



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Andressa Bárbara Evangelista

**Efeitos do tratamento pós-natal com cafeína sobre a ventilação e
irregularidades respiratórias em animais hipertensos**

Araraquara
2025



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Andressa Bárbara Evangelista

**Efeitos do tratamento pós-natal com cafeína sobre a ventilação e
irregularidades respiratórias em animais hipertensos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Odontologia da
Faculdade de Odontologia de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista, para a
obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

**Orientador: Prof. Dr. Daniel Breseghello
Zoccal**

**Araraquara
2025**

E92e

Evangelista, Andressa Bárbara

Efeitos do tratamento pós-natal com cafeína sobre a ventilação e irregularidades respiratórias em animais hipertensos / Andressa Bárbara Evangelista. -- Araraquara, 2025

40 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Daniel Breseghello Zoccal

1. Hipertensão Arterial. 2. Cafeína. 3. Irregularidade Respiratória. 4. Apneia. 5. Neonatal. I. Título.

UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara

Andressa Bárbara Evangelista

**Efeitos do tratamento pós-natal com cafeína sobre a ventilação e
irregularidades respiratórias em animais hipertensos**

Orientador: Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal

Assinatura Orientador (a):

Assinatura Aluno (a):

Araraquara, 10 outubro de 2025

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me amparou e esteve comigo durante essa jornada na graduação. Obrigada, Pai, por me dar clareza mental e, principalmente, força e coragem para concluir essa etapa da minha vida. Agradeço também a Nossa Senhora Aparecida que também esteve ao meu lado, intercedendo junto a Jesus.

Aos meus pais, Rogerio Donizetti Evangelista e Inês Maria Eliza Martins, pois permitiram que eu tivesse a oportunidade de cursar Odontologia na Unesp-FOAr e sempre foram exemplos de perseverança e dedicação para mim. Mas, obrigada, especialmente, à minha mãe que nunca mediu esforços para me ver bem.

Aos meus avós, Pedro Evangelista Filho e Maria Rosa de Araújo Evangelista, que nunca duvidaram da minha capacidade. Obrigada vó Rosa pelas suas orações e por sempre acreditar em mim.

À minha avó, Bárbara Maria Aparecida Martins, que desde criança cuidou de mim. “Vozinha”, a senhora é meu exemplo de amor, ternura, compaixão e, principalmente, afeto, obrigada por ter contribuído com a minha educação.

À minha irmã, Melissa Mariana Evangelista, que, mesmo tão pequena, me inspira a ser forte e corajosa.

Ao meu noivo, Bruno Expedito Melo, que foi meu alicerce durante os dias difíceis dessa graduação. Obrigada, amor, por ser sempre tão bondoso, paciente e acolhedor comigo.

Ao meu orientador, Daniel, que contribuiu de forma significativa na minha formação acadêmica e pessoal, pois, além de ser um excelente pesquisador, é um humano muito admirável. Obrigada professor, por todo apoio e suporte durante essa jornada de crescimento.

Ao Dr. Pedro Katayama pelo auxílio técnico nos procedimentos de avaliação dos parâmetros cardiovasculares e à Dra. Milede H. S. Paes pelo auxílio com o cruzamento dos animais.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Unesp (PIBIC-CNPq, processo 120426/2023-4), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo 2022/05717-0) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Evangelista AB. Efeitos do tratamento pós-natal com cafeína sobre a ventilação e irregularidades respiratórias em animais hipertensos [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

RESUMO

A hipertensão arterial (HA) é uma das doenças cardiovasculares mais prevalentes e impactantes em todo o mundo. Evidências clínicas e experimentais indicam que a hiperatividade simpática dirigida aos vasos sanguíneos exerce papel central no desenvolvimento da HA essencial. Um fator crítico que pode modular o funcionamento do sistema nervoso simpático é o suprimento adequado de oxigênio (O_2) ao sistema nervoso central (SNC) durante o período pós-natal — fase decisiva para a maturação das redes neurais. Tanto em pacientes hipertensos quanto em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) — modelo experimental clássico da HA essencial — observa-se estreitamento do lúmen da artéria vértebro-basilar, resultando em hipoperfusão e hipóxia do tronco encefálico. Nos SHR, essa hipóxia central está presente desde o nascimento, indicando baixa disponibilidade de O_2 para o SNC durante todo o desenvolvimento pós-natal. Paralelamente, esses animais exibem irregularidades respiratórias, com episódios de apneia, sugerindo alterações estruturais e funcionais nas redes neurais que controlam a respiração. Resultados do nosso grupo demonstram que tais distúrbios respiratórios estão presentes desde o início da vida, gerando repetidos episódios de hipóxia que podem influenciar, de forma persistente, a função autonômica. Com base nessas evidências, propomos que as irregularidades respiratórias decorram, ao menos em parte, de um desbalanço purinérgico no SNC, caracterizado por exacerbada sinalização via adenosina. Para investigar essa hipótese, empregamos registros *in vivo* da ventilação e avaliamos os efeitos do tratamento com cafeína — um antagonista de receptores de adenosina — sobre a ventilação de animais SHR. Nossos resultados mostram que o tratamento pós-natal com a cafeína foi capaz de aumentar a ventilação de animais SHR e atenuar o aumento da pressão arterial na vida adulta.

Palavras – chave: cafeína; apneia; hipertensão;

Evangelista AB. Effects of postnatal caffeine treatment on ventilation and respiratory irregularities in hypertensive animals [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

ABSTRACT

Arterial hypertension (AH) is one of the most common and impactful cardiovascular diseases worldwide. Clinical and experimental evidence shows that sympathetic overactivity targeting blood vessels plays a central role in the development of essential hypertension. An important factor that may influence sympathetic nervous system function is the proper supply of oxygen (O_2) to the central nervous system (CNS) during the postnatal period — a critical phase for neural network development. Both in hypertensive patients and in spontaneously hypertensive rats (SHR) — a well-established experimental model of essential hypertension — a narrowing of the vertebrobasilar artery lumen has been observed, leading to brainstem hypoperfusion and hypoxia. In SHR, this central hypoxia is present from birth, indicating reduced O_2 availability to the CNS throughout postnatal development. Simultaneously, these animals show respiratory irregularities, such as apnea episodes, implying structural and functional changes in the neural networks that control breathing. Our group's findings indicate that such respiratory disturbances are present from the very beginning of life, causing repeated hypoxic episodes that may have lasting effects on autonomic function. Based on this evidence, we suggest that respiratory irregularities may, at least partly, result from a purinergic imbalance in the CNS, characterized by exacerbated adenosine signaling. To investigate this hypothesis, we employed *in vivo* ventilation recordings and assessed the effects of caffeine treatment, a well-known adenosine receptor antagonist, on ventilation in SHRs. Our results show that post-natal caffeine treatment in SHR increased baseline ventilation during neonatal life and reduced arterial blood pressure levels in adulthood.

Keywords: caffeine; apnea; hypertension.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 PROPOSIÇÃO.....	10
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1 Hipertensão arterial.....	11
3.2 Controle da respiração, hipertensão arterial e mecanismos purinérgicos..	14
3.3 Cafeína, adenosina e irregularidades respiratórias.....	16
4 MATERIAL E MÉTODO.....	19
4.1 Animais.....	19
4.2 Avaliação da ventilação pulmonar.....	19
4.3 Avaliação da taxa metabólica.....	20
4.4 Avaliação dos parâmetros cardiovasculares.....	20
4.5 Protocolo experimental.....	21
4.6 Análise dos dados.....	21
5 RESULTADOS.....	23
5.1 Parâmetros ventilatórios em repouso dos animais.....	23
5.2 Efeitos da administração aguda de cafeína sobre a ventilação pulmonar de animais normotenso e hipertenso.....	25
5.3 Efeitos do tratamento crônico com cafeína sobre a ventilação pulmonar de animais normotenso e hipertenso.....	27
5.4 Efeitos do tratamento crônico com cafeína durante o período pós-natal sobre parâmetros cardiovasculares em animais adultos.....	28
6 DISCUSSÃO.....	30
7 CONCLUSÃO.....	33

REFERÊNCIAS.....	34
ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	39
ANEXO B – CERTIFICADO RELATÓRIO FINAL.....	40

1 INTRODUÇÃO

As disfunções no sistema cardiovascular representam um grave problema de saúde pública mundial. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as doenças cardiovasculares foram consideradas a principal causa de morte em 2019. A hipertensão arterial (HA) afeta aproximadamente um terço da população mundial adulta masculina e feminina¹ e representa um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e morte prematura. A etiologia da HA é multifatorial, podendo ser desencadeada por mecanismos genéticos, hábitos alimentares, inatividade física e tabagismo, ou ser secundária à presença de outras doenças como a obesidade e distúrbios metabólicos, disfunções vasculares, doenças renais ou distúrbios respiratórios durante o sono¹. Assim, os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da HA são complexos, e suas bases ainda não são completamente compreendidas.

Evidências clínicas e experimentais mostram uma associação entre o aumento da atividade simpática para os vasos sanguíneos e a manutenção da HA², indicando a existência de modificações e plasticidade no funcionamento do sistema nervoso simpático na fisiopatologia da HA. Estudos conduzidos em animais espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats*, SHR), um modelo experimental para a HA essencial, mostram que os níveis elevados da atividade simpática em animais SHR são observados desde a vida pós-natal (pelo menos a partir do dia pós-natal 9), antes do desenvolvimento da HA e precedendo alterações funcionais nos quimiorreceptores periféricos e barorreceptores arteriais³. Portanto, modificações ao nível do SNC parecem contribuir, de forma primária, para o desenvolvimento da hiperatividade simpática e disfunções cardiovasculares relacionadas à HA.

Fatores ambientais durante a vida intrauterina e neonatal são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da HA⁴. Durante a vida pós-natal, o SNC ainda passa por uma janela de amadurecimento, com alterações na morfologia neuronal, propriedades elétricas de membrana e consolidação de sinapses, culminando em modificações e consolidações nas funções cerebrais⁵. O desenvolvimento pós-natal é, em grande parte, determinado pelo aporte de nutrientes e oxigênio ao recém-nascido. Entre os tecidos do corpo, o SNC apresenta alta vulnerabilidade à redução da oferta de nutrientes e O₂ devido à sua elevada

demanda metabólica e ausência de reservas energéticas. Assim, o déficit metabólico durante a fase de amamentação está relacionado com o surgimento de alterações em funções cerebrais que permanecem até a vida adulta⁴. Dentre os insultos comumente observados durante a vida pós-natal pode-se mencionar a hipóxia intermitente. Tal condição é prevalente em bebês prematuros, devido aos episódios recorrentes de apneias deflagradas pela imaturidade e instabilidade do sistema respiratório⁶. Evidências experimentais mostram que a exposição à hipóxia intermitente durante os primeiros dias de vida pós-natal promove, na vida jovem/adulta, irregularidades respiratórias associadas ao desenvolvimento de níveis elevados da pressão arterial e hiperatividade simpática^{7,8}. Essas observações, portanto, indicam que a exposição à hipóxia intermitente pós-natal é um relevante fator de risco para o desenvolvimento de disfunções cardiorrespiratórias.

Em animais SHR adultos, é descrito a presença de irregularidades respiratórias associadas à ocorrência de episódios de apneia (pausas respiratórias), apesar dos valores médios da ventilação pulmonar serem semelhantes aos animais normotensos⁹. Tais observações experimentais se assemelham a estudos clínicos mostrando maior prevalência de apneias durante o sono em pacientes com HA essencial¹⁰. De forma interessante, as apneias observadas em ratos SHR não se mostraram secundárias ao desenvolvimento da HA⁹, sugerindo a presença de alterações inatas no funcionamento da rede neural respiratória. De fato, estudos recentes e ainda não publicados do nosso grupo mostram que animais SHR, durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal, apresentam irregularidades respiratórias e reduções na saturação de O₂ no sangue, confirmando tal possibilidade. Assim, a presença de episódios de apneias desde o nascimento pode promover a exposição à hipóxia durante o período crítico de desenvolvimento pós-natal, representando um fator adicional para o desenvolvimento da hiperatividade simpática.

A respiração é gerada por uma complexa e sofisticada rede neural localizada no tronco encefálico, sendo responsável por fornecer estímulos rítmicos para os neurônios motores presentes no bulbo e na medula espinhal, para, dessa forma, controlar a contração e o relaxamento dos músculos respiratórios¹¹. Dentro desta rede neural respiratória, há uma região considerada primordial para a gênese do ritmo respiratório – o complexo de pré-Bötzinger (preBötC). O preBötC está localizado bilateralmente na superfície ventral do bulbo e contém neurônios com

propriedades que os permitem gerar atividade rítmica de forma espontânea e com projeções para outros grupamentos respiratórios¹¹. Modificações na excitabilidade dos neurônios do preBötC causam alterações no ritmo respiratório, assim como a sua inibição leva a apneia. Um importante fator modulatório inibitório da atividade dos neurônios do preBötC é a adenosina. Em situações de hipóxia, a concentração de adenosina aumenta no SNC, causando uma redução generalizada da excitabilidade neuronal e uma diminuição metabólica adaptativa¹². No preBötC, a adenosina, ao ligar-se aos seus receptores do tipo A1, produz a hiperpolarização dos neurônios inspiratórios e redução da frequência respiratória¹³.

Estudos realizados em pacientes hipertensos e animais SHR indicam uma redução do lúmen da artéria vertebro-basilar, levando a uma condição de hipoperfusão central e hipóxia tecidual, apesar dos níveis normais de O₂ arterial¹⁴. O aumento da resistência da artéria vertebro-basilar é observado em animais SHR neonatos, indicando que o quadro de hipoperfusão/hipóxia central está presente desde o nascimento¹⁵. Nesse contexto de hipóxia central, é possível especular que em regiões do SNC de ratos SHR, especialmente no preBötC, há um acúmulo de adenosina, causando um desbalanço no controle da geração do ritmo respiratório e, assim, o surgimento de irregularidades respiratórias.

2 PROPOSIÇÃO

No presente projeto, avaliamos os efeitos do tratamento com cafeína (um antagonista de receptores para a adenosina) sobre as irregularidades respiratórias em animais SHR. A cafeína é uma abordagem farmacológica amplamente utilizada na clínica neonatal para diminuir ou abolir as irregularidades respiratórias em bebês prematuros. Nossa hipótese é de que a cafeína seria capaz de regularizar a respiração de animais SHR durante a vida pós-natal (por bloquear os efeitos inibitórios da adenosina), promovendo efeitos benéficos sobre os níveis de pressão arterial na vida adulta. Este estudo trouxe novas informações sobre o desenvolvimento da hiperatividade simpática e HA, uma vez que as irregularidades respiratórias / hipóxia intermitente durante o período pós-natal são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Para revisão de literatura, foram realizadas pesquisas de artigos referentes às palavras-chave no Pubmed e Google Acadêmico, entre 2000 e 2020.

3.1 Hipertensão Arterial

O fato da pressão arterial (PA) refletir o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica total, faz dessa variável um importante parâmetro de avaliação do sistema cardiovascular, permitindo estimar a sua funcionalidade e, conseqüentemente, o aporte de nutrientes para os diferentes tecidos do organismo. Mediante alterações comportamentais e modificações na demanda metabólica, é natural que ocorram oscilações transitórias na PA de um indivíduo saudável ao longo de 24 horas¹⁶. Nesse sentido, mecanismos reflexos promovem ajustes cardiovasculares imediatos a fim de garantir a manutenção dos níveis pressóricos dentro de uma faixa de normalidade (pressão sistólica normal-limítrofe: <130-139 mmHg, pressão diastólica normal-limítrofe: <85-89 mmHg) a maior parte do tempo¹⁶. Além dos ajustes instantâneos, o sistema cardiovascular dispõe de outros mecanismos regulatórios que atuam no controle a médio e longo prazo da PA². No entanto, quando os níveis pressóricos se elevam cronicamente a ponto de exceder a capacidade dos mecanismos fisiológicos de controlar a PA em repouso, instala-se uma condição patológica comum entre homens e mulheres denominada como hipertensão arterial (HA) (pressão sistólica: ≥ 140 mmHg, pressão diastólica: ≥ 90 mmHg)¹⁶. De acordo com as estimativas da organização mundial de saúde (OMS), em 2021 a HA afetava aproximadamente um terço da população global (aproximadamente 1,28 bilhões de pessoas), caracterizando um grave problema de saúde pública.

Dentre as múltiplas causas que ajudam a explicar essa elevada incidência sobre a população ao redor do mundo, estão os maus hábitos alimentares, o tabagismo, o sedentarismo, os fatores genéticos, as doenças renais, as alterações metabólicas e os distúrbios respiratórios durante o sono¹. No entanto, os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da HA são complexos, e a sua etiologia ainda não foi completamente elucidada. O reflexo desse desconhecimento pode ser evidenciado pela expressiva parcela de pacientes hipertensos que são

tratados com a combinação de dois ou mais fármacos anti-hipertensivos e, ainda assim, não obtêm êxito no controle dos níveis pressóricos em valores fisiológicos¹⁷. Portanto, fica evidente que existem lacunas na compreensão mais detalhada dos mecanismos fisiopatológicos associados à gênese da hipertensão, demandando novos estudos voltados para a investigação das condições que predisõem o indivíduo ao desenvolvimento dessa patologia. O fomento à produção de conhecimento nessa área é imprescindível para viabilizar o desenvolvimento e a implementação de novas abordagens terapêuticas e, assim, contribuir, futuramente, para escolhas mais assertivas e eficientes no tratamento farmacológico da hipertensão arterial.

Por meio de registros da atividade simpática e dosagens de noradrenalina plasmática, foi evidenciado em pacientes hipertensos e em modelos animais uma associação entre o aumento da atividade simpática para os vasos sanguíneos e a manutenção da HA^{2,3,18-20}. Essas observações indicam a existência de modificações e plasticidade no funcionamento do sistema nervoso simpático na fisiopatologia da HA. Estudos recentes conduzidos em animais espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats*, SHR), um modelo experimental para a HA essencial, sugerem que a hiperatividade do sistema nervoso simpático e manutenção dos níveis elevados da pressão arterial estão associadas ao aumento da atividade aferente proveniente dos corpúsculos carotídeos para o sistema nervoso central (SNC)^{21,22}. Ainda que esses estudos experimentais fomentem a discussão sobre o uso de intervenções farmacológicas e cirúrgicas que inibam a atividade dos corpúsculos carotídeos em pacientes com hipertensão resistente²³⁻²⁵, a desnervação dos corpúsculos carotídeos em animais SHR, e em outros modelos experimentais da HA, não promove a normalização da pressão arterial e da atividade simpática^{20,26,27}, indicando a participação de outros mecanismos. É relatado que os níveis elevados da atividade simpática em animais SH são observados desde a vida pós-natal (pelo menos a partir do dia pós-natal 9), antes do desenvolvimento da HA e precedendo alterações funcionais nos quimiorreceptores periféricos e barorreceptores arteriais³. Portanto, modificações ao nível do SNC parecem contribuir, de forma primária, para o desenvolvimento da hiperatividade simpática e disfunções cardiovasculares relacionadas à HA.

Fatores ambientais durante a vida intrauterina e neonatal são também considerados fatores de risco para o desenvolvimento da HA⁴. Durante a vida

pós-natal, o SNC ainda passa por uma janela de amadurecimento, com alterações na morfologia neuronal, propriedades elétricas de membrana e consolidação de sinapses, culminando em modificações e consolidações nas funções cerebrais^{5,28}. O desenvolvimento pós-natal é, em grande parte, determinado pelo aporte de nutrientes e oxigênio ao recém-nascido. Entre os tecidos do corpo, o SNC apresenta alta vulnerabilidade à redução da oferta de nutrientes e O₂ devido à sua elevada demanda metabólica e ausência de reservas energéticas²⁹. Assim, o déficit metabólico durante a fase de amamentação está relacionado com o surgimento de alterações em funções cerebrais que permanecem até a vida adulta^{4,30}. Dentre os insultos comumente observados durante a vida pós-natal pode-se mencionar a hipóxia intermitente. Tal condição é prevalente em bebês prematuros, devido aos episódios recorrentes de apneias deflagradas pela imaturidade e instabilidade do sistema respiratório⁶. Evidências experimentais obtidas por nosso grupo de pesquisa e em outros laboratórios mostram que a exposição à hipóxia intermitente durante os primeiros dias de vida pós-natal promove, na vida jovem/adulta, irregularidades respiratórias associadas ao desenvolvimento de níveis elevados da pressão arterial e hiperatividade simpática^{7,8}. Essas observações, portanto, indicam que a exposição à hipóxia intermitente pós-natal é um relevante fator de risco para o desenvolvimento de disfunções cardiorrespiratórias.

Em animais SHR adultos, é descrito a presença de irregularidades respiratórias associadas à ocorrência de episódios de apneia (pausas respiratórias), apesar dos valores médios da ventilação pulmonar serem semelhantes aos animais normotensos^{9,31,32}. Tais observações experimentais se assemelham a estudos clínicos mostrando maior prevalência de apneias durante o sono em pacientes com HA essencial^{10,33,34}. De forma interessante, as apneias observadas em ratos SHR não se mostraram secundárias ao desenvolvimento da HA⁹, sugerindo a presença de alterações inatas no funcionamento da rede neural respiratória. Até o presente momento, não há estudos investigando se as irregularidades respiratórias em animais SHR estão presentes desde o nascimento ou se surgem ao longo do desenvolvimento. A elucidação desse questionamento é relevante se considerarmos que a presença de episódios de apneias desde o nascimento pode promover a exposição à hipóxia intermitente durante o período crítico de desenvolvimento pós-natal, representando um fator adicional para o desenvolvimento da hiperatividade simpática.

3.2 Controle da respiração, hipertensão arterial e mecanismos purinérgicos

A respiração é gerada por uma complexa e sofisticada rede neural localizada no tronco encefálico³⁵, sendo responsável por fornecer estímulos rítmicos para os neurônios motores presentes no bulbo e na medula espinhal, para, dessa forma, controlar a contração e o relaxamento dos músculos respiratórios¹¹. Dentro desta rede neural respiratória, há uma região considerada primordial para a gênese do ritmo respiratório – o complexo de pré-Bötzinger (preBötC)³⁶. O preBötC está localizado bilateralmente na superfície ventral do bulbo e contém neurônios que apresentam atividade rítmica em fase com a inspiração. Os neurônios do preBötC formam um microcircuito, com propriedades que os permitem gerar atividade rítmica de forma espontânea, mesmo em condições isoladas *in vitro*, e com projeções para outros grupamentos respiratórios (incluindo o preBötC contralateral para sincronização dos neurônios inspiratórios)^{37,38}. Modificações na excitabilidade dos neurônios do preBötC causam alterações no ritmo respiratório, assim como a sua inibição leva a apneia³⁹. Portanto, é reconhecido que o preBötC apresenta função central na geração da respiração. No contexto da HA, estudos *in situ* mostram que uma subpopulação de neurônios inspiratórios do preBötC de ratos SHR jovens (ainda não hipertensos) apresentam maior excitabilidade devido a uma redução na condutância da membrana aos íons K^{+40} . Ainda que estes e outros autores tenham associado às alterações na excitabilidade dos neurônios do preBötC com modificações no acoplamento simpático-respiratório^{40,41}, tais evidências sugerem que o controle da atividade ritmogênica no preBötC esteja alterado em animais hipertensos, contribuindo para o surgimento de episódios de apneia – uma possibilidade ainda não investigada.

Além dos neurônios inspiratórios, a região do preBötC contém astrócitos capazes de detectar reduções no O_2 no parênquima cerebral⁴². Em situações de diminuição da disponibilidade de O_2 (p.ex., condições de hipóxia), os quimiorreceptores periféricos respondem rapidamente às reduções na pressão parcial arterial de O_2 (PaO_2) e enviam sinais excitatórios para o SNC para promover respostas de aumento da ventilação e débito cardíaco, redistribuição do fluxo sanguíneo e ajustes metabólicos^{43,45}. Por outro lado, se a condição de hipóxia persistir, poderá ocorrer uma redução generalizada da excitabilidade do SNC, em parte devido ao acúmulo de transmissores inibitórios (p. ex., adenosina), que produz

uma diminuição metabólica adaptativa neuronal para, presumivelmente, aumentar a capacidade do cérebro de sobreviver a períodos de oferta reduzida de O_2 ^{12,46,47}. No entanto, em algumas áreas do SNC, como no preBötC, a hipóxia tecidual promove a ativação de astrócitos sensíveis aos níveis de O_2 tecidual, por meio de um mecanismo mitocondrial, ativação da fosfolipase C e aumento do Ca^{2+} intracelular, causando a liberação de ATP por exocitose^{42,48}. Esse ATP, por sua vez, promove a estimulação dos neurônios do preBötC, via ativação de receptores purinérgicos do tipo P2Y1, de forma a compensar a depressão induzida pela hipóxia e manter a atividade dos neurônios inspiratórios⁴⁸. Além da condição de hipóxia sistêmica, o mecanismo astrócitos-purinas-neurônios da superfície ventral do bulbo parece também ser relevante em monitorar O_2 cerebral, de forma independente do O_2 arterial, e promover ajustes cardiorrespiratórios reflexos em situações como a redução do fluxo sanguíneo cerebral⁴⁹.

Estudos anatômicos e funcionais realizados em pacientes hipertensos e animais SHR indicam uma redução do lúmen da artéria vertebro-basilar, levando a uma condição de hipoperfusão central e hipóxia tecidual, apesar dos níveis normais de O_2 no sangue arterial^{14,15,50}. Em ratos SHR, medidas da PO_2 tecidual e marcadores teciduais de hipóxia confirmam que os níveis de O_2 no parênquima do tronco encefálico se encontram reduzidos em relação aos animais normotensos^{51,52}. O aumento da resistência da artéria vertebro-basilar é observado em animais SH neonatos, indicando que a hipoperfusão/hipóxia do tronco encefálico está presente desde o nascimento^{15,53}. Nesse sentido, é possível especular que os mecanismos de ativação dos astrócitos sensíveis à hipóxia e a modulação purinérgica sobre os neurônios do preBötC, os quais já se encontram funcionais ao nascimento⁵⁴, estejam hiperativos e/ou sensibilizados em animais SH. O recrutamento desse mecanismo excitatório, associado ao acúmulo de fatores inibitórios gerados pela hipóxia tecidual (p. ex., a adenosina, derivada da quebra do ATP¹², poderá gerar um desbalanço entre a excitação e inibição dos neurônios ritmogênicos do preBötC, promovendo períodos de irregularidades do automatismo respiratório em animais hipertensos.

3.3 Cafeína, adenosina e irregularidades respiratórias

Como descrito anteriormente, no tronco encefálico, existe uma região responsável pela respiração, denominada complexo pré-Bötzinger (preBötC), que contém neurônios responsáveis pelo controle do ritmo respiratório. A atividade oscilatória dessa região se dá por uma complexa rede constituída por células da glia, especialmente astrócitos, e neurônios responsáveis por gerar e modular a atividade espontânea, mesmo quando isolados *in vitro*^{11,36}. Levando isso em consideração, em situações de estresse metabólico, como visto durante a exposição à hipóxia e isquemia, astrócitos da região do preBötC liberam o gliotransmissor ATP que atua diretamente nos receptores purinérgicos P2 (principalmente P2Y1) expressos em neurônios do preBötC, aumentando, assim, sua excitabilidade e estimulando a frequência respiratória. Ao mesmo tempo, o ATP liberado pelos astrócitos é degradado em adenosina, a qual vai também atuar em receptores A1 dos neurônios do preBötC, promovendo a hiperpolarização dos neurônios inspiratórios e redução da frequência respiratória¹². Portanto, em uma situação de estresse metabólico prolongado, ocorre o acúmulo de adenosina em regiões que controlam a respiração, promovendo uma depressão adaptativa da ventilação. Dessa forma, sugere-se que a adenosina, em situações de hipóxia, seja um sinalizador extracelular capaz de modular a excitabilidade neuronal e regular a homeostase cerebral. Isso significa que, em condições normais, sua concentração extracelular é baixa, exercendo apenas um papel modulador tônico. Porém, durante a exposição à hipóxia, a degradação do ATP extracelular leva ao acúmulo de adenosina, que exerce efeito inibitório predominante sobre os neurônios inspiratórios¹². Essa resposta inibitória é considerada adaptativa, pois reduz o consumo energético dos neurônios em condições críticas, mas, em excesso, pode levar à instabilidade respiratória e apneia^{12,48}.

Essa situação de hipóxia tecidual crônica, especialmente no sistema nervoso central, pode ser observada em modelos experimentais patológicos, como nos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) – modelo experimental da hipertensão essencial. É descrito que esses animais, de forma semelhante aos pacientes com hipertensão neurogênica, apresentam hipoperfusão cerebral^{50,55}. Nos animais SHR,

o quadro de hipoperfusão cerebral é observado desde o período neonatal, o que favorece um estado de hipóxia central persistente ao longo do desenvolvimento⁵⁰. Nesse cenário, é possível especular que a concentração de adenosina no SNC, especialmente no preBötC, esteja elevada, acarretando a ativação dos receptores A1 e comprometendo a estabilidade do ritmo respiratório, com o surgimento de instabilidades respiratórias e períodos de apneia.

Um cenário semelhante pode ser observado em bebês prematuros que apresentam episódios recorrentes e espontâneos de apneia. Essa condição, chamada de apneia da prematuridade (AP), é definida como pausas respiratórias superiores a 20 segundos, ou menores quando associadas a bradicardia e dessaturação de oxigênio⁵. As causas que levam ao surgimento da AP não são completamente elucidadas, mas estão associadas a uma imaturidade da rede neural respiratória, baixa excitabilidade dos neurônios motores e maior complacência do sistema respiratório, especialmente das vias aéreas superiores, que, coletivamente, favorecem o surgimento de episódios de apneia⁵⁶.

A primeira opção de tratamento para a AP é a pressão positiva de ar (ou CPAP), que visa promover a estabilidade mecânica do sistema respiratório. Contudo, há evidências de que o tratamento com a cafeína é uma eficaz abordagem farmacológica para reduzir ou prevenir os episódios de apneia em bebês prematuros⁵⁷. A cafeína é um antagonista não seletivo dos receptores A1 e A2 para adenosina. No sistema respiratório, a cafeína atua sobre neurônios que controlam o ritmo e padrão respiratórios, modulando a excitabilidade neuronal e a estabilidade do ritmo respiratório⁵⁸. Como já mencionado anteriormente, em prematuros, a imaturidade do preBötC e o desequilíbrio entre neurônios excitatórios e inibitórios podem gerar instabilidade respiratória e episódios de apneia, sendo assim, o antagonismo da cafeína sobre os receptores de adenosina reduz o efeito inibitório da adenosina A1 sobre os neurônios excitadores do preBötC, aumentando a frequência respiratória e promovendo a regularidade do ritmo respiratório^{39,58}.

A cafeína é um alcalóide metilxantínico amplamente conhecido por suas propriedades estimulantes do sistema nervoso central. Em neonatologia, seu uso se destaca no tratamento da apneia da prematuridade. Montandon, Bairam⁵⁸ demonstraram em ratos neonatos que a administração de cafeína aumenta significativamente a frequência respiratória e reduz episódios de apneia. Estudos adicionais mostram que a cafeína melhora a estabilidade do ritmo respiratório em

condições de hipóxia intermitente, modulando tanto a atividade dos neurônios do preBötC quanto os circuitos purinérgicos associados, por isso, ela é comumente utilizada na prática clínica para melhorar a irregularidade respiratória. Ademais, evidências experimentais que avaliaram o efeito agudo, observaram que a cafeína aumenta rapidamente a frequência respiratória, reduzindo episódios de apneia em recém-nascidos e neonatos. Esse efeito ocorre principalmente pela ativação imediata de neurônios excitatórios do preBötC e pelo bloqueio do efeito depressor da adenosina¹². Já achados que avaliaram os efeitos crônicos, observaram que a cafeína promove ajustes funcionais na plasticidade neuronal, melhorando a resposta ventilatória a longo prazo^{54,58}.

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados animais normotensos (Holtzman) e espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats*, SHR) neonatos (P0-7) de ambos os sexos, provenientes do biotério do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAR), UNESP, Araraquara.

4.1 Animais

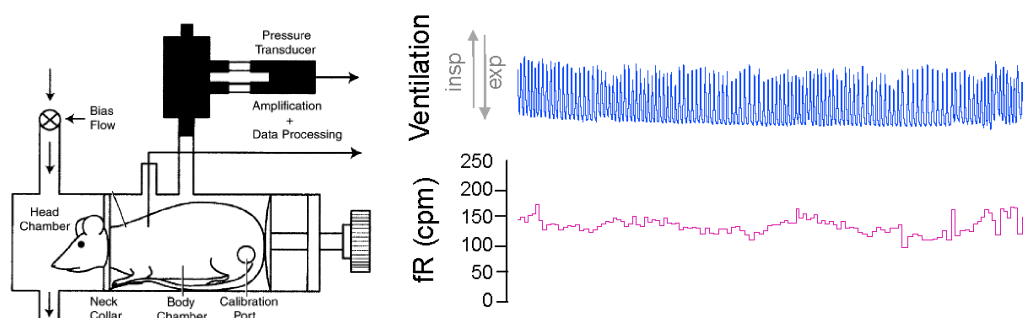
Os animais foram alojados em gaiolas coletivas com livre acesso a ração e água, sob condições controladas de temperatura ($22\pm1^{\circ}\text{C}$), umidade (50-60%) e ciclo claro/escuro (12:12 luzes acesas às 07:00 am). Os procedimentos experimentais deste projeto estavam de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, publicado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal da FOAR/UNESP (CEUA 02/2023). Todas as medidas foram tomadas para evitar a dor e o sofrimento dos animais e minimizar o número de animais utilizados.

4.2 Avaliação da ventilação pulmonar

A avaliação da ventilação pulmonar em animais neonatos foi realizada pelo método de *head-out plethysmography*⁵⁹. Para tanto, os animais foram acomodados em uma câmara cilíndrica de acrílico com volume ajustável (50-150 mL). Essa câmara apresentava uma segunda câmara (20 mL) em uma das extremidades, separadas por uma barragem de borracha (*dental dam*). Essa barragem apresentava um orifício ajustável, no qual é posicionada a cabeça do animal, permitindo o isolamento da cabeça do resto do corpo em câmaras separadas (*head chamber* e *body chamber*, respectivamente, Figura 1). Para as medidas da ventilação, um transdutor diferencial de pressão (Spirometer, ADInstruments, Australia) foi conectado à câmara maior (*body chamber*), o qual detectava as oscilações de pressão associadas aos movimentos respiratórios (caixa torácica). Os sinais foram captados por um sistema de aquisição (PowerLab System,

ADInstruments; frequência de amostragem: 1 KHz) conectado a um computador equipado com software apropriado (LabChart Software, ADInstruments, Australia). A amplitude das oscilações eram proporcionais ao volume corrente (V_T) que foi calculado considerando o volume de calibração (0,2 mL, injetado na câmara no início de cada experimento) e o peso do animal (expresso em mL/kg). A frequência respiratória (fR, expressa em ciclos por minuto, cpm) foi estimada a partir do intervalo de tempo entre os picos das oscilações respiratórias. A ventilação minuto (V_E , mL/kg/min) foi obtida a partir da multiplicação do V_T e fR. Durante os experimentos, a câmara menor (*head chamber*) foi continuamente ventilada com ar ambiente. Além disso, a câmara pletismográfica foi mantida aquecida durante os experimentos (30-33°C) para manter a temperatura corporal dos animais neonatos.

Figura 1 - Esquema ilustrando a câmara de pletismografia (imagem à direita) utilizada para os registros da ventilação (imagem à esquerda) em animais neonatos



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

4.3 Avaliação da taxa metabólica

Junto com a medida da ventilação pulmonar, o consumo de oxigênio (VO_2) foi avaliado para inferir sobre a taxa metabólica dos animais. As análises de VO_2 foram realizadas a partir das diferenças entre as medidas do O_2 e CO_2 inspirado e expirado (*flow-through respirometry*), conforme descrito anteriormente⁶⁰.

4.4 Avaliação dos parâmetros cardiovasculares

Para análise da pressão arterial e frequência cardíaca de repouso, os animais adultos foram anestesiados com uma mistura de cetamina (50 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e um cateter de polietileno (PE-50 soldado a um PE-10) foi inserido na artéria femoral e, posteriormente, exteriorizado na região interescapular para registro

da pressão arterial e administração de drogas. Vinte e quatro horas após os procedimentos cirúrgicos, quando os animais já se encontravam livres dos efeitos da anestesia, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um amplificador e um sistema de aquisição de dados (Powerlab, ADInstruments, Austrália). Os sinais da pressão arterial pulsátil (PAP) foram então continuamente registrados (2 kHz) em um microcomputador equipado com o sistema de aquisição de dados LabChart 8 (ADInstruments). A partir dos sinais da PAP, foram calculados os valores da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados por overdose de anestésico.

4.5 Protocolo experimental

Tratamento agudo: os parâmetros ventilatórios de animais NT e SHR neonatos (P0-6) foram avaliados antes e durante 30 min após a administração intraperitoneal (i.p.) de cafeína (15 mg/kg) (58). Um grupo separado de animais NT recebeu injeções (i.p.) de veículo (salina).

Tratamento crônico: Dentro das primeiras 12 h após o nascimento, a ventilação de repouso dos animais NT e SHR recém-nascidos foi avaliada. Na sequência, os animais deram início ao tratamento diário com cafeína (15 mg/kg, s.c.), que perdurou até o 15º dia de vida. As injeções foram realizadas, aproximadamente, no mesmo horário. Uma nova avaliação da ventilação foi realizada na idade P8, ou seja, após 7 dias de tratamento com cafeína. Grupos separados de animais NT e SHR receberam injeções de veículo (NaCl 0,9%, s.c.) durante o mesmo período, ou seja, de P0 a P15. Após o período de tratamento com cafeína ou veículo, os animais foram mantidos no biotério até a vida adulta (P80-90) para a avaliação dos níveis da pressão arterial e frequência cardíaca.

4.6 Análise dos dados

Os registros foram analisados *offline* utilizando o software LabChart (ADInstruments). Os parâmetros respiratórios e metabólicos foram quantificados a partir da média dos valores obtidos durante o período em repouso, e expressos em unidades absolutas. As alterações na ventilação em resposta a administração aguda de cafeína foram avaliadas por meio da comparação entre os valores na condição controle (antes da injeção) e durante os efeitos da cafeína (tomados com a média

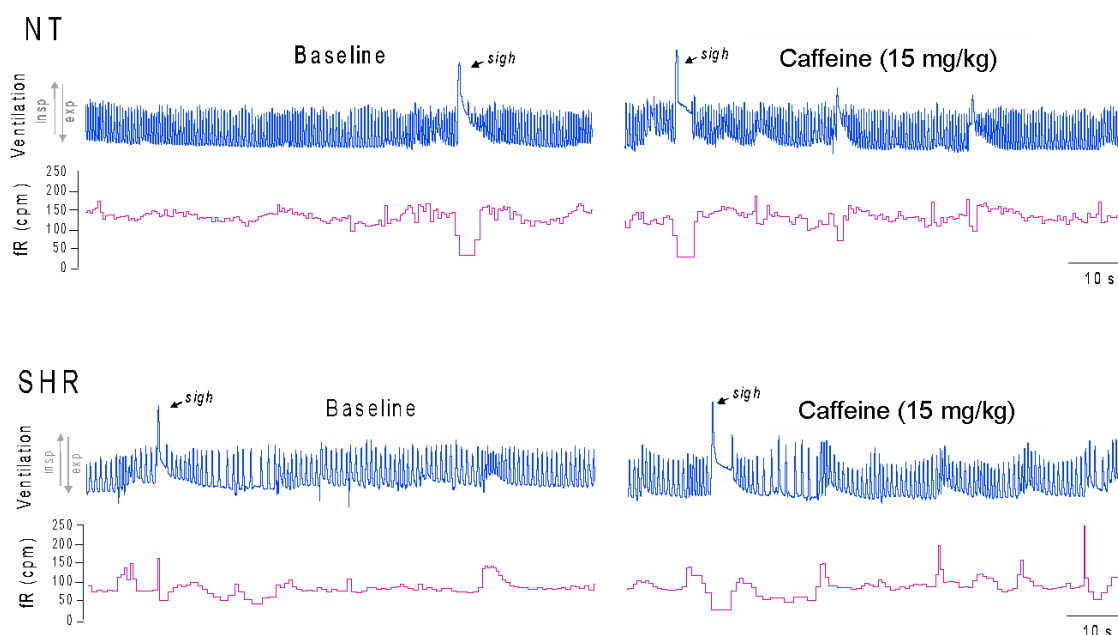
dos valores entre os minutos 15 e 30 após a injeção). As alterações nos parâmetros respiratórios de animais tratados cronicamente com cafeína foram avaliadas comparando com os valores de animais que receberam injeções de veículo. Os dados médios são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. A distribuição normal dos dados foi confirmada usando o teste de Shapiro-Wilk. Para o tratamento agudo, os resultados foram comparados utilizando teste *t*-Student pareado (para avaliação dos efeitos da cafeína no mesmo grupo experimental) e não pareado (para comparações entre os grupos NT e SHR). Para o tratamento crônico, os resultados foram comparados utilizando o *one-way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. As operações estatísticas e gráficas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (Versão 8.3, GraphPad Software Inc.), considerando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Em ambos os grupos experimentais, a administração diária de cafeína (15 mg/kg, s.c.) durante os primeiros 7 dias de vida pós-natal não modificou a ventilação pulmonar de repouso dos grupos NT (n=6) e SHR (n=5), quando comparado com seus respectivos grupos NT (n=5) e SHR (n=6) tratados com veículo (Figura 6A). Contudo, nos animais NT, foi observado que o tratamento crônico com cafeína causou um aumento da frequência respiratória, sem modificações no volume corrente (Figuras 6B e C). Por outro lado, no grupo SHR, a administração de cafeína por 7 dias promoveu um aumento significativo do volume corrente, sem modificações na frequência respiratória (Figuras 6 B e C). Tais resultados estão descritos na tabela 1.

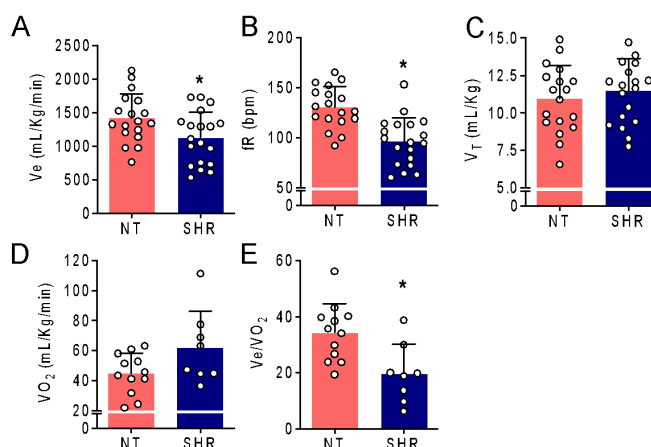
5.1 Parâmetros ventilatórios em repouso dos animais

A figura 2 contém registros da ventilação pulmonar de um animal (NT) e um animal (SHR) neonatos, representativos dos seus respectivos grupos. Nos painéis à esquerda, é possível notar a presença de irregularidades respiratórias nos animais neonatos SHR em condições de repouso. Tais irregularidades foram caracterizadas pela presença de períodos de respiração rápida e episódios de apneia, acompanhados por oscilações nos esforços inspiratórios e expiratórios. Em repouso, os animais SHR (n=18) apresentaram, em relação aos animais do grupo NT (n=18), uma redução da ventilação pulmonar (1418 ± 366 vs 1121 ± 390 ml/min/kg, $P=0,0229$, Fig. 3A) associado a uma menor frequência respiratória (130 ± 21 vs 96 ± 24 bpm, $P<0,0001$, Fig. 3B), sem alterações nos valores médios do volume corrente ($10,9 \pm 2,2$ vs $11,5 \pm 2,1$ ml/kg, $P=0,4434$, Fig. 3C). Em relação a taxa metabólica, não foi verificada diferença entre os grupos ($44,64 \pm 13,54$ vs $61,71 \pm 24,45$ ml/kg/min, $P=0,0844$, Fig. 3D). Contudo, ao relacionar a respectiva ventilação pulmonar com a taxa metabólica (V_e/VO_2), notamos menores valores nos animais SHR em relação aos NT ($31,6 \pm 8,4$ vs $19,6 \pm 10,6$; $P=0,0202$, Fig. 3E), indicando que os animais SHR encontravam-se em hipoventilação.

Figura 2 - Registros da ventilação e da frequência respiratória (fR)

Registros da ventilação (*ventilation*) e da frequência respiratória (fR) de um animal normotenso (NT) e um animal espontaneamente hipertenso (SHR) neonato em condições de repouso (lado esquerdo) ou após a injeção i.p. de cafeína (15 mg/kg). No registro NT, é possível notar suspiros (*sigh*), porém a respiração encontra-se relativamente estável. No registro SHR, é possível detectar vários eventos de irregularidades respiratória, com aumentos e reduções da fR.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 3 – Valores médios da frequência respiratória (fR, A), volume corrente (V_T , B), ventilação minuto (V_e , C), consumo de oxigênio (VO_2 , D) e equivalente respiratório (V_e/VO_2 , E)

Valores médios da frequência respiratória (fR, A), volume corrente (V_T , B), ventilação minuto (V_e , C), consumo de oxigênio (VO_2 , D) e equivalente respiratório (V_e/VO_2 , E) de animais NT (n= 9) e SHR (n= 8) neonatos (P0-7) em condições de repouso. * - diferente em relação ao grupo NT, $P < 0,05$.

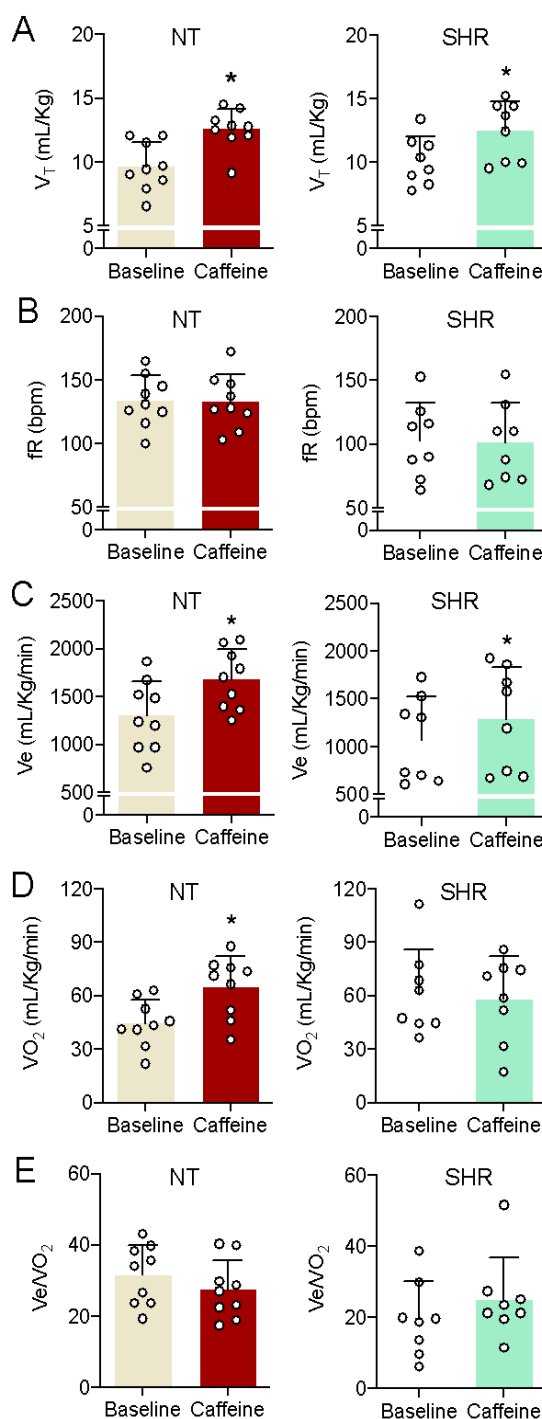
Fonte: Arquivo pessoal da autora.

5.2 Efeitos da administração aguda de cafeína sobre a ventilação pulmonar de animais normotenso e hipertenso

Nos animais do grupo NT (n=9), a injeção de cafeína (15 mg/kg, i.p.) causou aumentos no volume corrente ($9,7 \pm 1,9$ vs $12,6 \pm 1,6$ ml/kg, $P=0,0042$, Fig. 4A) e ventilação minuto (1301 ± 366 vs 1681 ± 313 ml/min/kg, $P=0,0153$, Fig. 4C), sem alterar a frequência respiratória (134 ± 20 vs 133 ± 21 bpm, $P=0,9127$, Fig. 4B). Além disso, os animais NT apresentaram um aumento do consumo de oxigênio ($44,65 \pm 13,14$ vs $65,06 \pm 17,02$ ml/min/kg, $P=0,0350$, Fig. 4D) sem alterações no equivalente respiratório ($31,6 \pm 8,4$ vs $27,5 \pm 8,2$, $P=0,3535$, Fig. 4E). Animais NT que receberam injeções de veículo (n=3) não apresentaram alterações nos parâmetros avaliados (dados não mostrados).

Em relação os animais do grupo SHR (n=8), a injeção de cafeína (15 mg/kg, i.p.) também causou aumentos no volume corrente ($10,1 \pm 1,9$ vs $12,4 \pm 2,3$ ml/kg, $P=0,0026$, Fig. 4A) e ventilação minuto (1073 ± 451 vs 1291 ± 534 ml/min/kg, $P=0,0246$, Fig. 4C), sem alterar a frequência respiratória (103 ± 30 vs 101 ± 31 bpm, $P=0,7049$, Fig. 4B). Diferentemente dos animais NT, o consumo de oxigênio nos animais SHR não se alterou após a injeções de cafeína ($61,71 \pm 24,45$ vs $58,21 \pm 23,68$ ml/min/kg, $P=0,7272$, Fig. 4D). Da mesma forma, não foram observadas modificações no equivalente respiratório dos animais SHR após a administração de cafeína ($19,6 \pm 10,6$ vs $25,2 \pm 11,7$, $P=0,2679$, Fig. 4E).

Figura 4 – Valores médios do volume corrente (V_T , A), frequência respiratória (fR, B), ventilação minuto (Ve, C), consumo de oxigênio (VO_2 , D) e equivalente respiratório (Ve/VO_2 , E)



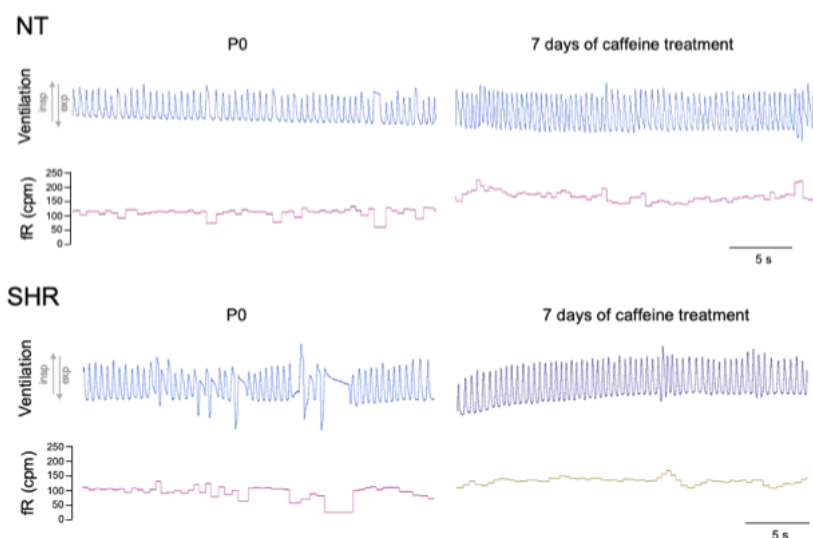
Valores médios do volume corrente (V_T , A), frequência respiratória (fR, B), ventilação minuto (Ve, C), consumo de oxigênio (VO_2 , D) e equivalente respiratório (Ve/VO_2 , E) de animais NT (n= 9) e SHR (n= 8) neonatos (P0-7) antes (*Baseline*) após a injeção de cafeína (20 mg/kg, i.p., *Caffeine*). * - diferente em relação aos respectivos valores antes da injeção de cafeína, P<0,05.

Fonte: arquivo pessoal da autora.

5.3 Efeitos do tratamento crônico com cafeína sobre a ventilação pulmonar de animais normotenso e hipertenso

A figura 5 contém traçados da ventilação pulmonar de animais NT e SHR neonatos, representativos do grupo, ilustrando os efeitos do tratamento com cafeína (15 mg/kg, s.c.) durante os primeiros 7 dias de vida pós-natal (de P0 à P7).

Figura 5. Registros da ventilação (*ventilation*) e da frequência respiratória



Registros da ventilação (*ventilation*) e da frequência respiratória (fR) de um animal normotenso (NT) e um animal espontaneamente hipertenso (SHR) recém-nascido (P0) e após 7 dias de tratamento diário com cafeína (15 mg/kg, s.c.).

Fonte: arquivo pessoal da autora.

Em ambos os grupos experimentais, a administração diária de cafeína (15 mg/kg, s.c.) durante os primeiros 7 dias de vida pós-natal não modificou a ventilação pulmonar de repouso dos grupos NT (n=6) e SHR (n=5), quando comparado com seus respectivos grupos NT (n=5) e SHR (n=6) tratados com veículo (Figura 6A). Contudo, nos animais NT, foi observado que o tratamento crônico com cafeína causou um aumento da frequência respiratória, sem modificações no volume corrente (Figuras 6B e C). Por outro lado, no grupo SHR, a administração de cafeína por 7 dias promoveu um aumento significativo do volume corrente, sem modificações na frequência respiratória (Figuras 6 B e C). Tais resultados estão descritos na tabela 1.

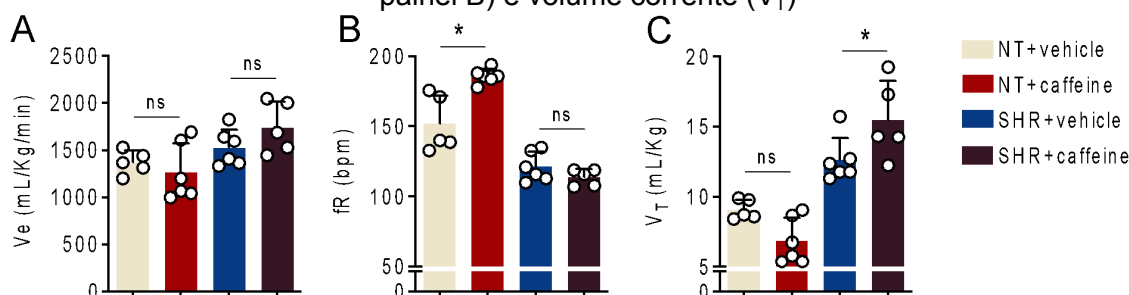
Tabela 1. Valores médios da ventilação pulmonar (V_e), frequência respiratória (fR) e volume corrente (V_T)

Z	NT + vehicle (n=5)	NT + caffeine (n=6)	p	SHR + vehicle (n=6)	SHR + caffeine (n=5)	p
V_e (ml/min/kg)	1372±126	1271±305	0.7382	1528±192	1744±273	0.2778
fR (bpm)	152±20	186±5 *	0.0003	121±10	114±6	0.5978
V_T (ml/kg)	9.1±0.7	6.8±1.6	0.1130	12.6±1.6	15.5±2.8 *	0.0366

Valores médios da ventilação pulmonar (V_e), frequência respiratória (fR) e volume corrente (V_T) de animais normotensos (NT) e espontaneamente hipertensos (SHR) tratados com veículo (Vehicle, NaCl 0,9%) ou cafeína (caffeine, 15 mg/kg, s.c.) durante os primeiros 7 dias de vida pós-natal. * - diferente entre respectivos grupos veículo e cafeína.

Fonte: arquivo pessoal da autora;

Figura 6. Valores médios da ventilação pulmonar (V_e , painel A), frequência respiratória (fR, painel B) e volume corrente (V_T)



Valores médios da ventilação pulmonar (V_e , painel A), frequência respiratória (fR, painel B) e volume corrente (V_T) de animais normotensos (NT, n=5-6) e espontaneamente hipertensos (SHR, n=5-6) tratados com veículo (Vehicle, NaCl 0,9%) ou cafeína (caffeine, 15 mg/kg, s.c.) durante os primeiros 7 dias de vida pós-natal. * - diferente entre respectivos grupos veículo e cafeína, $P < 0,05$.

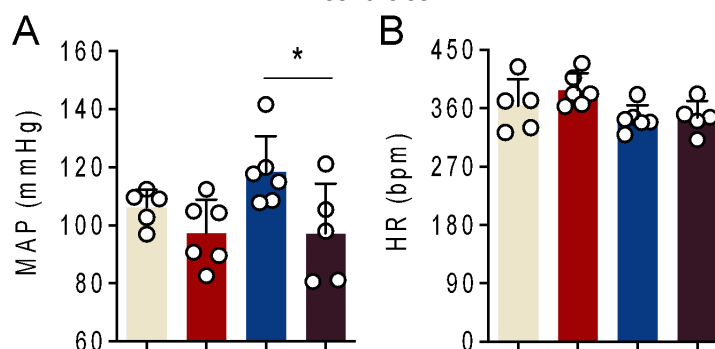
Fonte: arquivo pessoal da autora;

5.4 Efeitos do tratamento crônico com cafeína durante o período pós-natal sobre parâmetros cardiovasculares em animais adultos.

Os animais NT tratados com cafeína (n=6) durante os primeiros 15 dias de vida (de P0 à P15) apresentaram níveis semelhantes de pressão arterial média (106±6 vs 97±11 mmHg, $P = 0,5140$, Figura 7A) e frequência cardíaca (363±41 vs 389±25 bpm, $P = 0,3094$, Figura 7B) em relação aos animais NT tratados com veículo (n=5). Nos animais SHR adultos, o tratamento com cafeína durante o período pós-natal (n=5) promoveu uma redução dos níveis de pressão arterial média

(118 ± 12 vs 97 ± 17 mmHg, $P=0,0221$, Figura 7A), sem modificar a frequência cardíaca (344 ± 20 vs 346 ± 25 bpm, $P=0,9941$, Figura 7B), quando comparado com o tratamento com veículo ($n=6$).

Figura 7. Valores médios da pressão arterial média (MAP, painel A) e da frequência cardíaca



Valores médios da pressão arterial média (MAP, painel A) e da frequência cardíaca (HR, painel B) de animais normotensos (NT, $n=5-6$) e espontaneamente hipertensos (SHR, $n=5-6$) tratados com veículo (Vehicle, NaCl 0,9%) ou cafeína (caffeine, 15 mg/kg, s.c.) durante os primeiros 7 dias de vida pós-natal. * - diferente entre respectivos grupos veículo e cafeína, $P<0,05$.

Fonte: arquivo pessoal da autora.

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que em condições de repouso, os animais SHR, até a primeira semana de vida, apresentaram um quadro de hipoventilação, a qual parece ser decorrente de uma menor frequência respiratória e a presença de irregularidades respiratórias. As irregularidades se apresentaram como respirações episódicas, ou seja, oscilações entre aumentos e redução da frequência e esforço respiratórios. O quadro de hipoventilação indica que os animais SHR neonatos respiram abaixo da demanda metabólica basal, sugerindo que esses animais possam apresentar hipoxemia. Tais observações são inéditas na literatura e podem representar novos direcionamentos no entendimento da gênese da hipertensão arterial.

Embora exista uma grande prevalência de indivíduos hipertensos no mundo, a gênese da hipertensão ainda não está totalmente compreendida. Entre as descobertas até o presente momento, já foi estabelecida a relação entre a existência de modificações e plasticidade no funcionamento do sistema nervoso simpático, geração da hiperatividade simpática e o desenvolvimento da HA¹⁸. Estudos recentes conduzidos em animais SHR, mostraram que os maiores níveis do simpático estão relacionados com aumento da atividade aferente dos corpúsculos carotídeos (uma estrutura localizada na bifurcação da carótida comum e que tem como função na quimiorrecepção ao oxigênio)²². Contudo, a desnervação dos corpúsculos carotídeos em animais SHR, e em outros modelos experimentais da HA, não promove a normalização da pressão arterial e da atividade simpática, indicando que há a participação de outros mecanismos^{26,61}. É relatado que os níveis elevados da atividade simpática em animais SH são observados antes do desenvolvimento da HA, precedendo alterações funcionais nos quimiorreceptores periféricos e barorreceptores arteriais³. Nessa perspectiva, os resultados obtidos neste estudo mostram que os animais SHR apresentaram, nos primeiros dias após o nascimento, um estado de hipoventilação – situação que pode gerar um quadro de hipoxemia. Em estudos prévios do laboratório, demonstramos que animais normotensos submetidos à hipóxia intermitente pós-natal apresentaram hiperatividade simpática e níveis elevados da pressão arterial na vida adulta⁶². Assim, as irregularidades respiratórias e hipoventilação dos animais SHR neonatos podem ser considerado

como um fator de risco para o desenvolvimento de disfunções autonômicas e hipertensão arterial na vida adulta.

Considerando que os animais SHR não apresentaram alterações no consumo de O_2 em repouso, é possível indicar que as modificações respiratórias não dependam de modificações na taxa metabólica. Ademais, o fato de evidências mostrarem que os mecanismos relacionados à sensibilidade ao O_2 nos corpúsculos carotídeos em ratos (principal sensor de O_2 no organismo de mamíferos) só se encontram plenamente desenvolvidos após o décimo de vida pós-natal, apresentando reduzida responsividade à hipóxia nos primeiros dias após nascimento⁶³, alterações na sensibilidade e atividade dos corpúsculos carotídeos não parecem ser o principal mecanismo que contribua para o surgimento das irregularidades respiratórias nos animais SHR. Essas observações, portanto, sugerem que as irregularidades respiratórias observadas nesses animais têm origem central, decorrente de alterações nos mecanismos neurais relacionados ao controle da ventilação.

Diante dessas observações e das evidências mostrando que os animais SHR apresentam hipoperfusão e hipóxia cerebral, especulamos que alterações na sinalização purinérgica, em especial aquela relacionada a adenosina, estariam alteradas em animais SHR. A cafeína, um antagonista de receptores A_1 para a adenosina, é utilizada na prática clínica como uma ferramenta farmacológica para tratamento da apneia da prematuridade, evitando quadros de hipoxemia em bebês prematuros. A dose de cafeína utilizada nesse estudo corresponde a dose utilizada na prática clínica⁵⁸. Como esperado, a cafeína apresentou efeitos excitatórios sobre a ventilação pulmonar, aumentando o volume corrente em ambos os grupos experimentais. Tais respostas excitatórias confirmam que a adenosina, atuando sobre seus receptores A_1 , tem efeitos inibitórios sobre os mecanismos de controle da ventilação¹³. Contudo, a cafeína, de forma aguda, não foi capaz de melhorar a fR de animais SHR, a qual permaneceu inferior a fR dos animais NT. Ademais, as irregularidades respiratórias dos animais SHR também permaneceram após a administração de cafeína. Tais observações sugerem que as disfunções no controle da frequência respiratória de animais SHR não parecem depender de modificações na sinalização adenosinérgica, ou que o tratamento agudo e sistêmico não foi a melhor abordagem experimental para explorar tal possibilidade.

Nesse sentido, optamos por realizar o tratamento crônico com cafeína, assim como é realizado na prática clínica para o tratamento da apneia da prematuridade. Realizamos o tratamento durante duas semanas de vida, ou seja, de P0 até P15, pois nossos estudos mostram que as irregularidades de animais SHR estão presentes até a segunda semana de vida pós-natal (dados não publicados). Os resultados sobre o tratamento crônico ainda são preliminares, devido ao baixo número amostral ($n=5$ ou 6). Contudo, esses resultados preliminares mostram efeitos distintos do tratamento crônico com cafeína sobre a ventilação de animais NT e SHR. Apesar da ventilação não ser diferente em relação aos animais tratados com veículo, observamos que os animais do grupo NT apresentaram um aumento significativo na fR. Nos animais SHR, por outro lado, foi observado um aumento significativo no V_T . Os mecanismos responsáveis por essas diferenças ainda necessitam de estudos adicionais; contudo, podemos especular que o aumento do VT nos animais SHR teve um efeito benéfico compensatório sobre o quadro de hipoventilação pulmonar, prevenindo, pelo menos parcialmente, os quadros de hipoxemia decorrentes das irregularidades respiratórias. Essa possível melhora no quadro respiratório e oxigenação sanguínea de animais SHR tratados com cafeína durante o período pós-natal pode explicar, em partes, o efeito de redução dos níveis de pressão arterial, quando comparado com os animais SHR que receberam injeções de veículo. As observações a respeito do impacto positivo do tratamento com cafeína durante a vida pós-natal sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial na vida adulta estão de acordo com nossa hipótese, e abre novas perspectivas para explorarmos mecanismos relacionados à gênese da hipertensão arterial essencial/neurogênica.

7 CONCLUSÃO

Esse estudo mostra que o tratamento sistêmico com cafeína estimula a respiração e aumenta a ventilação pulmonar em SHRs neonatos, e que o tratamento crônico durante os 15 primeiros dias de vida parece ser capaz de atenuar o desenvolvimento da hipertensão arterial em animais SHR adultos.

REFERÊNCIAS

1. Mills KT, Stefanescu A, He J. The global epidemiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol.* 2020; 16(4): 223-37.
2. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(5): 335-46.
3. Simms AE, Paton JF, Pickering AE, Allen AM. Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? *J Physiol.* 2009; 587(3): 597-610.
4. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature.* 2007; 447(7143): 433-40.
5. Greer JJ, Funk GD. Perinatal development of respiratory motoneurons. *Respir Physiol Neurobiol.* 2005; 149(1-3): 43-61.
6. O'Connor KM, Dias ML, McDonald FB, O'Halloran KD. Epigenetic silencing by early-life hypoxic stress programmes respiratory motor control. *Exp Physiol.* 2020; 105(1): 3-4.
7. Nanduri J, Makarenko V, Reddy VD, Yuan G, Pawar A, Wang N, et al. Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(7): 2515-20.
8. Bittencourt-Silva PG, Menezes MF, Mendonca-Junior BA, Karlen-Amarante M, Zoccal DB. Postnatal intermittent hypoxia enhances phrenic and reduces vagal upper airway motor activities in rats by epigenetic mechanisms. *Exp Physiol.* 2020; 105(1): 148-59.
9. Carley DW, Berecek K, Videnovic A, Radulovacki M. Sleep-disordered respiration in phenotypically normotensive, genetically hypertensive rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162(4 Pt 1): 1474-9.
10. Sjostrom C, Lindberg E, Elmasry A, Hagg A, Svardsudd K, Janson C. Prevalence of sleep apnoea and snoring in hypertensive men: a population based study. *Thorax.* 2002; 57(7): 602-7.
11. Del Negro CA, Funk GD, Feldman JL. Breathing matters. *Nat Rev Neurosci.* 2018; 19(6): 351-67.
12. Reklow RJ, Alvares TS, Zhang Y, Miranda Tapia AP, Biancardi V, Katzell AK, et al. The Purinome and the preBotzinger Complex - A Menage of Unexplored Mechanisms That May Modulate/Shape the Hypoxic Ventilatory Response. *Front Cell Neurosci.* 2019; 13:365.
13. Vandam RJ, Shields EJ, Kelty JD. Rhythm generation by the pre-Botzinger complex in medullary slice and island preparations: effects of adenosine A(1) receptor activation. *BMC Neurosci.* 2008; 9:95.

14. Paton JF, Dickinson CJ, Mitchell G. Harvey Cushing and the regulation of blood pressure in giraffe, rat and man: introducing 'Cushing's mechanism'. *Exp Physiol*. 2009; 94(1): 11-7.
15. Cates MJ, Steed PW, Abdala AP, Langton PD, Paton JF. Elevated vertebrobasilar artery resistance in neonatal spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol*. 2011; 111(1): 149-56.
16. Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran D, et al. 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension*. 2020; 75(6): 1334-57.
17. Messerli FH, Williams B, Ritz E. Essential hypertension. *Lancet*. 2007; 370(9587): 591-603.
18. Esler M. The 2009 Carl Ludwig Lecture: pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management. *J Appl Physiol*. 2009; 108(2): 227-37.
19. Grassi G. Assessment of sympathetic cardiovascular drive in human hypertension: achievements and perspectives. *Hypertension*. 2009; 54(4): 690-7.
20. Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF, et al. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol*. 2008; 586(13): 3253-65.
21. Pijacka W, Moraes DJ, Ratcliffe LE, Nightingale AK, Hart EC, da Silva MP, et al. Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nat Med*. 2016; 22(10): 1151-9.
22. McBryde FD, Abdala AP, Hendy EB, Pijacka W, Marvar P, Moraes DJ, et al. The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nat Commun*. 2013; 4: 2395.
23. Timmers HJ, Wieling W, Karemaker JM, Lenders JW. Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans. *J Physiol*. 2003; 553(Pt 1): 3-11.
24. Ratcliffe LE, Pijacka W, McBryde FD, Abdala AP, Moraes DJ, Sobotka PA, et al. CrossTalk opposing view: Which technique for controlling resistant hypertension? Carotid chemoreceptor denervation/modulation. *J Physiol*. 2014; 592(18): 3941-4.
25. McBryde FD, Hart EC, Ramchandra R, Paton JF. Evaluating the carotid bodies and renal nerves as therapeutic targets for hypertension. *Auton Neurosci*. 2017; 204:126-30.
26. Abdala AP, McBryde FD, Marina N, Hendy EB, Engelman ZJ, Fudim M, et al. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. *J Physiol*. 2012; 590(Pt 17): 4269-77.

27. Melo MR, Gasparini S, Silva EF, Karlen-Amarante M, Speretta GF, Lauar MR, et al. Renovascular hypertension elevates pulmonary ventilation in rats by carotid body-dependent mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2020; 318(4): R730-R42.
28. Champagnat J, Morin-Surun MP, Bouvier J, Thoby-Brisson M, Fortin G. Prenatal development of central rhythm generation. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011; 178(1): 146-55.
29. Bailey DM. Oxygen and brain death; back from the brink. *Exp Physiol*. 2019; 104(12): 1769-79.
30. Reeves SR, Gozal D. Developmental plasticity of respiratory control following intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005; 149(1-3): 301-11.
31. Carley DW, Trbovic S, Radulovacki M. Sleep apnea in normal and REM sleep-deprived normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive (SHR) rats. *Physiol Behav*. 1996; 59(4-5): 827-31.
32. Tian Y, Geng D, Wang Y, Shi L, Yu H, He W, et al. Contribution of retrotrapezoid nucleus neurons to CO₂-amplified cardiorespiratory activity in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol*. 2021 99(4): 1115-30.
33. Kales A, Bixler EO, Cadieux RJ, Schneck DW, Shaw LC, 3rd, Locke TW, et al. Sleep apnoea in a hypertensive population. *Lancet*. 1984; 2(8410): 1005-8.
34. Lavie P, Ben-Yosef R, Rubin AE. Prevalence of sleep apnea syndrome among patients with essential hypertension. *Am Heart J*. 1984; 108(2): 373-6.
35. Smith JC, Abdala AP, Koizumi H, Rybak IA, Paton JF. Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. *J Neurophysiol*. 2007; 98(6): 3370-87.
36. Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*. 1991; 254(5032): 726-9.
37. Ashhad S, Kam K, Negro CAD, Feldman JL. Breathing Rhythm and Pattern and Their Influence on Emotion. *Annu Rev Neurosci*. 2022.
38. Tan W, Pagliardini S, Yang P, Janczewski WA, Feldman JL. Projections of preBotzinger complex neurons in adult rats. *J Comp Neurol*. 2010; 518(10): 1862-78.
39. Tan W, Janczewski WA, Yang P, Shao XM, Callaway EM, Feldman JL. Silencing preBotzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat Neurosci*. 2008; 11(5): 538-40.
40. Moraes DJ, Machado BH, Paton JF. Specific respiratory neuron types have increased excitability that drive presympathetic neurones in neurogenic hypertension. *Hypertension*. 2014; 63(6): 1309-18.

41. Menuet C, Connelly AA, Bassi JK, Melo MR, Le S, Kamar J, et al. PreBotzinger complex neurons drive respiratory modulation of blood pressure and heart rate. *Elife*. 2020; 9.
42. Angelova PR, Kasymov V, Christie I, Sheikhbahaei S, Turovsky E, Marina N, et al. Functional Oxygen Sensitivity of Astrocytes. *J Neurosci*. 2015; 35(29): 10460-73.
43. Dzal YA, Jenkin SE, Lague SL, Reichert MN, York JM, Pamenter ME. Oxygen in demand: How oxygen has shaped vertebrate physiology. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2015; 186: 4-26.
44. Powell FL, Milsom WK, Mitchell GS. Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol*. 1998; 112(2): 123-34.
45. Costa KM, Accorsi-Mendonca D, Moraes DJ, Machado BH. Evolution and physiology of neural oxygen sensing. *Front Physiol*. 2014; 5:302.
46. Gourine AV, Funk GD. On the existence of a central respiratory oxygen sensor. *J Appl Physiol (1985)*. 2017; 123(5): 1344-9.
47. Neubauer JA, Melton JE, Edelman NH. Modulation of respiration during brain hypoxia. *J Appl Physiol (1985)*. 1990; 68(2):441-51.
48. Rajani V, Zhang Y, Jalubula V, Rancic V, SheikhBahaei S, Zwicker JD, et al. Release of ATP by pre-Botzinger complex astrocytes contributes to the hypoxic ventilatory response via a Ca^{2+} -dependent P2Y1 receptor mechanism. *J Physiol*. 2018; 596(15): 3245-69.
49. Marina N, Christie IN, Korsak A, Doronin M, Brazhe A, Hosford PS, et al. Astrocytes monitor cerebral perfusion and control systemic circulation to maintain brain blood flow. *Nat Commun*. 2020; 11(1): 131.
50. Cates MJ, Dickinson CJ, Hart EC, Paton JF. Neurogenic hypertension and elevated vertebrobasilar arterial resistance: is there a causative link? *Curr Hypertens Rep*. 2012; 14(3): 261-9.
51. Marina N, Ang R, Machhada A, Kasymov V, Karagiannis A, Hosford PS, et al. Brainstem hypoxia contributes to the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 2015;65(4): 775-83.
52. Turlejski T, Humoud I, Desai R, Smith KJ, Marina N. Immunohistochemical evidence of tissue hypoxia and astrogliosis in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res*. 2016; 1650: 178-83.
53. McBryde FD, Malpas SC, Paton JF. Intracranial mechanisms for preserving brain blood flow in health and disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017; 219(1): 274-87.

54. Huxtable AG, Zwicker JD, Poon BY, Pagliardini S, Vrouwe SQ, Greer JJ, et al. Tripartite Purinergic Modulation of Central Respiratory Networks during Perinatal Development: The Influence of ATP, Ectonucleotidases, and ATP Metabolites. *J Neurosci.* 2009; 29(47): 14713-25.
55. Fisher JP, Paton JF. The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: implications for hypertension. *J Hum Hypertens.* 2012 ;26(8): 463-75.
56. McDonald FB, Dempsey EM, O'Halloran KD. The impact of preterm adversity on cardiorespiratory function. *Exp Physiol.* 2020; 105(1):17-43.
57. Erickson G, Dobson NR, Hunt CE. Immature control of breathing and apnea of prematurity: the known and unknown. *J Perinatol.* 2021 41(9):2111-23.
58. Montandon G, Bairam A, Kinkead R. Neonatal caffeine induces sex-specific developmental plasticity of the hypoxic respiratory chemoreflex in adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295(3): R922-34.
59. Mortola JP, Frappell PB. Measurements of air ventilation in small vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013; 186(2): 197-205.
60. Mortola JP. Breathing pattern in newborns. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1984; 56(6): 1533-40.
61. Pijacka W, McBryde FD, Marvar PJ, Lincevicius GS, Abdala AP, Woodward L, et al. Carotid sinus denervation ameliorates renovascular hypertension in adult Wistar rats. *J Physiol.* 2016; 594(21): 6255-66.
62. Karlen-Amarante M, Leirao IP, Katayama PL, Colombari E, Bittencourt-Silva PG, Menezes MF, et al. Sympathetic dysregulation induced by postnatal intermittent hypoxia. *Sleep.* 2023; 46(5).
63. Kholwadwala D, Donnelly DF. Maturation of carotid chemoreceptor sensitivity to hypoxia: in vitro studies in the newborn rat. *J Physiol.* 1992; 453: 461-73.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***"AVALIAÇÃO DAS IRREGULARIDADES RESPIRATÓRIAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL EM ANIMAIS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS"***, registrada com o nº **02/2023**, sob a responsabilidade do **Profº Dr. Daniel Breseghello Zoccal** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 17/02/2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Março/2027
Espécie/linhagem/raça	Ratos isogênicos / Holtzman e SHR
Nº de animais	40 (20 de cada)
Peso/Idade	250 a 300 g / 60 dias e 200 a 250 g / 60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da FOAr - Campus-Araraquara e Biotério da Fisiologia da FOAr

Prof. Dr. EWERTON GARCIA DE OLIVEIRA MIMA
Vice-Coordenador da CEUA/FOAr/UNESP

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Rua Humaitá nº 1.680 – Centro – CEP 14801-903 – Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA – SP
5º andar – fone (16) 3301-6459 / e-mail: ceua.foar@unesp.br - home page: <http://www.foar.unesp.br>

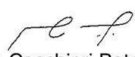
ANEXO B – CERTIFICADO RELATÓRIO FINAL



Certificado

Certifico que **Andressa Bárbara Evangelista**, portador(a) do CPF número 103.632.406-08, desenvolveu a pesquisa **"EFEITOS DO TRATAMENTO PÓS-NATAL COM CAFEÍNA SOBRE A VENTILAÇÃO E IRREGULARIDADES RESPIRATÓRIAS EM ANIMAIS HIPERTENSOS "** no âmbito do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Unesp 2023/2024, na modalidade **Bolsa PIBIC CNPq**, no período de 01/09/2023 a 31/08/2024, na(o) Faculdade de Odontologia de Araraquara da Unesp, sob a supervisão do(a) Professor(a) Daniel Breseghello Zoccal.

São Paulo, 29 de agosto de 2025


Edson Cocchieri Botelho
Pró-Reitor de Pesquisa

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"