que ratos jovens (P40) que foram expostos à pCIH durante os 10 primeiros dias de vida apresentam uma sensibilização dos quimiorreceptores carotídeos, aumento da pressão arterial basal e maior resposta ventilatória à hipóxia (Nanduriet al. 2012). Nossos resultados sobre a ventilação pulmonar de ratos jovens (P40-45) estão de acordo com esses estudos anteriores, e reforçam a ideia de que a pCIH, durante um período crítico do desenvolvimento pós-natal, pode promover alterações importantes nos mecanismos de controle ventilatório, especialmente relacionados ao volume corrente. De forma inédita, demonstramos que o aumento do volume corrente basal permanece até a vida adulta (P90-98), de forma não dependente de alterações no pH e na pressão parcial dos gases arteriais.

Nossos resultados *in situ* mostram que exposição à pCIH promove um aumento da amplitude dos *bursts* do nervo frênico durante o basal. Tais resultados sugerem que o *drive* excitatório para os neurônios motores que controlam a atividade diafragmática está aumentado, justifica o aumento do volume corrente *in vivo*. Reeves e Gozal (2006) demonstraram resultados semelhantes de aumento da atividade do PN em animais adultos previamente submetidos a pCIH. Entretanto, nesse estudo foi utilizado um protocolo mais longo de pCIH (exposição por 30 dias, de P0-30). Em contrapartida, nossos resultados mostram que a exposição à pCIH nos estágios iniciais da vida pós-natal (P1-P10) já é suficiente em promover alterações relevantes e persistentes no controle da ventilação.

Tais observações podem ter relevância translacional no entendimento das patologias associadas à apneia da prematuridade, uma vez que, segundo estudos de Martin (2005), em humanos, são mais prevalentes durante as semanas iniciais de vida pós-natal, podem perdurar por até 36-40 semanas pós-nascimento.

Estudos realizados por McDonald et al (2016) demonstraram que a atividade contrátil *ex vivo* do diafragma de ratos expostos à pCIH não é diferente de animais controle (McDonald et al. 2016), sugerindo que a capacidade contrátil intrínseca do principal músculo inspiratório não é modificada pela pCIH. Estes resultados reforçam a nossa hipótese de que o aumento do volume corrente basal de ratos jovens e adultos pCIH seja mediado por mecanismos centrais, por meio do aumento da atividade do nervo frênico. Sugerimos que o aumento da atividade deste nervo possa ser decorrente de alterações na excitabilidade dos motoneurônios do núcleo motor do frênico, ou de modificações nos *inputs* sinápticos que chegam a esse núcleo. Sobre o controle sináptico dos neurônios motores do núcleo motor do frênico, estudos mostram que este núcleo recebe projeções excitatórias do rVRG e do NTS, bem como projeções inibitórias do BötC (St.-John and Paton 2003; Bianchi et al. 1995). Há também evidências da presença de interneurônios GABAérgicos na região do núcleo do PN que recebem projeções da rVRG (Gahli et al. 2018), e de que a desinibição do núcleo motor do frênico, por meio de injeções de gabazina (antagonista de receptores GABA), é suficiente em promover o aumento da amplitude do nervo frênico (Marchenko et al. 2019). Portanto, tanto o aumento da excitação, como a redução da inibição, são possíveis mecanismos que poderiam dar suporte ao aumento da atividade do nervo frênico em animais expostos à pCIH. Entretanto, estudos adicionais ainda são necessários para verificar estas hipóteses. Intuitivamente, podemos também considerar que alterações na atividade dos neurônios inspiratórios do pré-BötC (oscilador inspiratório primário) poderia contribuir para o aumento da atividade do frênico e volume corrente de ratos pCIH, uma vez que a estimulação desse núcleo causa excitação inspiratória (Solomon et al. 1999; Moraes et al. 2011). Contudo, consideramos que esse não seja o principal mecanismo, uma vez que tal núcleo também participa do controle da atividade inspiratória dos nervos hipoglosso e vagal, as quais não se mostram elevadas em animais pCIH.

Em relação às alterações de excitabilidade dos motoneurônios do frênico, podemos considerar a hipótese da participação de neuromoduladores que promovam

alterações de longo prazo. Nesse sentido, há evidências de uma associação entre ativação de mecanismos serotoninérgicos no núcleo motor do frênico e indução de uma facilitação de longo prazo (aumento persistente) da atividade do nervo frênico em resposta à hipóxia intermitente, em animais adultos e jovens (Fuller et al. 2000; Lemes et al. 2016). Foi descrito que essa facilitação da atividade dos motoneurônios decorrente da liberação de 5-HT é mediada pela produção de fatores modulatórios da excitabilidade celular, como espécie reativas ao oxigênio (Macfarlane et al. 2009), assim como síntese de novas proteínas (Baker-Herman and Mitchell 2002). Dessa forma, sugerimos que a exposição a pCIH poderia promover alterações na modulação serotoninérgica a nível da medula espinhal durante o desenvolvimento pós-natal, deflagrando alterações plásticas persistentes que acarretem no aumento persistente na amplitude do frênico. Entretanto, não há evidências experimentais que deem suporte a nossa hipótese, sendo necessários experimentos adicionais.

Nanduri et al. (2012) demonstraram que a sensibilidade ao oxigênio dos quimiorreceptores carotídeos de animais jovens (P40) expostos à pCIH durante 10 dias está aumentada, de forma a induzirem maior atividade aferente do nervo do seio carotídeo tanto em situações de normóxia, mas principalmente em condições de hipóxia (Nanduri et al. 2012). Diante dessas observações, é possível considerar que o excesso de *inputs* excitatórios dos corpúsculos carotídeos para a rede neural respiratória contribua para o aumento do volume corrente de ratos pCIH. Entretanto, vale lembrar que a hiperatividade do nervo frênico de animais pCIH foi registrada nas preparações *in situ*, as quais são mantidas em hiperóxia – condição que promove o silenciamento dos quimiorreceptores periféricos (Flor et al. 2018; Guyenet 2014). Dessa forma, sugerimos que a potenciação do nervo frênico e o conseqüente aumento do volume corrente de ratos pCIH seja mediado, principalmente, por mecanismos centrais.

A exposição a pCIH promove irregularidades respiratórias associada a redução da atividade motora para os músculos laringeais

Verificamos em animais jovens e adultos, durante a respiração em repouso, a presença de períodos de respiração irregular, caracterizados pela presença de respirações rápidas intercaladas por períodos de hipopneias/apneias (redução ou ausência de fluxo inspiratório). Tais observações reforçam a ideia de que a pCIH é um fator indutor de

instabilidades respiratórias, comprometendo a respiração basal, de acordo com o que foi sugerido por estudos anteriores (Nanduri et al. 2012; Julien et al. 2008; Reeves and Gozal 2005). Nossas análises da gasometria arterial de ratos adultos mostram que as irregularidades respiratórias observadas em animais pCIH não estão associadas a alterações na pressão parcial dos gases sanguíneos e do pH arteriais, sugerindo a participação dos mecanismos neurais na indução desse fenótipo respiratório.

Diferentemente das observações *in vivo*, preparações *in situ* de animais pCIH não demonstraram irregularidades na frequência respiratória (avaliada a partir da frequência dos *bursts* do nervo frênico). A preparação *in situ* é uma importante ferramenta experimental que possibilita o estudo da atividade neural respiratória sem a influência de anestesia (Paton 1996). Entretanto, esta metodologia não reproduz as condições *in vivo*, uma vez que é uma preparação descerebrada e com ausências de importantes informações aferentes periféricas, como a informações sensorial dos receptores de estiramento pulmonar (Zoccal et al. 2009). Por outro lado, tais diferenças metodológicas *in vivo* e *in situ* podem fornecer informações importantes sobre os mecanismos responsáveis pela deflagração das irregularidades respiratórias. Por exemplo, é possível que informações suprabulbares (ausentes nas preparações *in situ*) possam induzir as irregularidades respiratórias. Nesse cenário, podemos sugerir que a presença das irregularidades respiratórias observadas em ratos pCIH *in vivo* esteja associada às diferenças fases do ciclo sono vigília, uma vez que há evidências de que sugerem a maior ocorrência de irregularidades respiratórias durante o sono REM (Souza et al. 2018; Colrain et al. 2017), possivelmente por mecanismos de origem corticais (Oudiette et al. 2018).

Podemos também considerar a participação dos quimiorreceptores periféricos na indução das irregularidades respiratórias. Estudos de Nanduri et al. (2012), utilizando um protocolo de pCIH muito semelhante ao utilizado neste trabalho, demonstrou que a atividade basal e sensorial dos quimiorreceptores carotídeos de ratos jovens pCIH está potencializada, pelo menos *in vitro* (Nanduri et al. 2012). Baseado em estudos demonstrando que o aumento do ganho do processamento das informações quimiossensíveis (em resposta às variações de PaO₂ e PaCO₂) pode introduzir irregularidades ou instabilidades no balanço excitação/inibição da rede neural respiratória (Cherniack and Longobardo 2006; Ainslie and Duffin 2009), podemos, portanto, considerar o aumento do *drive* excitatório dos quimiorreceptores periféricos para o SNC

após a pCIH como um mecanismo indutor das irregularidades respiratórias observadas *in vivo*. Em suporte a essa hipótese, nas preparações *in situ* de ratos pCIH, onde não foram observadas irregularidades respiratórias, a atividade basal dos quimiorreceptores periféricos está marcadamente atenuada em função da perfusão com solução hiperóxica (Silva et al. 2019; Flor et al. 2018). A sugestão da participação dos quimiorreceptores periféricos na etiologia das irregularidades respiratórias em ratos pCIH pode também ser reforçada por observações clínicas demonstrando que indivíduos que apresentam maior *drive* do corpúsculo carotídeo apresentam maior incidência de irregularidades respiratórias (Dunai et al. 2019).

Em adição a possível participação dos mecanismos suprabulbares e dos quimiorreceptores carotídeos na indução das irregularidades respiratórias, nossos resultados eletrofisiológicos mostram uma significativa redução da atividade motora vagal em ratos pCIH. O nervo vago contém fibras eferentes motoras que inervam, via nervo laríngeo recorrente, músculos abdutores (componente inspiratório) e adutores laringeais (componente pós-inspiratório) da laringe (Paton and Dutschmann 2002). Verificamos que tanto o componente inspiratório, como o componente pós-inspiratório vagal encontram-se significativamente reduzidos em ratos pCIH, indicando um comprometimento no controle motor responsável pela dilatação e contração das vias aéreas superiores. Em associação com nossos achados, McDonald et al. (2015) reportaram que a exposição a hipóxia intermitente durante as três primeiras semanas de vida promove fraqueza do músculo esterno-hióideo (dilatador das vias aéreas superiores) de ratos adultos (McDonald et al. 2015). Desse modo, consideramos a hipótese de que o prejuízo do controle muscular das vias aéreas superiores, tanto pela redução do tônus motor (nosso estudo) como pela fraqueza muscular laríngea (McDonald et al. 2015), predispõe ao colapso das vias aéreas e contribui para o aparecimento de irregularidades respiratórias e apneias após a pCIH.

Nossa hipótese, portanto, é a de que modificações em mecanismos centrais promovam a redução da atividade eferente vagal. A atividade motora vagal, responsável por inervar os músculos laringeais, origina-se do núcleo ambíguo (Loewy and Spyer 1990), cujos neurônios recebem *inputs* sinápticos de neurônios inspiratórios e expiratórios da rede neural respiratória. Sugere-se que esses *inputs* se originem da coluna respiratória ventral (BötC, pré-BötC e rVRG), da porção dorsolateral da ponte

(principalmente Kölliker-Fuse), núcleo do trato solitário e, mais recentemente, do complexo pós-inspiratório (PiCO) (Smith et al. 2007; Anderson et al. 2016; Barnett et al. 2018; Dutschmann and Dick 2012). Dada a complexidade da regulação da atividade dos neurônios motores do núcleo ambíguo envolvido com o controle motor laríngeo, podemos considerar a hipótese de que qualquer modificação que altere o balanço dos *inputs* sinápticos excitatórios e inibitórios para o núcleo ambíguo possa refletir em uma redução na atividade eferente vagal em animais pCIH. Por exemplo, estudos de Dutschmann e Paton (2002) demonstram a redução das sinapses inibitórias do tronco encefálico (por meio do antagonismo sistêmico dos receptores glicinérgicos em preparações *in situ*) é capaz de alterar a atividade motora vagal, com implicações funcionais no controle da resistência laríngea (Dutschmann and Paton 2002). Também é possível considerar a possibilidade de que a pCIH diminui a excitabilidade dos neurônios motores do núcleo ambíguo.

De forma interessante, encontramos uma correlação significativa entre a redução da atividade vagal e o aumento da atividade do nervo frênico. A interação negativa destes dois nervos sugere uma associação causal entre as atividades motoras, no qual, quanto maior amplitude do PN menor a amplitude do cVN. Entretanto, não sabemos se a atividade reduzida do cVN influencia o aumento da atividade do PN, ou o aumento da atividade do PN influencia a redução da atividade do cVN. Existe a hipótese de que a redução do tônus das vias aéreas poderia aumentar a resistência do fluxo de ar e como forma de compensação, haveria o aumento da atividade diafragmática. Outra hipótese é que o aumento da atividade inspiratória, aumentando a atividade de receptores de estiramento pulmonar, promoveria a redução da atividade das vias aéreas, gerando uma plasticidade a nível central (Bailey et al. 2001; Sica et al. 1984). Entretanto, estudos adicionais serão necessários para verificar os mecanismos responsáveis pela as alterações motoras descritas anteriormente.

pCIH e controle quimiossensível central e periférico na preparação in situ

A manutenção da homeostase do CO₂ no sangue arterial em 35 - 40 mmHg é uma importante forma de regulação da atividade respiratória, uma vez que o aumento da PaCO₂ promove redução do pH e aumento de H⁺ (Guyenet and Bayliss 2015). Na preparação *in situ*, a concentração de CO₂ de 5% na perfusão é uma porcentagem ideal

para a manutenção do pH e da concentração plasmática de íons HCO_3^- em níveis fisiológicos (Paton 1996). E assim como *in vivo*, as atividades motoras sofrem incremento conforme o aumento da concentração ao CO_2 (Barnett et al. 2017). O aumento da concentração de CO_2 de 5% para 7% ou 10% promoveu, de forma concentração dependente, aumentos nas amplitudes do PN, HN e cVN em todos os animais, como demonstrado por nossos resultados. Contudo, os animais pCIH apresentaram menor aumento da amplitude do PN a 7% CO_2 quando comparado a resposta do grupo controle. Por outro lado, a resposta a 10% CO_2 do PN foi estatisticamente semelhante entre os grupos. Estes resultados demonstram que, nos animais pCIH, a sensibilidade ao CO_2 e a resposta do nervo frênico à menores incrementos de CO_2 estão atenuados.

A sensibilidade ao CO_2 é fundamental para a geração da atividade respiratória, visto que PaCO_2 propulsiona um *drive* excitatório na atividade respiratória (Baertsch and Baker 2017; Guyenet and Bayliss 2015; Boden et al. 1998). Com a redução da PaCO_2 , regiões quimiossensíveis como o RTN, Locus Coeruleus, Rafe bulbar, hipotálamo, deixam de estimular a CPG e não há atividade motora respiratória (Guyenet and Bayliss 2015). A redução de CO_2 até que ocorra a apneia é chamado de limiar apneico (Baertsch and Baker 2017). Em nosso protocolo de hipocapnia, ao reduzimos a quantidade de CO_2 de 5% para 1%, observamos que os animais pCIH apresentam apneias mais rapidamente quando comparado ao grupo controle. A redução do tempo desde o início da perfusão hipocápnica até o estado de apneia sugere que os animais pCIH sejam menos sensíveis ao CO_2 e, portanto, necessitem de um *drive* maior de CO_2 para excitar o CPG e gerar a atividade respiratória. Este resultado, em conjunto com a redução da resposta a 7% CO_2 , demonstra que a exposição a pCIH compromete a sensibilidade ao CO_2 . Os efeitos da hipóxia intermitente sobre os mecanismos centrais de monitoramento do CO_2 são controversos. Estudos em cachorros adultos demonstraram que a exposição a CIH também aumenta o limiar apneico (Katayama et al. 2007). Em humanos adultos e em ratos jovens, estudos demonstram que apneia ou a hipóxia intermitente, respectivamente, reduzem o limiar apneico (Javaheri and Dempsey 2013; Molkov et al. 2019). Baseados nos nossos resultados, sugerimos que a redução da sensibilidade ao CO_2 após a pCIH possa ser um mecanismo de proteção a hipoxemia intermitente em neonatos, uma vez que o menor ganho da sensibilidade central ao CO_2 pode prevenir a ocorrência de apneias centrais (Boden et al. 1998). Apesar desta plasticidade, a quimiossensibilidade central não está totalmente comprometida nestes animais, uma vez que a resposta a estímulos

mais vigorosos (10% de CO₂) promove respostas semelhantes nos animais controle e pCIH.

A diminuição da expressão de canais do tipo TASK2 e GPR4 em células quimiossensíveis do RTN poderiam contribuir para a redução da sensibilidade em animais pCIH, visto que os canais TASK2 e GPR4 mediam as respostas excitatórias intrínsecas dessas células ao CO₂/pH (Guyenet and Bayliss 2015). Além disso, plasticidade em neuromodulações poderiam estar envolvidas, como por exemplo da adenosina. Este neuromodulador inibitório é liberado em situações de hipóxia (Gourine et al. 2002) e existem evidências que a adenosina promove redução da função quimiossensível no RTN (Falquetto et al. 2018). Interessantemente, o antagonista de receptores de adenosina, a cafeína, é amplamente utilizada na prática clínica em casos de apneias de prematuros (Di Fiore et al. 2013). Consideramos, portanto, a hipótese de que os animais pCIH apresentam uma potenciação da neuromodulação pela adenosina, via aumento da liberação de adenosina em regiões quimiossensíveis ou aumento da expressão de seus receptores (A1), a qual contribui para a diminuição da sensibilidade ao CO₂.

Além da resposta ao CO₂, na preparação *in situ*, avaliamos também a resposta a estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN, visto que estudos prévios demonstram que a exposição a pCIH promove alterações no corpúsculo carotídeo, que potencializam a resposta a hipóxia *in vitro* e promovem maior resposta ventilatória *in vivo* (Nanduri et al. 2012). Contrastando tais estudos anteriores, nossos resultados *in situ* mostram que as respostas de aumento nas atividades dos nervos frênico, hipoglosso e vago ao KCN não estão potencializadas em ratos pCIH. A ausência da potenciação das respostas respiratórias à estimulação dos quimiorreceptores periféricos no nosso estudo *in situ* pode estar relacionada ao estímulo empregado para ativar tais células quimiossensíveis: hipóxia (estudos prévios) vs KCN (nosso estudo). Tal diferença pode estar associada ao fato de que a estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN está associada a deflagração de respostas máximas, sem a capacidade de induzir estímulos supra-máximos (Flor et al. 2018; Elies et al. 2015). Além disso, corroborando tais observações, estudos de Peng et al 2004 demonstraram que a resposta sensorial dos corpúsculos carotídeos de ratos recém-nascidos pCIH ao KCN é igual ao do controle, apesar de responderem mais à hipóxia (redução da FiO₂).

Por outro lado, podemos também considerar a hipótese de que modificações na sensibilidade dos mecanismos centrais de detecção do CO₂ podem prejudicar o processamento das respostas respiratórias à hipóxia. Há evidências de uma interação aditiva entre os quimiorreceptores centrais e periféricos, de forma que a quimiorrecepção central ao CO₂ influencia o ganho das respostas respiratórias à hipóxia (Blain et al. 2010). Considerando o fato da sensibilidade ao CO₂ estar reduzida nos animais pCIH, podemos sugerir que a depressão dos mecanismos responsáveis pela quimiorrecepção central, induzida pela pCIH, promova uma atenuação do processamento central das respostas respiratórias à estimulação dos quimiorreceptores periféricos. Nesse provável cenário, a facilitação sensorial dos quimiorreceptores periféricos após a exposição à pCIH seria, portanto, “tamponada” por uma atenuação do processamento central, gerando respostas de magnitude semelhante à do grupo controle. *In vivo*, podemos considerar que a presença de *inputs* suprabulbares (ausentes na preparação *in situ*) que modulem, de forma excitatória, a atividade dos quimiorreceptores centrais [por exemplo, sinais hipotalâmicos ou sinais relacionados ao ciclo sono-vigília (Burke et al. 2015; Barna et al. 2014)] possam contribuir para a manutenção do ganho central das respostas à estimulação dos quimiorreceptores periféricos, promovendo, assim, a potenciação da resposta ventilatória à hipóxia, assim como descrito por estudos anteriores (Nanduri et al. 2012). Tal hipótese, contudo, ainda demanda de estudos adicionais para ser elucidada.

Efeitos da pCIH sobre o ganho de peso dos animais

Verificamos que o peso dos animais submetidos a pCIH é menor quando comparado ao controle quando jovens (P25 e P40), entretanto, quando adultos (P90), esta diferença de peso não é mais observada, sendo semelhante entre os grupos. Durante o desenvolvimento, a presença de hipóxia intermitente pode acarretar em prejuízos em outros sistemas fisiológicos além do estudado nesse trabalho, como, por exemplo, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Tal hipótese é baseada em estudos que demonstraram que pCIH causa hiperglicemia e hiperinsulinemia, além de aumento significativo nos níveis de corticotrofina (ACTH) e corticosterona nos 15 primeiros dias de vida em ratos (Chintamaneni et al. 2013). Ademais, estudos de Cai et al (2018) demonstraram que a pCIH causa uma diminuição da sinalização do hormônio de crescimento, especialmente no fígado, o que contribui para um prejuízo para o

crescimento deste órgão (Cai et al. 2018). Em conjunto, essas ações da pCIH sobre vias metabólicas poderiam reduzir o ganho de peso até a vida jovem. Com a vida adulta, é possível que ratos pCIH tenham compensado o menor ganho de peso (como, por exemplo, apresentando hiperfagia), de forma a apresentar o mesmo peso corporal que os animais do grupo controle. Entretanto, nosso estudo não foi desenhado para explorar os aspectos metabólicos influenciados pela pCIH. Dessa forma, estudos adicionais e específicos serão necessários para explorar os fatores metabólicos modificados pela exposição à pCIH.

pCIH e mecanismos epigenéticos: implicações nas alterações a longo prazo

Verificamos que o tratamento com decitabina, durante o período de exposição à pCIH, foi capaz de prevenir as alterações respiratórias (*in vivo* e *in situ*). A decitabina é análoga da base nitrogenada citosina e funciona como inibidores das enzimas responsáveis pela metilação do DNA (DNMT's). Este medicamento é considerado, atualmente, como o mais avançados para terapias epigenéticas de câncer, utilizados para tratamento de doenças mieloplásicas (Oki et al. 2007). O mecanismo de ação desta droga se deve a fórmula química, que é reconhecida pelas DNMT's como substrato natural e as enzimas iniciam a reação de metilação, mas a reação é bloqueada com a decitabina. Assim, a enzima DNMT permanece ligada covalentemente ao DNA e a função é bloqueada. Em relação a farmacologia, foi demonstrado que a administração subcutânea da decitabina resulta num tempo de semivida beta (eliminação da substância) duas vezes superior em comparação com a administração intravenosa e que os cronogramas de administração clínica decitabina com intensidade de dose relativamente alta mostraram melhores taxas de resposta a terapia oncológica do que os esquemas que continuamente mantêm baixos níveis de droga no plasma (Stresemann and Lyko 2008). Assim sendo, em nossos experimentos tratamos os animais intraperitonealmente com doses em dias intercalados.

Com o uso deste fármaco, constatamos que a metilação do DNA parece ser o principal mecanismo epigenético responsável pela manutenção das alterações na atividade motora respiratória induzida pela hipóxia intermitente durante a vida pós-natal. Em nosso estudo, nós não avaliamos os mecanismos celulares influenciados pela metilação de DNA, os quais poderiam dar suporte às alterações motoras observadas nos

animais expostos à pCIH. Como a decitabina age em todos os tecidos e ultrapassa barreira hematoencefálica (Jabbour et al. 2008), trabalhamos com a hipótese dos efeitos centrais da metilação do DNA. Dada a complexidade dos resultados encontrados, com possibilidade de efeitos distintos (excitação e inibição) em diferentes núcleos do CPG respiratório, a elucidação de tais mecanismos demandam de estudos específicos e pontuais. Contudo, baseado em evidências na literatura, podemos propor alguns possíveis mecanismos.

Estudos de Nanduri demonstraram aumento da expressão de DNMTs em células do corpúsculo carotídeo de ratos jovens submetidos a pCIH (Nanduri et al. 2012). Além disso, os autores verificaram uma maior densidade de radicais metil ligados a genes relacionados à expressão de enzima anti-oxidantes, e uma redução da quantidade proteica dessas enzimas, acarretando o aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS). O aumento de ROS em células do corpúsculo carotídeo é considerado como um mecanismo necessário para a indução da hiperatividade dos quimiorreceptores periféricos (Nanduri and Prabhakar 2013). É sugerido que esse efeito também envolva o aumento da expressão do fator de transcrição HIF-1 α , o qual está relacionado com a regulação de vários processos celulares (Nanduri et al. 2019). Diante dessas informações, podemos sugerir que a exposição à pCIH modifica o padrão de expressão de DNMTs em neurônios excitatórios e inibitórios do CPG respiratório, promovendo o aumento da formação de ROS e do aumento da expressão de HIF-1 α . Tais eventos podem, conseqüentemente, modificar o perfil sináptico e a excitabilidade dos neurônios.

No SNC, os processos de metilação do DNA induzidos por despolarização neuronal ou atividade sináptica, que acontecem no hipocampo (Miller et al. 2008; Lubin et al. 2008; Feng et al. 2010) e no córtex (Miller et al. 2010), estão relacionados à plasticidade associada a consolidação da memória. Foi demonstrado que a metilação do DNA está associada à modificação pós-sinápticas que alteram a “força sináptica”, incluindo a potenciação e depressão de longo prazo (Sui et al. 2012; Rudenko et al. 2013). Tais efeitos complexos e distintos da metilação do DNA sobre a atividade neuronal estão relacionados com vários possíveis alvos celulares. Meadows et al (2015) demonstrou que a hipometilação do DNA (induzido por inatividade celular) em culturas primárias de células do córtex de ratos está associado com o aumento da expressão de receptores para glutamato (Meadows et al. 2015), sugerindo, portanto, que a ativação dos mecanismos de metilação do DNA é capaz de suprimir a neurotransmissão glutamatérgica, pelo menos

nesse tipo celular e nesta condição experimental. Por outro lado, Nelson et al (2008) demonstrou que a metilação do DNA, recrutada por ativação celular, é capaz de aumentar a frequência das correntes excitatórias pós-sinápticas miniaturas (mEPSCs) em cultura de células do hipocampo de camundongos (Nelson et al. 2008), sugerindo uma associação entre metilação do DNA e aumento da excitabilidade neuronal. Em outro estudo, Meadows et al. (2016) demonstrou que a hipometilação do DNA promoveu o aumento da excitabilidade intrínseca de neurônios piramidais corticais em cultura, em associação à redução da expressão dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} (canais SK) (Meadows et al. 2016), sugerindo uma associação entre a hiper-metilação do DNA e diminuição da excitabilidade neuronal. Dessa forma, podemos considerar que todos esses mecanismos descritos anteriormente podem mediar as alterações na atividade sináptica e excitabilidade dos neurônios que compõem o CPG respiratório, modificando a atividade motora respiratória de ratos pCIH. Entretanto, como descrito anteriormente, estudos específicos ainda serão necessários para elucidar os envolvimento de mecanismos epigenéticos no tronco encefálico.

pCIH + decitabina: outras considerações

O uso da decitabina em animais expostos à pCIH não é recomendado como forma de tratamento. O uso deste fármaco foi o método utilizado para explorar os mecanismos por trás das alterações patofisiológicas promovidas por HI na primeira infância. E apesar do tratamento com a decitabina em ratos expostos a pCIH prevenirem o aumento da VE, aumento do VT, aumento do PN e redução do cVN, esta droga reduz o ganho de peso corporal de forma substancial (a redução de 50% comparada ao controle veículo em P21). Além disso, há outras considerações que demonstram que o tratamento com a decitabina pode potencializar outros efeitos da exposição a pCIH, como, por exemplo, o aumento da fR basal, devido a redução do tempo expiratório, em preparações *in situ*, sugerindo possíveis alterações no centro gerador do ritmo respiratório, provavelmente a nível do pré-BötC (Del Negro et al 2017). Interessantemente, a hipercapnia (7% e 10%) promove aumento do tempo expiratório total e pós-inspiratório. O aumento de CO_2 em animais controle reduz a frequência destes animais na preparação *in situ* até valores que condizem com o controle no basal. Isto pode ser um indicativo de alterações metabólicas dependentes do *drive* de CO_2 . Contudo, o tratamento com a decitabina em animais pCIH

previne apresentam alterações nas respostas de amplitude a hipercapnia ou alterações no limiar de CO₂. Além disso, a gasometria em adultos (P90-99) não apresenta alterações significativas. Não temos evidências o suficiente que expliquem estas alterações, entretanto elas ocorrem.

O uso da decitabina como método farmacológico para compreensão de processos fisiológicos não é amplamente estudado (Oki et al. 2007; Nanduri et al. 2012). Demonstramos neste trabalho que o tratamento com a decitabina nos primeiros dias de vida não altera o padrão motor respiratório em jovens submetidos a normóxia, evidenciado na ventilação pulmonar e também na preparação *in situ*. Contudo estes animais apresentam aumento da ventilação pulmonar (por aumento da frequência e do volume corrente) quando adulto. Somado a este fato, estes animais apresentaram peso corporal reduzido na infância e na juventude, mas não na fase adulta da vida. Este aumento ventilatório não está associado a alterações nas concentrações sanguínea de gases. Sugerimos que estes animais apresentam déficit metabólico compensado pela ventilação. Este fato corrobora com a literatura de que a metilação do DNA é importante para o desenvolvimento do indivíduo, mas mais estudos são necessários para entender por mais mecanismos este fato ocorre(Caldji et al. 2011).

CONCLUSÕES

Concluimos, portanto, que a exposição a hipóxia intermitente durante o período pós-natal altera o funcionamento do sistema respiratório, promovendo alterações persistentes no controle motor e, conseqüentemente, na ventilação pulmonar. Demonstramos as conseqüências da exposição a pCIH sobre o padrão motor respiratório de ratos, aumentando a atividade do PN, contribuindo para a ventilação pulmonar em repouso; e reduzindo a atividade do cVN, predispondo às irregularidades respiratórias e apneias. Tais alterações motoras parecem ter origens centrais, ao passo que as irregularidades respiratórias observadas *in vivo* parecem depender de *inputs* periféricos, como dos quimiorreceptores periféricos. A relevância de informações sobre as modificações no controle neural respiratório (demonstrado pelas alterações motoras e redução do limiar apneico) pode apresentar um contexto translacional, uma vez que a hipóxia intermitente, presente em apneias da prematuridade, pode ser a origem de patologias respiratórias em adultos, como o desenvolvimento de apneias durante sono. Concluimos também que mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA participam ativamente das alterações promovidas pela pCIH, abrindo perspectivas futuras para o estudo das bases genéticas que dão suporte às alterações no controle motor respiratório.

REFERÊNCIAS

- Abdala, A. P. L., I. A. Rybak, J. C. Smith, and J. F. R. Paton. 2009. "Abdominal Expiratory Activity in the Rat Brainstem-Spinal Cord *in Situ* : Patterns, Origins and Implications for Respiratory Rhythm Generation." *The Journal of Physiology* 587 (14): 3539–59. doi:10.1113/jphysiol.2008.167502.
- Abu-shaweesh, Jalal M, and Richard J Martin. 2008. "State of the Art Series : Sleep Disordered Breathing in Children Neonatal Apnea : What ' s New ?" 944 (December 2007): 937–44. doi:10.1002/ppul.20832.
- Ainslie, Philip N., and James Duffin. 2009. "Integration of Cerebrovascular CO₂ Reactivity and Chemoreflex Control of Breathing: Mechanisms of Regulation, Measurement, and Interpretation." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296 (5): R1473–95. doi:10.1152/ajpregu.91008.2008.
- Anderson, Tatiana M., Alfredo J. Garcia, Nathan A. Baertsch, Julia Pollak, Jacob C. Bloom, Aguan D. Wei, Karan G. Rai, and Jan-Marino Ramirez. 2016. "A Novel Excitatory Network for the Control of Breathing." *Nature* 536 (7614). Nature Publishing Group: 76–80. doi:10.1038/nature18944.
- Baertsch, N. A., and T. L. Baker. 2017. "Reduced Respiratory Neural Activity Elicits a Long-Lasting Decrease in the CO₂threshold for Apnea in Anesthetized Rats." *Experimental Neurology* 287. Elsevier B.V.: 235–42. doi:10.1016/j.expneurol.2016.07.020.
- Bailey, E. F. 2006. "Modulation of Upper Airway Muscle Activities by Bronchopulmonary Afferents." *Journal of Applied Physiology* 101 (2): 609–17. doi:10.1152/japplphysiol.00204.2006.
- Bailey, E. F., C. L. Jones, J. C. Reeder, D. D. Fuller, and R. F. Fregosi. 2001. "Effect of Pulmonary Stretch Receptor Feedback and CO₂on Upper Airway and Respiratory Pump Muscle Activity in the Rat." *Journal of Physiology* 532 (2): 525–34. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0525f.x.
- Bailey, E Fiona, Ralph F Fregosi, E Fiona Bailey, and Ralph F Fregosi. 2010. "Reflexes from the Lungs and Airways Modulation of Upper Airway Muscle Activities by Bronchopulmonary Afferents" 0093: 609–17. doi:10.1152/japplphysiol.00204.2006.
- Baker-Herman, Tracy L, and Gordon S Mitchell. 2002. "Phrenic Long-Term Facilitation Requires Spinal Serotonin Receptor Activation and Protein Synthesis." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (14): 6239–46. doi:20026595.
- Barna, B F, A C Takakura, and T S Moreira. 2014. "Acute Exercise-Induced Activation of Phox2b-Expressing Neurons of the Retrotrapezoid Nucleus in Rats May Involve the Hypothalamus." *Neuroscience* 258. IBRO: 355–63. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.11.031.
- Barnett, William H., Ana P. Abdala, Julian F.R. Paton, Ilya A. Rybak, Daniel B. Zoccal,

- and Yaroslav I. Molkov. 2017. “Chemoreception and Neuroplasticity in Respiratory Circuits.” *Experimental Neurology* 287 (January). Elsevier Inc.: 153–64. doi:10.1016/j.expneurol.2016.05.036.
- Barnett, William H., Sarah E. M. Jenkin, William K. Milsom, Julian F. R. Paton, Ana P. Abdala, Yaroslav I. Molkov, and Daniel B. Zoccal. 2018. “The Kölliker-Fuse Nucleus Orchestrates the Timing of Expiratory Abdominal Nerve Bursting.” *Journal of Neurophysiology* 119 (2): 401–12. doi:10.1152/jn.00499.2017.
- Bautista, T G, and M Dutschmann. 2014. “Inhibition of the Pontine Kölliker-Fuse Nucleus Abolishes Eupneic Inspiratory Hypoglossal Motor Discharge in Rat.” *Neuroscience* 267. IBRO: 22–29. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.02.027.
- Bautista, Tara G., and Mathias Dutschmann. 2014. “Ponto-Medullary Nuclei Involved in the Generation of Sequential Pharyngeal Swallowing and Concomitant Protective Laryngeal Adduction in Situ.” *Journal of Physiology* 592 (12): 2605–23. doi:10.1113/jphysiol.2014.272468.
- Bavis, Ryan W, Frank L Powell, Aidan Bradford, Connie C W Hsia, Juha E Peltonen, Jorge Soliz, Bettina Zeis, et al. 2007. “Respiratory Plasticity in Response to Changes in Oxygen Supply and Demand” 47 (4): 532–51. doi:10.1093/icb/icm070.
- Bianchi, Armand L, Monique Denavit-Saubié, and Jean Champagnat. 1995. “Central Control of Breathing in Mammals: Neuronal Circuitry, Membrane Properties and Neurotransmitters.” *American Physiological Society* 53 (3): 21. doi:10.1152/physrev.1995.75.1.1.
- Blain, Gregory M, Curtis A Smith, Kathleen S Henderson, and Jerome A Dempsey. 2010. “Peripheral Chemoreceptors Determine the Respiratory Sensitivity of Central Chemoreceptors to CO₂” 13: 2455–71. doi:10.1113/jphysiol.2010.187211.
- Boden, A. G., M. C. Harris, and M. J. Parkes. 1998. “Apneic Threshold for CO₂ in the Anesthetized Rat: Fundamental Properties under Steady-State Conditions.” *Journal of Applied Physiology* 85 (3): 898–907. doi:10.1152/jappl.1998.85.3.898.
- Borday, V, G Fortin, and J Champagnat. 1997. “Early Ontogeny of Rhythm Generation and Control of Breathing 1” 110 (April): 245–49.
- Burke, Peter G R, Roy Kanbar, Tyler M Basting, Walter M Hodges, Kenneth E Viar, Ruth L Stornetta, and Patrice G Guyenet. 2015. “State-Dependent Control of Breathing by the Retrotrapezoid Nucleus” 13: 2909–26. doi:10.1113/JP270053.
- Cai, Charles, Taimur Ahmad, Gloria B. Valencia, Jacob V. Aranda, Jiliu Xu, and Kay D. Beharry. 2018. “Intermittent Hypoxia Suppression of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-I in the Neonatal Rat Liver.” *Growth Hormone and IGF Research* 41 (June 2017). Elsevier: 54–63. doi:10.1016/j.ghir.2018.03.001.
- Caldji, Christian, Ian C Hellstrom, Tie-yuan Zhang, Josie Diorio, and Michael J Meaney. 2011. “Environmental Regulation of the Neural Epigenome.” *FEBS Letters* 585 (13). Federation of European Biochemical Societies: 2049–58. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.032.
- Champagnat, Jean, Julien Bouvier, Muriel Thoby-brisson, and Gilles Fortin. 2011.

- “Respiratory Physiology & Neurobiology Prenatal Development of Central Rhythm Generation ζ .” *Respiratory Physiology & Neurobiology* 178 (1). Elsevier B.V.: 146–55. doi:10.1016/j.resp.2011.04.013.
- Champagnat, Jean, Marie Pierre Morin-Surun, Julien Bouvier, Muriel Thoby-Brisson, and Gilles Fortin. 2011. “Prenatal Development of Central Rhythm Generation.” *Respiratory Physiology and Neurobiology* 178 (1). Elsevier B.V.: 146–55. doi:10.1016/j.resp.2011.04.013.
- Cherniack, Neil S., and Guy S. Longobardo. 2006. “Mathematical Models of Periodic Breathing and Their Usefulness in Understanding Cardiovascular and Respiratory Disorders.” *Experimental Physiology* 91 (2): 295–305. doi:10.1113/expphysiol.2005.032268.
- Chintamaneni, Kathan, Eric D. Bruder, and Hershel Raff. 2013. “Effects of Age on ACTH, Corticosterone, Glucose, Insulin, and MRNA Levels during Intermittent Hypoxia in the Neonatal Rat.” *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 304 (9): R782–89. doi:10.1152/ajpregu.00073.2013.
- Colrain, I. M., J. Trinder, G. Fraser, and G. V. Wilson. 2017. “Ventilation during Sleep Onset.” *Journal of Applied Physiology* 63 (5): 2067–74. doi:10.1152/jap.1987.63.5.2067.
- da Silva, Elaine Fernanda, Mirian Bassi, José Vanderlei Menani, Débora Simões Almeida Colombari, Daniel Breseghello Zoccal, Gustavo Rodrigues Pedrino, and Eduardo Colombari. 2019. “Carotid Bodies Contribute to Sympathoexcitation Induced by Acute Salt Overload.” *Experimental Physiology* 104 (1): 15–27. doi:10.1113/EP087110.
- da Silva, Melina P., Davi José A. Moraes, Leni G.H. Bonagamba, André de Souza Mecawi, Wamberto A. Varanda, and Benedito H. Machado. 2019. *Hyperexcitability and Plasticity Induced by Sustained Hypoxia on Rectus Abdominis Motoneurons*. *Journal of Physiology*. doi:10.1113/JP277030.
- Dan Roel and Nancy L. Chamberlin^{1, 2*} Joel Geerling^{1, 2} Shigefumi Yokota^{1, 2, 3} Irma Rukhadze^{1, 2, 4, 5}. 2017. “Kölliker–Fuse GABAergic and Glutamatergic Neurons Project to Distinct Targets.” *Journal of Comparative Neurology* 525 (8): 1844–60. doi:10.1002/cne.24164.
- de Britto, Alan A., and Davi J. A. Moraes. 2016. “Non-Chemosensitive Parafacial Neurons Simultaneously Regulate Active Expiration and Airway Patency under Hypercapnia in Rats.” *The Journal of Physiology* 6: 2043–64. doi:10.1113/JP273335.
- Del Negro, Christopher A., Gregory D. Funk, and Jack L. Feldman. 2018. “Breathing Matters.” *Nature Reviews Neuroscience* 19 (6). Springer US: 351–67. doi:10.1038/s41583-018-0003-6.
- Devinney, M. J., D. P. Fields, A. G. Huxtable, T. J. Peterson, E. A. Dale, and G. S. Mitchell. 2015. “Phrenic Long-Term Facilitation Requires PKC Activity within Phrenic Motor Neurons.” *Journal of Neuroscience* 35 (21): 8107–17. doi:10.1523/JNEUROSCI.5086-14.2015.

- Devinney, Michael J., Adrienne G. Huxtable, Nicole L. Nichols, and Gordon S. Mitchell. 2013. "Hypoxia-Induced Phrenic Long-Term Facilitation: Emergent Properties." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1279 (1): 143–53. doi:10.1111/nyas.12085.
- Di Fiore, Juliann M., Richard J. Martin, and Estelle B. Gauda. 2013. "Apnea of Prematurity - Perfect Storm." *Respiratory Physiology and Neurobiology* 189 (2). Elsevier B.V.: 213–22. doi:10.1017/CCOL9780521199414.008.
- Dolinoy, Dana C., Jennifer R. Weidman, and Randy L. Jirtle. 2007. "Epigenetic Gene Regulation: Linking Early Developmental Environment to Adult Disease." *Reproductive Toxicology* 23 (3): 297–307. doi:10.1016/j.reprotox.2006.08.012.
- Donnelly, David F. 2005. "Development of Carotid Body / Petrosal Ganglion Response to Hypoxia" 149: 191–99. doi:10.1016/j.resp.2005.02.006.
- Duffin, James. 2004. "Functional Organization of Respiratory Neurons: A Brief Review of Current Questions and Speculations." *Experimental Physiology* 89 (5): 517–29. doi:10.1113/expphysiol.2004.028027.
- Dunai, Judith, J A N Kleiman, John Trinder, Jan Kleiman, and John Trinder Venti-. 2019. "Ventilatory Instability during Sleep Onset in Individuals with High Peripheral Chemosensitivity," 661–72.
- Dutschmann, Mathias, Tara G. Bautista, Michael Mörschel, and Thomas E. Dick. 2014. "Learning to Breathe: Habituation of Hering-Breuer Inflation Reflex Emerges with Postnatal Brainstem Maturation." *Respiratory Physiology and Neurobiology* 195 (1). Elsevier B.V.: 44–49. doi:10.1016/j.resp.2014.02.009.
- Dutschmann, Mathias, and Thomas E Dick. 2012. "Pontine Mechanisms of Respiratory Control." *Comprehensive Physiology* 2 (4). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.: 2443–69. doi:10.1002/cphy.c100015.
- Dutschmann, Mathias, and Horst Herbert. 2006. "The Kölliker-Fuse Nucleus Gates the Postinspiratory Phase of the Respiratory Cycle to Control Inspiratory off-Switch and Upper Airway Resistance in Rat." *European Journal of Neuroscience* 24 (4): 1071–84. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04981.x.
- Dutschmann, Mathias, Sarah E. Jones, Hari H. Subramanian, Davor Stanic, and Tara G Bautista. 2014. "The Physiological Significance of Postinspiration in Respiratory Control." In *Breathing, Emotion and Evolution*, 1st ed., 212:113–30. Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-444-63488-7.00007-0.
- Dutschmann, Mathias, and Michael Mo. 2009. "Pontine Respiratory Activity Involved in Inspiratory / Expiratory Phase Transition," 2517–26. doi:10.1098/rstb.2009.0074.
- Dutschmann, Mathias, Michael Mörschel, Ilya A. Rybak, and Thomas E. Dick. 2009. "Learning to Breathe: Control of the Inspiratory-Expiratory Phase Transition Shifts from Sensory- to Central-Dominated during Postnatal Development in Rats." *Journal of Physiology* 587 (20): 4931–48. doi:10.1016/j.sna.2011.04.036.
- Dutschmann, Mathias, and Julian F.R. Paton. 2002. "Inhibitory Synaptic Mechanisms Regulating Upper Airway Patency." *Respiratory Physiology and Neurobiology* 131

(1–2): 57–63. doi:10.1016/S1569-9048(02)00037-X.

- Elies, Jacobo, Jason L Scragg, Mark L Dallas, Dongyang Huang, Sha Huang, John P Boyle, Nikita Gamper, and Chris Peers. 2015. “Arterial Chemoreceptors in Physiology and Pathophysiology” 860: 353–60. doi:10.1007/978-3-319-18440-1.
- Ezure, K, and I Tanaka. 2004. “GABA, in Some Cases Together with Glycine, Is Used as the Inhibitory Transmitter by Pump Cells in the Hering-Breuer Reflex Pathway of the Rat.” *Neuroscience* 127 (2): 409–17. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.05.032.
- Falquetto, Bárbara, Luiz M. Oliveira, Ana C. Takakura, Daniel K. Mulkey, and Thiago S. Moreira. 2018. “Inhibition of the Hypercapnic Ventilatory Response by Adenosine in the Retrotrapezoid Nucleus in Awake Rats.” *Neuropharmacology* 138: 47–56. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.05.029.
- Feinberg, Andrew P. 2007. “Phenotypic Plasticity and the Epigenetics of Human Disease” 447 (May): 433–40. doi:10.1038/nature05919.
- Feldman, Jack L., Gordon S. Mitchell, and Eugene E. Nattie. 2003. “BREATHING: Rhythmicity, Plasticity, Chemosensitivity.” *Annual Review of Neuroscience* 26 (1): 239–66. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131103.
- Feldman, L. 2018. “Pacemaker Behavior of Respiratory Neurons in Medullary Slices From Neonatal Rat” 72 (6).
- Feng, Jian, Yu Zhou, Susan L Campbell, Thuc Le, En Li, J David Sweatt, Alcino J Silva, and Guoping Fan. 2010. “Ar t I c l e s Dnmt1 and Dnmt3a Maintain DNA Methylation and Regulate Synaptic Function in Adult Forebrain Neurons” 13 (4). doi:10.1038/nn.2514.
- Flor, Karine C., Elaine F. Silva, Miguel F. Menezes, Gustavo R. Pedrino, Eduardo Colombari, and Daniel B. Zoccal. 2018. “Short-Term Sustained Hypoxia Elevates Basal and Hypoxia-Induced Ventilation but Not the Carotid Body Chemoreceptor Activity in Rats.” *Frontiers in Physiology* 9 (FEB): 1–12. doi:10.3389/fphys.2018.00134.
- Forster, H. V., L. G. Pan, T. F. Lowry, A. Serra, J. Wenninger, and P. Martino. 2000. “Important Role of Carotid Chemoreceptor Afferents in Control of Breathing of Adult and Neonatal Mammals.” *Respiration Physiology* 119 (2–3): 199–208. doi:10.1016/S0034-5687(99)00115-2.
- Fregosi, Ralph F., and David D. Fuller. 1997. “Respiratory-Related Control of Extrinsic Tongue Muscle Activity.” *Respiration Physiology* 110 (2–3): 295–306. doi:10.1016/S0034-5687(97)00095-9.
- Fuller, D. D., K. B. Bach, T. L. Baker, R. Kinkead, and G. S. Mitchell. 2000. “Long Term Facilitation of Phrenic Motor Output.” *Respiration Physiology* 121 (2–3): 135–46. doi:10.1016/S0034-5687(00)00124-9.
- Gestreau, Christian, Dirk Heitzmann, Joerg Thomas, Véronique Dubreuil, Markus Reichold, Saïd Bendahhou, Patricia Pierson, et al. 2015. “Task2 Potassium Channels Set Central Respiratory and O₂ Sensitivity.”

- Gluckman, Peter D., Wayne Cutfield, Paul Hofman, and Mark A. Hanson. 2005. "The Fetal, Neonatal, and Infant Environments—the Long-Term Consequences for Disease Risk." *Early Human Development* 81 (1): 51–59. doi:10.1016/j.earlhumdev.2004.10.003.
- Gourine, Alexander V, Enrique Llaudet, Teresa Thomas, Nicholas Dale, and K Michael Spyer. 2002. "Adenosine Release in Nucleus Tractus Solitarii Does Not Appear to Mediate Hypoxia-Induced Respiratory Depression in Rats," 161–70. doi:10.1113/jphysiol.2002.024174.
- Gray, Paul A, Wiktor A Janczewski, Nicholas Mellen, Donald R Mccrimmon, and Jack L Feldman. 2001. "Normal Breathing Requires PreBötzinger Complex Neurokinin-1 Receptor-Expressing Neurons," 2–5.
- Greer, John J., Gregory D. Funk, and Klaus Ballanyi. 2006. "Preparing for the First Breath: Prenatal Maturation of Respiratory Neural Control." *Journal of Physiology* 570 (3): 437–44. doi:10.1113/jphysiol.2005.097238.
- Greer, John J, and Gregory D Funk. 2005. "Perinatal Development of Respiratory Motoneurons" 149: 43–61. doi:10.1016/j.resp.2005.03.017.
- Guyenet, Patrice G. 2014. "Regulation of Breathing and Autonomic Outflows by Chemoreceptors." *Comprehensive Physiology* 4 (4): 1511–62. doi:10.1002/cphy.c140004.
- Guyenet, Patrice G., and Douglas A. Bayliss. 2015. "Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis." *Neuron* 87 (5). Elsevier Inc.: 946–61. doi:10.1016/j.neuron.2015.08.001.
- Hakim, Fahed, David Gozal, and Leila Kheirandish-gozal. 2012. "Sympathetic and Catecholaminergic Alterations in Sleep Apnea with Particular Emphasis on Children" 3 (January): 1–13. doi:10.3389/fneur.2012.00007.
- Halloran, Ken D O, Philip Lewis, and Fiona Mcdonald. 2016. "Muscle Dysfunction Following Intermittent Hypoxia in Females." *Respiratory Physiology & Neurobiology*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.resp.2016.11.009.
- Jabbour, Elias, Jean-Pierre Issa, Guillermo Garcia-Manero, and Hagop Kantarjian. 2008. "Evolution of Decitabine Development." *Cancer* 112 (11): 2341–51. doi:10.1002/cncr.23463.
- Javaheri, S, and J A Dempsey. 2013. "Central Sleep Apnea" 3 (January): 141–63. doi:10.1002/cphy.c110057.
- Jenkin, Sarah E.M., and William K. Milsom. 2014. *Expiration: Breathing's Other Face. Progress in Brain Research*. 1st ed. Vol. 212. Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-444-63488-7.00008-2.
- Jousse, C., L. Parry, S. Lambert-Langlais, A.-C. Maurin, J. Averous, A. Bruhat, V. Carraro, et al. 2011. "Perinatal Undernutrition Affects the Methylation and Expression of the Leptin Gene in Adults: Implication for the Understanding of Metabolic Syndrome." *The FASEB Journal* 25 (9): 3271–78. doi:10.1096/fj.11-181792.

- Julien, Cécile, Aida Bairam, and Vincent Joseph. 2008. "Chronic Intermittent Hypoxia Reduces Ventilatory Long-Term Facilitation and Enhances Apnea Frequency in Newborn Rats." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294 (4): R1356–66. doi:10.1152/ajpregu.00884.2007.
- Katayama, Keisho, Curtis A. Smith, Kathleen S. Henderson, and Jerome A. Dempsey. 2007. "Chronic Intermittent Hypoxia Increases the CO₂ Reserve in Sleeping Dogs." *Journal of Applied Physiology* 103 (6): 1942–49. doi:10.1152/jappphysiol.00735.2007.
- Kitsiou-Tzeli, Sofia, and Maria Tzetzis. 2017. "Maternal Epigenetics and Fetal and Neonatal Growth." *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 24 (1): 43–46. doi:10.1097/MED.0000000000000305.
- Kubin, Leszek, George F Alheid, Edward J Zuperku, Donald R Mccrimmon, Débora S A Colombari, Leszek Kubin, George F Alheid, Edward J Zuperku, and Donald R Mccrimmon. 2006. "Central Pathways of Pulmonary and Lower Airway Vagal Afferents." doi:10.1152/jappphysiol.00252.2006.
- Kumar, Prem, Nanduri R Prabhakar, and Compr Physiol. 2012. "Peripheral Chemoreceptors : Function and Plasticity of the Carotid Body" 2 (January): 141–219. doi:10.1002/cphy.c100069.
- Kuna, S, G Insalaco, and G E Woodson. 1988. "Thyroarytenoid Muscle Activity during Wakefulness and Sleep in Normal Adults." *Journal of Applied Physiology* 65 (3): 1332–39. doi:10.1152/jappl.1988.65.3.1332.
- Kuna, S T, R A Day, G Insalaco, and R D Villeponteaux. 1991. "Posterior Cricothyroid Activity in Normal Adults during Involuntary and Voluntary Hyperventilation." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 70 (3): 1377–85.
- Lahiri, S., A. Roy, S. M. Baby, T. Hoshi, G. L. Semenza, and N. R. Prabhakar. 2006. "Oxygen Sensing in the Body." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 91 (3): 249–86. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2005.07.001.
- Lemes, E. V., S. Aiko, C. B. Orbem, C. Formentin, M. Bassi, E. Colombari, and D. B. Zoccal. 2016. "Long-Term Facilitation of Expiratory and Sympathetic Activities Following Acute Intermittent Hypoxia in Rats." *Acta Physiologica* 217 (3): 254–66. doi:10.1111/apha.12661.
- Lemes, Eduardo V., and Daniel B. Zoccal. 2014. "Vagal Afferent Control of Abdominal Expiratory Activity in Response to Hypoxia and Hypercapnia in Rats." *Respiratory Physiology and Neurobiology* 203. Elsevier B.V.: 90–97. doi:10.1016/j.resp.2014.08.011.
- Lemes, Eduardo V, and Daniel B Zoccal. 2014. "Caracterização Das Alterações Cardiorrespiratórias Induzidas Pela Hipóxia Intermitente Aguda e Participação Dos Mecanismos Serotoninérgicos Da Superfície Ventral Do Bulbo," 125 p. <http://www.bu.ufsc.br/teses/PCFI0010-D.pdf>.
- Lindsey, Bruce G., Ilya A. Rybak, and Jeffrey C. Smith. 2012. "Computational Models and Emergent Properties of Respiratory Neural Networks." *Comprehensive*

Physiology 2 (3): 1619–70. doi:10.1002/cphy.c110016.

- Lubin, Farah D, Tania L Roth, and J David Sweatt. 2008. “Epigenetic Regulation of Bdnf Gene Transcription in the Consolidation of Fear Memory” 28 (42): 10576–86. doi:10.1523/JNEUROSCI.1786-08.2008.
- Luján, R., R. Shigemoto, and G. López-Bendito. 2005. “Glutamate and GABA Receptor Signalling in the Developing Brain.” *Neuroscience* 130 (3): 567–80. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.09.042.
- Macfarlane, P. M., I. Satriotomo, J. A. Windelborn, and G. S. Mitchell. 2009. “NADPH Oxidase Activity Is Necessary for Acute Intermittent Hypoxia-Induced Phrenic Long-Term Facilitation.” *Journal of Physiology* 587 (9): 1931–42. doi:10.1113/jphysiol.2008.165597.
- Marchenko, Vitaliy, Michael G Z Ghali, and Robert F Rogers. 2019. “The Role of Spinal GABAergic Circuits in the Control of Phrenic Nerve Motor Output” 19129: 916–26. doi:10.1152/ajpregu.00244.2014.
- Martin, R J, J M Di Fiore, P M Macfarlane, and C G Wilson. 2012. “Physiologic Basis for Intermittent Hypoxic Episodes in Preterm Infants,” 351–58. doi:10.1007/978-94-007-4584-1.
- Martin, Richard J., and Jalal M. Abu-Shaweesh. 2005. “Control of Breathing and Neonatal Apnea.” *Biology of the Neonate* 87 (4): 288–95. doi:10.1159/000084876.
- McDonald, Fiona B., Robert Williams, David Sheehan, and Ken D. O’Halloran. 2015. “Early Life Exposure to Chronic Intermittent Hypoxia Causes Upper Airway Dilator Muscle Weakness, Which Persists into Young Adulthood.” *Experimental Physiology* 100 (8): 947–66. doi:10.1113/EP085003.
- Mcdonald, Fiona B, Eugene M Dempsey, and Ken D O Halloran. 2016. “Effects of Gestational and Postnatal Exposure to Chronic Intermittent Hypoxia on Diaphragm Muscle Contractile Function in the Rat” 7 (July): 1–10. doi:10.3389/fphys.2016.00276.
- Meadows, Jarrod P, Mikael C Guzman-karlsson, Scott Phillips, Jordan A Brown, Sarah K Strange, J David Sweatt, and John J Hablitz. 2016. “Dynamic DNA Methylation Regulates Neuronal Intrinsic Membrane Excitability” 9 (442): 1–15.
- Meadows, Jarrod P, Mikael C Guzman-karlsson, Scott Phillips, Cassie Holleman, Jessica L Posey, Jeremy J Day, John J Hablitz, and J David Sweatt. 2015. “NEUROEPIGENETICS DNA Methylation Regulates Neuronal Glutamatergic Synaptic Scaling” 8 (382): 1–10.
- Mehler, Mark F. 2008. “Progress in Neurobiology Epigenetic Principles and Mechanisms Underlying Nervous System Functions in Health and Disease” 86: 305–41. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.10.001.
- Miller, Courtney A, Susan L Campbell, and J David Sweatt. 2008. “DNA Methylation and Histone Acetylation Work in Concert to Regulate Memory Formation and Synaptic Plasticity” 89: 599–603. doi:10.1016/j.nlm.2007.07.016.
- Miller, Courtney A, Cristin F Gavin, Jason A White, R Ryley Parrish, Avinash

- Honasoge, Christopher R Yancey, Ivonne M Rivera, María D Rubio, Gavin Rumbaugh, and J David Sweatt. 2010. “Cortical DNA Methylation Maintains Remote Memory.” *Nature Publishing Group* 13 (6). Nature Publishing Group: 664–66. doi:10.1038/nn.2560.
- Molkov, Yaroslav I, Daniel B Zoccal, Davi J A Moraes, Julian F R Paton, Benedito H Machado, and Ilya A Rybak. 2019. “Intermittent Hypoxia-Induced Sensitization of Central Chemoreceptors Contributes to Sympathetic Nerve Activity during Late Expiration in Rats,” 3080–91. doi:10.1152/jn.00070.2011.
- Moraes, Davi J. A., Leni G. H. Bonagamba, Daniel B. Zoccal, and Benedito H. Machado. 2011. “Modulation of Respiratory Responses to Chemoreflex Activation by l-Glutamate and ATP in the Rostral Ventrolateral Medulla of Awake Rats.” *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300 (6): R1476–86. doi:10.1152/ajpregu.00825.2010.
- Moraes, Davi J A, Melina P Silva, Leni G H Bonagamba, S Mecawi, Daniel B Zoccal, Wamberto A Varanda, and Benedito H Machado. 2013. “Electrophysiological Properties of Rostral Ventrolateral Medulla Presympathetic Neurons Modulated by the Respiratory Network in Rats” 33 (49): 19223–37. doi:10.1523/JNEUROSCI.3041-13.2013.
- Moreira, Thiago S., Ana C. Takakura, Eduardo Colombari, and Patrice G. Guyenet. 2006. “Central Chemoreceptors and Sympathetic Vasomotor Outflow.” *The Journal of Physiology* 577 (1): 369–86. doi:10.1113/jphysiol.2006.115600.
- Moss, Immanuela Ravé. 2000. “Respiratory Responses to Single and Episodic Hypoxia during Development: Mechanisms of Adaptation.” *Respiration Physiology* 121 (2–3): 185–97. doi:10.1016/S0034-5687(00)00127-4.
- Mulkey, Daniel K, Ruth L Stornetta, Matthew C Weston, Johnny R Simmons, Anson Parker, Douglas A Bayliss, and Patrice G Guyenet. 2004. “Respiratory Control by Ventral Surface Chemoreceptor Neurons in Rats” 7 (12): 1360–69. doi:10.1038/nn1357.
- Nanduri, Jayasri, Vladislav Makarenko, Vaddi Damodara, Guoxiang Yuan, Anita Pawar, and Ning Wang. 2012. “Epigenetic Regulation of Hypoxic Sensing Disrupts Cardiorespiratory Homeostasis” 109 (7): 1–6. doi:10.1073/pnas.1120600109.
- Nanduri, Jayasri, Vladislav Makarenko, Vaddi Damodara Reddy, Guoxiang Yuan, Anita Pawar, Ning Wang, Shakil A Khan, et al. 2012. “Epigenetic Regulation of Hypoxic Sensing Disrupts Cardiorespiratory Homeostasis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (7): 2515–20. doi:10.1073/pnas.1120600109.
- Nanduri, Jayasri, and Nanduri R. Prabhakar. 2013. “Developmental Programming of O₂ Sensing by Neonatal Intermittent Hypoxia via Epigenetic Mechanisms.” *Respiratory Physiology & Neurobiology* 185 (1). Elsevier B.V.: 105–9. doi:10.1016/j.resp.2012.07.016.
- Nanduri, Jayasri, Gregg L Semenza, and X Nanduri R Prabhakar. 2019. “Physiology in Medicine Epigenetic Changes by DNA Methylation in Chronic and Intermittent

- Hypoxia,” no. 54: 1096–1100. doi:10.1152/ajplung.00325.2017.
- Nelson, Erika D, Ege T Kavalali, and Lisa M Monteggia. 2008. “Activity-Dependent Suppression of Miniature Neurotransmission through the Regulation of DNA Methylation” 28 (2): 395–406. doi:10.1523/JNEUROSCI.3796-07.2008.
- Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, D’Agostino RB, Newman AB, Lebowitz MD, Pickering TG. 2000. “Association of Sleep-Disordered Breathing, Sleep Apnea, and Hypertension in a Large Community-Based Study” 284 (14).
- Oki, Yasuhiro, Etsuko Aoki, and Jean-pierre J Issa. 2007. “Decitabine — Bedside to Bench” 61 (July 2006): 140–52. doi:10.1016/j.critrevonc.2006.07.010.
- Oudiette, Delphine, Pauline Dodet, Nahema Ledard, Emilie Artru, Inès Rachidi, Thomas Similowski, and Isabelle Arnulf. 2018. “REM Sleep Respiratory Behaviours Mental Content in Narcoleptic Lucid Dreamers.” *Scientific Reports* 8 (1): 1–10. doi:10.1038/s41598-018-21067-9.
- Paton, Julian F.R. 1996. “A Working Heart-Brainstem Preparation of the Mouse.” *Journal of Neuroscience Methods* 65 (1): 63–68. doi:10.1016/0165-0270(95)00147-6.
- Paton, Julian F.R., and Mathias Dutschmann. 2002. “Central Control of Upper Airway Resistance Regulating Respiratory Airflow in Mammals.” *Journal of Anatomy* 201 (4): 319–23. doi:10.1046/j.1469-7580.2002.00101.x.
- Peña, Fernando, and Jan-marino Ramirez. 2005. “Hypoxia-Induced Changes in Neuronal Network Properties” 32 (3): 251–83.
- Peng, Y.- J., J. Nanduri, G. Yuan, N. Wang, E. Deneris, S. Pendyala, V. Natarajan, G. K. Kumar, and N. R. Prabhakar. 2009. “NADPH Oxidase Is Required for the Sensory Plasticity of the Carotid Body by Chronic Intermittent Hypoxia.” *Journal of Neuroscience* 29 (15): 4903–10. doi:10.1523/jneurosci.4768-08.2009.
- Peng, Y.-J., J. Rennison, and N.R. Prabhakar. 2004. “Intermittent Hypoxia Augments Carotid Body and Ventilatory Response to Hypoxia in Neonatal Rat Pups.” *Journal of Applied Physiology* 97 (5): 2020–25. doi:10.1152/jappphysiol.00876.2003.
- Peng, Ying-jie, and Nanduri R Prabhakar. 2019. “Reactive Oxygen Species in the Plasticity of Respiratory Behavior Elicited by Chronic Intermittent Hypoxia” 44106: 2342–49.
- Prabhakar, Nanduri R., Yin J. Peng, Ganesh K. Kumar, and Anita Pawar. 2007. “Altered Carotid Body Function by Intermittent Hypoxia in Neonates and Adults: Relevance to Recurrent Apneas.” *Respiratory Physiology and Neurobiology* 157 (1): 148–53. doi:10.1016/j.resp.2006.12.009.
- Prabhakar, Nanduri R, and Gregg L Semenza. 2012. “Adaptive and Maladaptive Cardiorespiratory Responses to Continuous and Intermittent Hypoxia Mediated by Hypoxia-Inducible Factors 1 and 2.” *Physiological Reviews* 92 (3): 967–1003. doi:10.1152/physrev.00030.2011.

- Reeves, Stephen R., and David Gozal. 2005. "Developmental Plasticity of Respiratory Control Following Intermittent Hypoxia." *Respiratory Physiology and Neurobiology* 149 (1–3): 301–11. doi:10.1016/j.resp.2005.01.014.
- Richter, Diethelm W., and Jeffrey C. Smith. 2014. "Respiratory Rhythm Generation In Vivo." *Physiology* 29 (1): 58–71. doi:10.1152/physiol.00035.2013.
- Rudenko, Andrii, Meelad M Dawlaty, Jinsoo Seo, Albert W Cheng, Jia Meng, Thuc Le, and Kym F Faull. 2013. "Article Tet1 Is Critical for Neuronal Activity-Regulated Gene Expression and Memory Extinction." *Neuron* 79 (6). Elsevier Inc.: 1109–22. doi:10.1016/j.neuron.2013.08.003.
- Semenza, Gregg L, and Nanduri R Prabhakar. 2007. "HIF-1–Dependent Respiratory, Cardiovascular, and Redox Responses to Chronic Intermittent Hypoxia." *Antioxidants & Redox Signaling* 9 (9): 1391–96. doi:10.1089/ars.2007.1691.
- Sica, ANTHONY L., M I Cohen, D F Donnelly, and H Zhang. 1984. "Hypoglossal Motoneuron Responses to Pulmonary and Superior Laryngeal Afferent Inputs." *Respiration Physiology* 56 (3): 339–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6089289>.
- Silva, Josiane N., Fabiola M. Tanabe, Thiago S. Moreira, and Ana C. Takakura. 2016. "Neuroanatomical and Physiological Evidence That the Retrotrapezoid Nucleus/Parafacial Region Regulates Expiration in Adult Rats." *Respiratory Physiology and Neurobiology* 227. Elsevier B.V.: 9–22. doi:10.1016/j.resp.2016.02.005.
- Smith, J. C., A. P. L. Abdala, H. Koizumi, I. A. Rybak, and J. F. R. Paton. 2007. "Spatial and Functional Architecture of the Mammalian Brain Stem Respiratory Network: A Hierarchy of Three Oscillatory Mechanisms." *Journal of Neurophysiology* 98 (6): 3370–87. doi:10.1152/jn.00985.2007.
- Solomon, I C, N H Edelman, and J A Neubauer. 1999. "Patterns of Phrenic Motor Output Evoked by Chemical Stimulation of Neurons Located in the Pre-Bötzinger Complex in Vivo." *Journal of Neurophysiology* 81 (3): 1150–61. doi:10.1109/HICSS.2005.234.
- Souza, George M P R, Roy Kanbar, Daniel S Stornetta, Stephen B G Abbott, Ruth L Stornetta, Patrice G Guyenet, Scott Powers, and Frank Powell. 2018. "Breathing Regulation and Blood Gas Homeostasis after near Complete Lesions of the Retrotrapezoid Nucleus in Adult Rats" 13: 2521–45. doi:10.1113/JP275866.
- St.-John, Walter M., and Julian F.R. Paton. 2003. "Defining Eupnea." *Respiratory Physiology and Neurobiology* 139 (1): 97–103. doi:10.1016/S1569-9048(03)00193-9.
- Stöwhas, Anne Christin, Mona Lichtblau, and Konrad E. Bloch. 2019. "Obstructive Sleep Apnea Syndrome." *Praxis* 108 (2): 111–17. doi:10.1024/1661-8157/a003198.
- Stresemann, Carlo, and Frank Lyko. 2008. "Modes of Action of the DNA Methyltransferase Inhibitors Azacytidine and Decitabine." *International Journal of Cancer* 123 (1): 8–13. doi:10.1002/ijc.23607.

- Sui, Li, Yan Wang, Li-hua Ju, and Meng Chen. 2012. "Neurobiology of Learning and Memory Epigenetic Regulation of Reelin and Brain-Derived Neurotrophic Factor Genes in Long-Term Potentiation in Rat Medial Prefrontal Cortex." *Neurobiology of Learning and Memory* 97 (4). Elsevier Inc.: 425–40. doi:10.1016/j.nlm.2012.03.007.
- Takakura, Ana C, F Barna, Josiane C Cruz, Eduardo Colombari, and Thiago S Moreira. 2014. "Phox2b-Expressing Retrotrapezoid Neurons and the Integration of Central and Peripheral Chemosensory Control of Breathing in Conscious Rats" 3: 571–85. doi:10.1113/expphysiol.2013.076752.
- Tan, Wenbin, Wiktor A. Janczewski, Paul Yang, Xuesi M. Shao, Edward M. Callaway, and Jack L. Feldman. 2008. "Silencing PreBötzing Complex Somatostatin-Expressing Neurons Induces Persistent Apnea in Awake Rat." *Nature Neuroscience* 11 (5): 538–40. doi:10.1038/nn.2104.
- Yang, Cindy F., and Jack L. Feldman. 2018. "Efferent Projections of Excitatory and Inhibitory PreBötzing Complex Neurons." *Journal of Comparative Neurology* 526 (8): 1389–1402. doi:10.1002/cne.24415.
- Zaki Ghali, Michael George, Gavin Britz, and Kun Ze Lee. 2018. "Pre-Phrenic Interneurons: Characterization and Role in Phrenic Pattern Formation and Respiratory Recovery Following Spinal Cord Injury." *Respiratory Physiology and Neurobiology*. doi:10.1016/j.resp.2018.09.005.
- Zoccal, Daniel B., Julian F.R. Paton, and Benedito H. MacHado. 2009. "Do Changes in the Coupling between Respiratory and Sympathetic Activities Contribute to Neurogenic Hypertension?" *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 36 (12): 1188–96. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05202.x.
- Zoccal, Daniel B., Josiane N. Silva, William H. Barnett, Eduardo V. Lemes, Barbara Falquetto, Eduardo Colombari, Yaroslav I. Molkov, Thiago S. Moreira, and Ana C. Takakura. 2018. "Interaction between the Retrotrapezoid Nucleus and the Parafacial Respiratory Group to Regulate Active Expiration and Sympathetic Activity in Rats." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 315 (5): L891–909. doi:10.1152/ajplung.00011.2018.
- Zoccal, Daniel B., Annabel E. Simms, Leni G.H. Bonagamba, Valdir A. Braga, Anthony E. Pickering, Julian F.R. Paton, and Benedito H. Machado. 2008. "Increased Sympathetic Outflow in Juvenile Rats Submitted to Chronic Intermittent Hypoxia Correlates with Enhanced Expiratory Activity." *Journal of Physiology* 586 (13): 3253–65. doi:10.1113/jphysiol.2008.154187.