

HIDROXICLOROQUINA E PRESSÃO ARTERIAL  
EM MODELO DE APNEIA DO SONO

TESE

CHAIANE FACCO PICCIN

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:

Cardiologia e Ciências Cardiovasculares

HIDROXICLOROQUINA E PRESSÃO ARTERIAL

EM MODELO DE APNEIA DO SONO

Tese de doutorado

Chaiane Facco Piccin

Orientador: Prof. Dr. Denis Martinez

Coorientador: Prof. Dr. Sandro Cadaval Gonçalves

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

HIDROXICLOROQUINA E PRESSÃO ARTERIAL  
EM MODELO DE APNEIA DO SONO

Autor: Chaiane Facco Piccin

Orientador: Prof. Dr. Denis Martinez

Coorientador: Prof. Dr. Sandro Cadaval Gonçalves

*Tese submetida como requisito para obtenção do  
grau de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde, Área de Concentração:  
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.*

Porto Alegre

2020

Piccin, Chaiane Facco  
Hidroxicloroquina e pressão arterial em modelo de  
apneia do sono / Chaiane Facco Piccin. -- 2020.  
137 f.  
Orientador: Denis Martinez.

Coorientador: Sandro Cadaval Gonçalves.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e  
Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Apneia do sono. 2. Pressão arterial. 3.  
Hidroxicloroquina. I. Martinez, Denis, orient. II.  
Gonçalves, Sandro Cadaval, coorient. III. Título.

Dedico este trabalho à minha família,  
meu pai, Valter; minha mãe, Inês e minha irmã, Alessandra.

## Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio e colaboração de diversas pessoas às quais gostaria de expressar os meus mais profundos agradecimentos e reconhecimento pela ajuda prestada no decurso de sua elaboração, em particular:

Ao professor Dr. Denis Martinez, pela orientação prestada, incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. É uma imensa honra e orgulho tê-lo como orientador por mais de quatro anos. Não esquecerei seus ensinamentos, preciosos conselhos e sua inestimável confiança.

Ao professor Dr. Sandro Cadaval Gonçalves, pela coorientação prestada, incentivo e disponibilidade em auxiliar na finalização deste trabalho.

À Professora Dra. Maria Cláudia Irigoyen e seu grupo de pesquisa do Instituto de Cardiologia de São Paulo, pela disponibilidade em ensinar a técnica cirúrgica utilizada neste trabalho.

À Professora Dra. Jeanne Duffy e seu grupo de pesquisa, da *Harvard Medical School* e *Brigham and Women's Hospital*, por proporcionarem a experiência de pesquisar em um centro de referência mundial em sono, pelos ensinamentos, vivências e apoio em todos os momentos.

À Universidade Federal de Porto Alegre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, pela oportunidade de ensino qualificado e

auxílio em todas as etapas da formação.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelas explicações e auxílios diários com a manipulação dos animais e pela convivência amigável e de apoio em todos os momentos de dificuldade com a pesquisa.

Ao médico Luiz Carlos Alves de Oliveira, meu mentor na área de sono, pelo apoio incondicional aos meus estudos.

Às colegas e amigas do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Sono, pelo auxílio e apoio em todos os momentos, levarei nossa amizade para sempre.

Aos animais utilizados na pesquisa, gostaria de prestar minha homenagem.



*Monumento ao rato de laboratório, escultura na cidade de Novosibirsk, na Sibéria, Rússia. Desenhado por Andrew Kharkevich, o monumento homenageia o sacrifício dos animais em pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos e a cura de doenças.*

A Deus, pela proteção em cada passo dado até a realização desse objetivo.

Por fim, agradeço em especial àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim mais do que ninguém e que seguramente são os que mais compartilham da  
minha alegria: minha amada família.



*“She believed she could, so she did.”*

*R.S. Grey*

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS EM PORTUGUÊS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS EM INGLÊS.....	14
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
1. INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 DEFINIÇÃO DE APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO .....	19
2.2 ESTUDOS DE PREVALÊNCIA DA APNEIA DO SONO BASEADOS NA POPULAÇÃO.....	21
2.3 APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO E HIPERTENSÃO .....	26
2.4 MODELOS DE APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO UTILIZANDO HIPÓXIA INTERMITENTE .....	32
2.5 ALTERAÇÕES VASCULARES NA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO .....	39
2.6 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO .....	43
2.7 INFLAMAÇÃO .....	47
2.8 HIDROXICLOROQUINA.....	51
3. HIPÓTESE CONCEITUAL .....	57
4. JUSTIFICATIVA.....	58
5. OBJETIVOS.....	59
5.1 OBJETIVO GERAL .....	59

5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	59
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERAT .....	60
7.	ARTIGO 1 .....	82
8.	ARTIGO 2 .....	107
9.	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	134
10.	APOIO FINANCEIRO .....	134
	APÊNDICES .....	135

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS EM PORTUGUÊS

AOS – apneia obstrutiva do sono

AR – artrite reumatoide

ATPase – adenosinatrifosfatase

CPAP – pressão positiva contínua nas vias aéreas

CQ – cloroquina

DAC – doença arterial coronariana

DAMP – padrão molecular associado ao dano

DC – débito cardíaco

DCV – doença cardiovascular

HAS – hipertensão arterial sistêmica

HCQ – hidroxicloroquina

HIC – hipóxia intermitente crônica

IAH – índice de apneia e hipopneia

IC – intervalo de confiança

IDR – índice de distúrbio respiratório

IL-1 $\beta$  – interleucina 1 $\beta$

IL-6 – interleucina 6

IMC – índice de massa corporal

LES – lúpus eritematoso sistêmico

nmMLCK – quinase de cadeia leve da miosina não muscular

NO – óxido nítrico

NTS – núcleo do trato solitário

PA – pressão arterial

PECAM-1 – molécula de adesão celular endotelial a plaquetas-1

RERA – despertares relacionados ao esforço respiratório

RVS – resistência vascular sistêmica

SAOS – síndrome da apneia obstrutiva do sono

SED – sonolência excessiva diurna

SHR – rato espontaneamente hipertensivo

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS EM INGLÊS

AHI – apnea hypopnea index

CD-36 – cluster of differentiation 36

CPAP – continuous positive airway pressure

DAMP – damage-associated molecular pattern

MMP-9 – matrix metalloproteinase 9

nmMLCK – non-muscle myosin light chain kinase

OLDOSA – Obstructive Lung Disease and Obstructive Sleep Apnea

OR – odds ratio

OXI – Oxiklorin

PECAM-1 – platelet and endothelial cell adhesion molecule-1

RERA – respiratory effort-related arousal

SAVE – Sleep Apnea cardioVascular Endpoints

SHR – spontaneously hypertensive rat

## RESUMO

*Hipótese:* Hipóxia intermitente crônica (HIC), simulando apneia do sono, causa hipertensão por mecanismos provavelmente inflamatórios; hidroxicloroquina (HCQ) inibiria a pressão arterial (PA) elevada por alterar a estrutura arteriolar. *Métodos:* Monitorou-se a PA e frequência cardíaca (FC) por telemetria em ratos Wistar durante 14 dias de protocolo de HIC com injeção de HCQ (grupo HIC+HCQ) ou veículo salino (grupo HIC); ou hipóxia simulada (grupo Sham). Expressão de calponina foi mensurada por imunistoquímica na artéria aorta. *Resultados:* PA e FC apresentaram aumento no grupo HIC, diminuição no grupo Sham e permaneceram estáveis no grupo HIC+HCQ. A expressão de calponina na aorta foi maior no grupo HIC+HCQ. *Conclusão:* O modelo de HIC aumenta a PA, confirmando o papel da HIC na patogênese da hipertensão arterial. HCQ controlou o aumento da PA. A maior expressão de calponina na aorta pode representar potencial fator no controle da hipertensão.

*Palavras-chave:* hipóxia intermitente, apneia do sono, pressão arterial, hipertensão, hidroxicloroquina, calponina.

## ABSTRACT

*Hypothesis:* Chronic intermittent hypoxia (CIH), simulating sleep apnea, causes hypertension probably by inflammatory mechanisms; hydroxychloroquine (HCQ) would inhibit high BP (BP) by altering the arteriolar structure. *Methods:* BP and heart rate (HR) were monitored by telemetry in Wistar rats during 14 days of CIH protocol with HCQ injection (CIH+HCQ group) or saline vehicle (CIH group); or simulated hypoxia (Sham group). Calponin expression was measured by immunohistochemistry in the aorta artery. *Results:* BP and HR variables showed an increase in the CIH group, a decrease in the Sham group and remained stable in the CIH+HCQ group. Calponin expression in the aorta was higher in the CIH+HCQ group. *Conclusion:* The CIH model increases BP, confirming the role of CIH in the arterial hypertension pathogenesis. HCQ controlled the increase in BP. The greater expression of calponin in the aorta may represent a potential factor in hypertension control.

*Keywords:* intermittent hypoxia, sleep apnea, blood pressure, hypertension, hydroxychloroquine, calponin.



## 1. INTRODUÇÃO

A apneia obstrutiva do sono (AOS) é caracterizada pelo colapso repetitivo da faringe durante o sono, levando à hipóxia intermitente seguida de reoxigenação. Afeta até 38% da população adulta, no mundo inteiro.<sup>1</sup> Em indivíduos com idade entre 30 e 69 anos, a prevalência global estimada é de quase um bilhão de pessoas afetadas, sendo superior a 50% em alguns países.<sup>2</sup>

Os episódios repetitivos de hipóxia podem ativar vários mecanismos patológicos, como estresse oxidativo e inflamação, que podem levar à disfunção endotelial e doenças cardiovasculares (DCVs).<sup>3</sup> A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a principal enfermidade associada.<sup>4,5</sup>

Emprega-se o modelo experimental de hipóxia intermitente crônica (HIC) *in vitro*, em humanos e em animais, para estudar os mecanismos subjacentes ao aumento sustentado da pressão arterial (PA) observado após a exposição em longo prazo à HIC, o principal efeito da AOS.<sup>6,7,8</sup> Ratos expostos à HIC respondem com várias alterações cardiovasculares e metabólicas, incluindo estresse oxidativo, HAS<sup>9,10,11,12</sup>, função vascular comprometida<sup>13,14</sup>, intolerância à glicose<sup>15</sup> e disfunção endotelial.<sup>16</sup>

O modelo animal de HIC, ao produzir estresse oxidativo e inflamação, ocasiona disfunção endotelial, que tem papel causal na promoção de alterações vasculares estruturais e funcionais.<sup>17</sup> Estudos experimentais em roedores demonstraram que a HIC, por si só, representa fator causal de remodelamento vascular e HAS causados por inflamação vascular<sup>18,19,20</sup> e estresse oxidativo.<sup>21,22</sup>

O músculo liso na camada média regula o lúmen dos vasos sanguíneos. Sua contração, através da ligação entre actina e miosina, é modulada por proteínas como caldesmona<sup>23</sup> e

calponina<sup>24,25</sup>, que são reguladoras inibitórias da contratilidade do músculo liso.<sup>26</sup>

AOS tem características de doença inflamatória crônica de baixo grau.<sup>27</sup> Assim, parte da assinatura fenotípica mórbida da AOS seria explicada causalmente por processos inflamatórios que induzem disfunção de órgãos-alvo. A hidroxicloroquina (HCQ) exerce efeitos anti-inflamatórios através da regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).<sup>28,29</sup> Quando utilizada em pacientes com artrite reumatoide (AR), ocorre redução de 72% no risco de DCV comparados aos não usuários.<sup>30</sup>

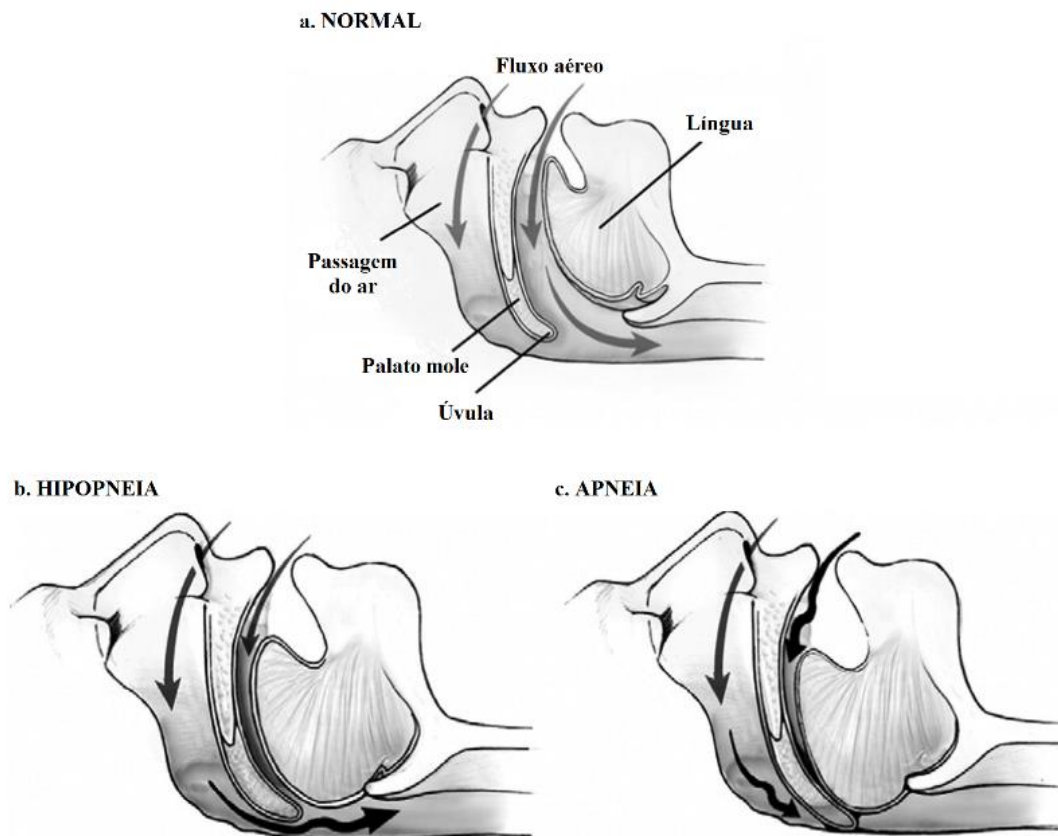
A partir dos conceitos descritos, desenvolvemos a hipótese de que a ação anti-inflamatória da HCQ impede o aumento da PA e altera a expressão de calponina e caldesmona vascular em modelo animal de AOS.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DEFINIÇÃO DE APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO

A apneia do sono é o transtorno respiratório do sono mais comumente estudado<sup>31</sup>, podendo ser de causa central ou obstrutiva.<sup>32</sup> A de causa central depende de falha no sistema de controle ventilatório central, em geral, por doenças neurológicas. Os quadros obstrutivos, bem mais comuns do que os centrais, envolvem relaxamento sono-dependente da musculatura faríngea e podem variar desde o simples aumento da resistência da via aérea superior até marcada hipoxemia causada por hipopneias, apneias e hipoventilação alveolar.

A AOS é caracterizada pela obstrução total ou a redução de mais de 90% do fluxo aéreo para os pulmões durante o sono por pelo menos 10 segundos acompanhada de dessaturação da oxiemoglobina maior que 3% a partir da linha de base, ou evidência de despertar no eletroencefalograma. A hipopneia é a obstrução parcial do fluxo aéreo de pelo menos 30% e igualmente acompanhada de dessaturação maior que 3% ou despertar durante o sono (Figura 1).<sup>33,34,35</sup> Com a presença da AOS, o sono perde sua arquitetura normal, são alteradas a composição e duração dos seus estágios e provocadas respostas exacerbadas do sistema nervoso autônomo.<sup>36</sup>



**Figura 1.** Obstrução parcial e completa das vias aéreas, resultando em hipopneia e apneia, respectivamente. Adaptada de Somers et al.<sup>37</sup>

A gravidade da AOS é classificada de acordo com o índice de apneia e hipopneia (IAH). Esse índice é determinado dividindo o número total de episódios de apneias e hipopneias pelo número de horas de sono. Em 2014, na 3ª edição da classificação internacional dos distúrbios do sono, os despertares relacionados ao esforço respiratório (*respiratory effort-related arousal*; RERA) foram incluídos ao diagnóstico da AOS. Os RERAs são caracterizados por uma sequência de respirações, com esforço respiratório crescente, resultando em despertar, sem dessaturação de oxigênio. Somando-se os eventos de apneia, hipopneia e RERA, e os dividindo pelo tempo total de horas de sono se obtêm o índice de distúrbio respiratório (IDR) (Tabela 1).<sup>38</sup> Apesar de sua menor repercussão sobre o processo respiratório, os RERAs estão associados à elevação da PA.<sup>39</sup>

**Tabela 1.** Classificação da gravidade da apneia obstrutiva do sono.

<b>IAH ou IDR</b>	<b>Classificação</b>
< 5	Normal
5 – 14	Leve
15 – 29	Moderada
≥ 30	Grave

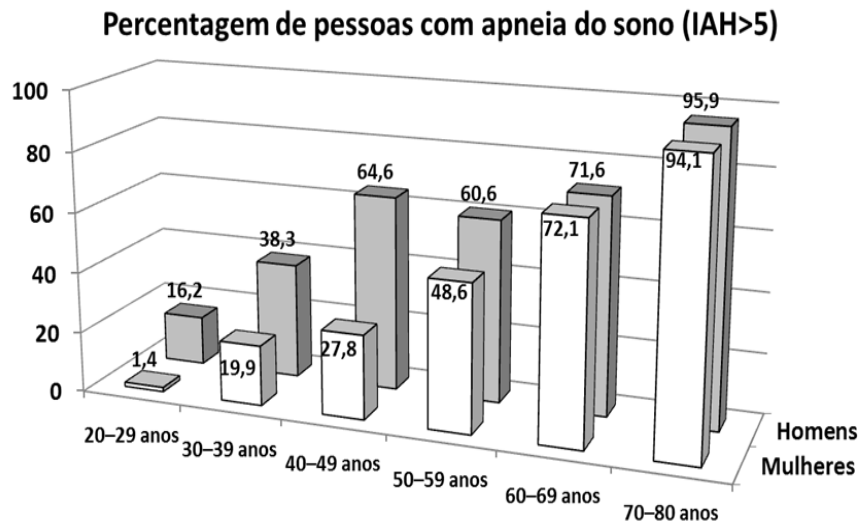
Classificação conforme a Academia Americana de Medicina do Sono.<sup>38</sup>

## 2.2 ESTUDOS DE PREVALÊNCIA DA APNEIA DO SONO BASEADOS NA POPULAÇÃO

O estudo populacional mais rigoroso que determina as características epidemiológicas da AOS é o *Wisconsin Sleep Cohort Study*.<sup>40</sup> A prevalência de AOS (IAH $\geq$ 5) em 602 adultos de meia-idade entre 30 e 60 anos de idade foi de 9% para mulheres e 24% para homens, medida por polissonografia em laboratório. A síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS), caracterizada por um IAH $\geq$ 5 acrescida de sonolência excessiva diurna (SED), esteve presente em 2% das mulheres e 4% dos homens. Outros estudos projetados de forma semelhante produziram taxas de prevalência comparáveis. A maior prevalência de AOS foi observada em uma coorte espanhola que incluiu sujeitos com idade entre 30 e 70 anos.<sup>41</sup> Nela, o IAH $\geq$ 5 foi observado em 28% das mulheres e 26% dos homens, podendo ser explicado pela inclusão de despertares do sono na pontuação das hipopneias. No entanto, a prevalência da SAOS (IAH $\geq$ 10 e SED) nesta população espanhola foi semelhante ao *Wisconsin Sleep Cohort Study*. Da mesma forma, em 1741 pacientes de uma coorte realizada na Pensilvânia, a prevalência da SAOS (definida como IAH $\geq$ 10 e SED) foi de 3,9% em homens e 1,2% em mulheres.<sup>42,43</sup> Finalmente, Bearpark et al.<sup>44</sup> avaliaram 294 homens entre 40 e 65 anos de idade da Austrália usando monitoração portátil e identificaram a SAOS em 3,1% da população. Ao todo, esses grandes

estudos de populações predominantemente brancas estimam a prevalência da SAOS em aproximadamente 3-4% em homens e 2% em mulheres. Curiosamente, apesar do índice de massa corporal (IMC) geral ser inferior nos estudos da Ásia, a prevalência da SAOS é semelhante nos países asiáticos, quando comparada com os seus homólogos ocidentais. A prevalência semelhante entre essas duas populações distintas destaca a importância de outros fatores de risco além da obesidade.<sup>45,46</sup> Em conjunto, os resultados de vários estudos de base populacional em várias regiões geográficas e grupos étnicos demonstram uma taxa de prevalência semelhante de AOS e SAOS, apesar das diferenças nos desenhos dos estudos e dos aspectos técnicos utilizados para identificar eventos respiratórios.

No Brasil, em 2010, foi publicado um estudo epidemiológico de base populacional da cidade de São Paulo, onde a prevalência total de AOS foi de 32,8% (Figura 2).<sup>47</sup> A amostra de 1042 indivíduos foi constituída de voluntários com idades entre 20 e 80 anos que realizaram polissonografia, sendo 55% do sexo masculino e 60% apresentavam IMC maior que 25 kg/m<sup>2</sup>. Dentre os fatores independentes associados à AOS foram relatados: sexo masculino (OR 4,1; IC95% 2,9-5,8), obesidade (OR 10,5; IC95% 7,1-15,7) e idade superior a 60 anos (OR 34,5; IC95% 18,5-64,2).

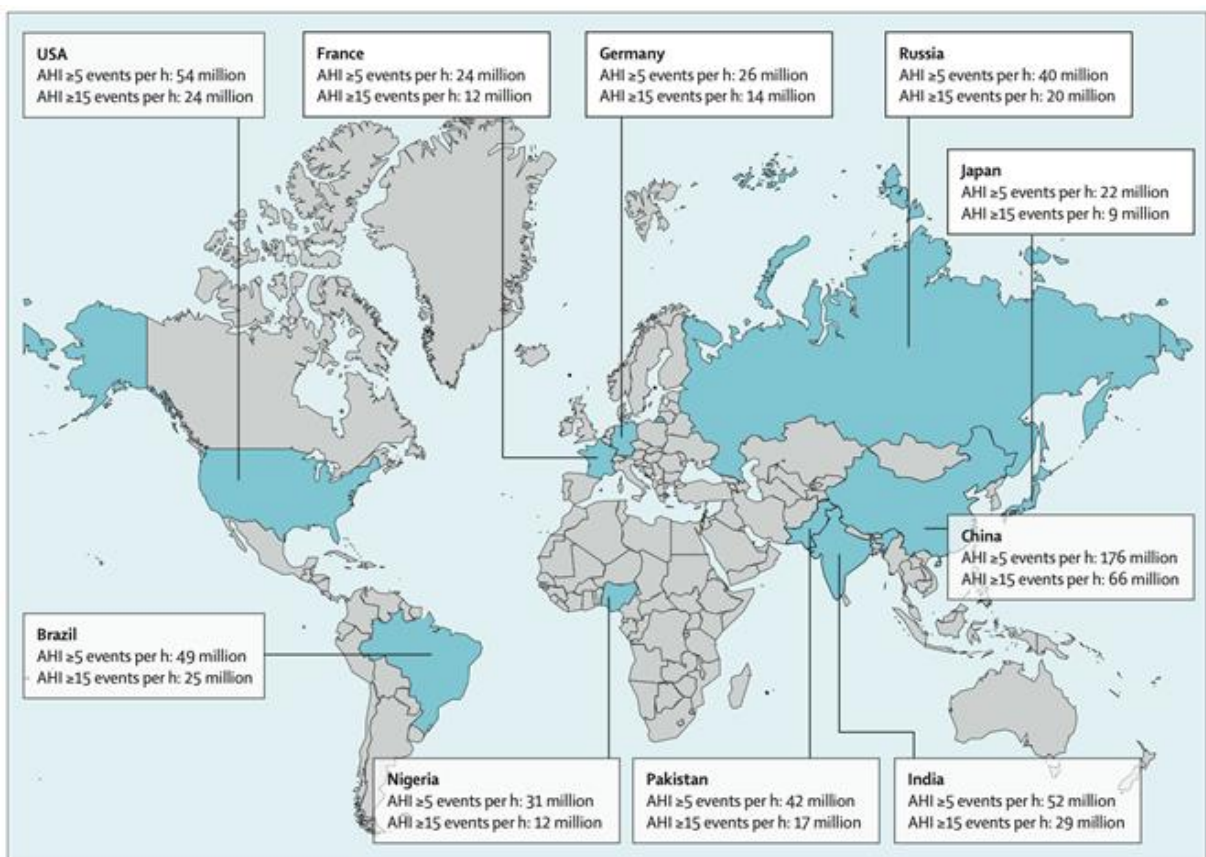


**Figura 2.** Prevalência de apneia obstrutiva do sono (IAH>5) por sexo no estado de São Paulo, Brasil. Adaptada de Tufik et al.<sup>47</sup>

Uma revisão sistemática publicada em 2017<sup>1</sup> destacou tanto a substancial heterogeneidade metodológica que existe em estudos que investigaram a prevalência populacional de AOS, como a ampla variação resultante na prevalência relatada. Nesse estudo, a prevalência global variou de 9% a 38% na população adulta geral, de 13% para 33% em homens e de 6% para 19% em mulheres, embora muito maior nos grupos de idosos. Os dados disponíveis foram principalmente limitados à Europa e América do Norte. Apesar dessas limitações, essa revisão sistemática confirma fatores tais quais o avanço da idade, sexo masculino e maior IMC como de risco para AOS.

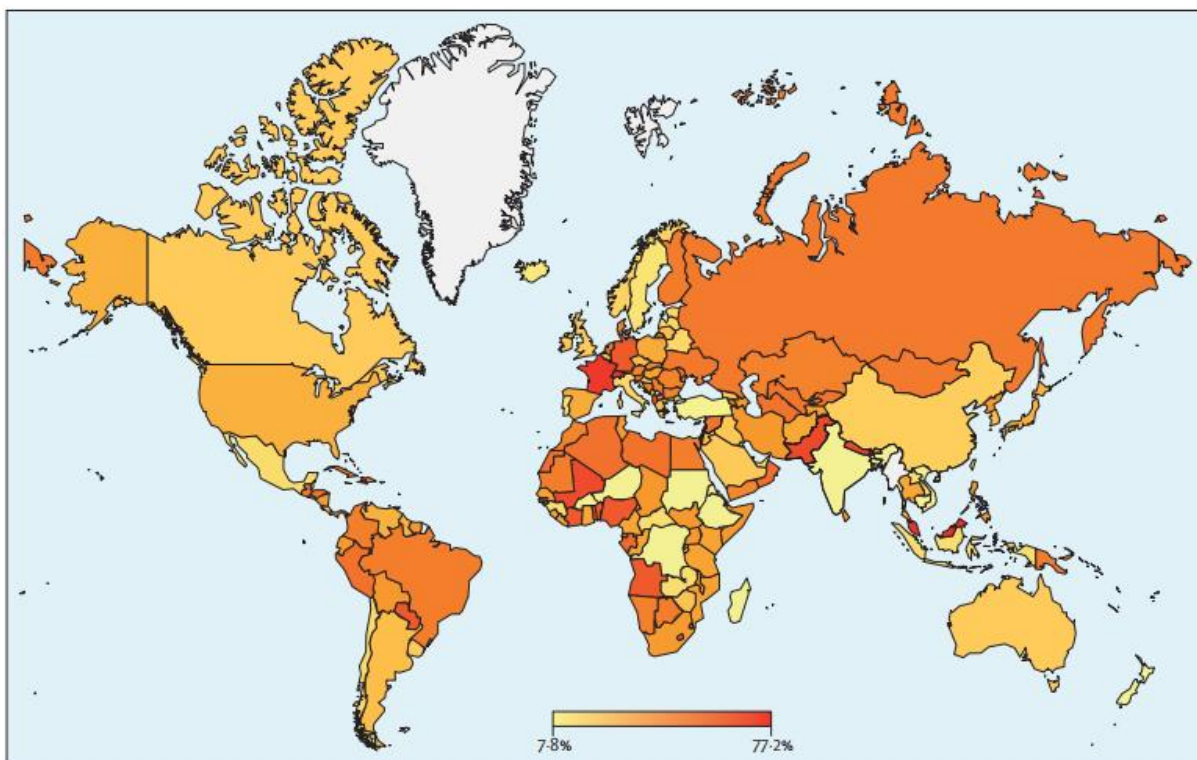
Em 2019, um estudo<sup>2</sup> estimou a prevalência global de AOS conforme os critérios de pontuação da Academia Americana de Medicina do Sono de 2012 em indivíduos com idades entre 30 e 69 anos, através de dados já publicados e contatando líderes de opinião para realizar essa estimativa. Usando os valores-limite do IAH de cinco ou mais eventos por hora e 15 ou mais eventos por hora, foi estimado que 936 milhões (IC95% 903-970) de adultos (homens e mulheres) apresentam AOS grave e 425 milhões (IC95% 399-450) de adultos apresentam AOS

moderada a grave em todo o mundo. O número de indivíduos afetados foi maior na China (IAH $\geq$ 5, 176 milhões [23,6%]; IAH $\geq$ 15, 66 milhões [8,8%]), seguido pelos EUA (IAH $\geq$ 5, 54 milhões [33,2%]; IAH $\geq$ 15, 24 milhões [14,5%]), Brasil (IAH $\geq$ 5, 49 milhões [49,7%]; IAH $\geq$ 15, 25 milhões [26%]) e Índia (IAH $\geq$ 5, 52 milhões [9,6%]; IAH $\geq$ 15, 29 milhões [5,4%]) (Figura 3). Quando expresso como prevalência, a presença de AOS para cada país foi demonstrada através do mapa de aquecimento global para IAH de cinco ou mais eventos por hora (Figura 4).



**Figura 3.** Os dez principais países com o maior número estimado de indivíduos com apneia obstrutiva do sono com base nos critérios da Academia Americana de Medicina do Sono de 2012. AHI (*Apnea Hypopnea Index*).<sup>2</sup>





**Figura 4.** Mapa de aquecimento global da prevalência de apneia obstrutiva do sono (IAH $\geq$ 5) para cada país.

AOS aumenta índices de mortalidade. Estudo observacional publicado na *Lancet* em 2005<sup>48</sup> comparou a incidência de eventos cardiovasculares fatais e não fatais em roncoadores simples, pacientes com AOS não tratada, pacientes tratados com pressão positiva contínua nas vias aéreas (*continuous positive airway pressure*; CPAP) e homens saudáveis recrutados da população em geral. Nos homens, a presença de AOS grave aumentou significativamente o risco de eventos cardiovasculares fatais (OR 2,87; IC95% 1,17-7,51) e não fatais (OR 3,17; IC95% 1,12-7,51) em comparação com participantes saudáveis, sendo que o tratamento com CPAP reduziu esse risco. Outro estudo reforça a alta taxa de mortalidade em sujeitos com AOS através de uma análise da coorte OLDOSA (*Obstructive Lung Disease and Obstructive Sleep Apnea*).<sup>49</sup> Nela, foram acompanhados por 10 anos quase 5 mil veteranos que tiveram alguma hospitalização por asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e AOS. Observou-se que a taxa de mortalidade acumulada por todas as causas nesse período foi de 52,8% e o tempo médio de

morte foi de 2,7 anos. Em pacientes com AOS que não estavam em terapia com CPAP, após ajuste para idade, comorbidades e função pulmonar, o risco de morte foi 1,34 vezes maior do que naqueles em tratamento (IC95% 1,05-1,71). Da mesma forma, em pacientes com AOS não aderentes à terapia com CPAP, o risco ajustado de morte foi 1,78 vezes maior (IC95% 1,13-2,82) em comparação com aqueles que o utilizaram pelo menos 70% das noites e mais de 4 horas noturnas.

### 2.3 APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO E HIPERTENSÃO

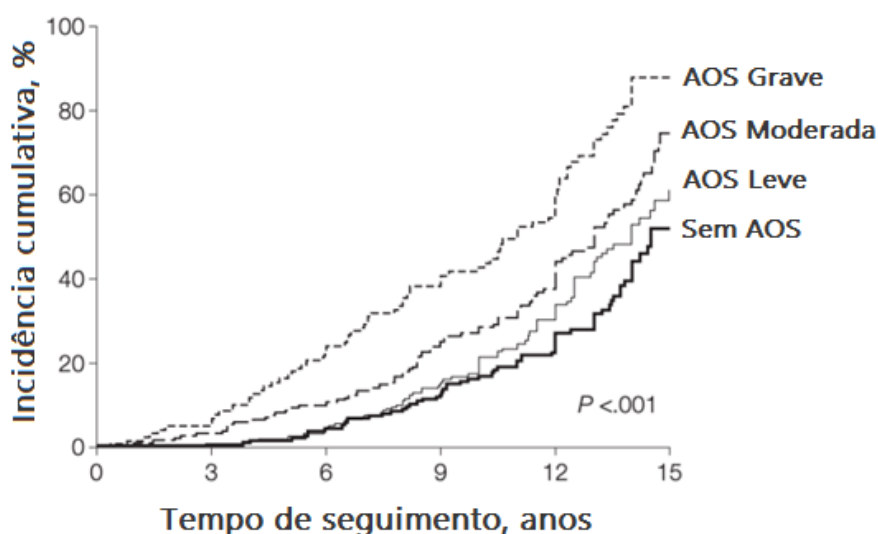
Em 2010, a prevalência global da HAS foi estimada em aproximadamente 1,4 bilhão de casos, e provavelmente excederá 1,6 bilhão até 2025.<sup>50</sup> Em 2016, as doenças não transmissíveis representaram 40,5 milhões ou 71% das mortes em todo o mundo, com 17,9 milhões ou 44% das mortes decorrentes de DCVs com HAS representando o principal fator de risco.<sup>51</sup> Tendo em vista o crescente número de indivíduos acometidos por essa patologia, é necessário promover não apenas a prevenção da HAS, como também seu manejo eficaz e atualizado.<sup>52</sup>

Desde o ano de 2000, após a publicação de três artigos que juntos somaram mais de 9 mil participantes, a base epidemiológica para a aceitação da AOS como causa secundária de HAS foi fundamentada.<sup>53</sup> O maior estudo transversal realizado até o momento<sup>4</sup> utilizou os dados da avaliação basal do *Sleep Heart Health Study*, estudo de coorte da relação entre transtornos respiratórios do sono e DCVs.<sup>54</sup> Na amostra de 6132 pessoas (idade  $\geq$  40 anos; 52,8% do sexo feminino), observou-se a crescente associação entre DRS e HAS em indivíduos de meia-idade e idosos, de diferentes sexos e origens étnicas. Após o ajuste para variáveis demográficas e antropométricas (incluindo IMC, circunferência do pescoço e razão

cintura/quadril), bem como para ingestão de álcool e tabagismo, a razão de chance para HAS, comparando a categoria mais alta de IAH ( $\geq 30/h$ ) com a categoria mais baixa ( $< 1,5/h$ ), foi de 1,37 (IC95% 1,03-1,83). O outro estudo de coorte, dos mais citados na literatura do sono, *Wisconsin Sleep Cohort Study*, avaliou 709 pacientes com seguimento mínimo de 4 anos e encontrou resultados semelhantes, com significativa relação crescente entre IAH e o risco de HAS, mas a partir de valores de IAH tão baixos quanto 0,1/h.<sup>5</sup> Em relação à categoria de referência de IAH=0 eventos por hora na linha de base, as razões de chances para a presença de HAS foram: 1,42 (IC95% 1,13-1,78) com IAH de 0,1 a 4,9 eventos por hora na linha de base, em comparação com nenhum evento; 2,03 (IC95% 1,29-3,17) com IAH de 5,0 a 14,9 eventos por hora; e 2,89 (IC95% 1,46-5,64) com IAH de 15,0 ou mais eventos por hora. Outro estudo transversal<sup>55</sup>, com 2677 participantes, demonstrou significativa associação entre HAS e aumento da gravidade da AOS. Regressão logística múltipla mostrou que cada evento apneico adicional por hora do sono aumentou as chances de HAS em cerca de 1%, enquanto cada 10% de redução na saturação de oxigênio noturno aumentou as chances em 13%. A partir desses dados, pôde-se concluir que há relação direta e independente entre o grau de transtorno respiratório do sono e o risco para desenvolvimento de HAS.

Em outro estudo publicado que avaliou uma população de 1889 indivíduos em seguimento de 12,2 anos<sup>56</sup>, foram observados 705 casos (37,3%) de HAS incidente. A presença de AOS foi associada ao aumento do risco ajustado de HAS incidente e o tratamento com CPAP foi associado a um menor risco de HAS (Figura 5). A incidência bruta de HAS por 100 pessoas-ano foi de 2,19 (IC95% 1,71-2,67) nos sujeitos do grupo controle; de 3,34 (IC95% 2,85-3,82) em pacientes com AOS não elegíveis para terapia com CPAP; 5,84 (IC95% 4,82-6,86) em pacientes com AOS que recusaram terapia com CPAP; 5,12 (IC95%, 3,76-6,47) em pacientes com AOS não aderentes à terapia com CPAP; e 3,06 (IC95% 2,70-3,41) em pacientes com AOS e tratados com CPAP. Comparados aos controles, as *hazard ratios* ajustadas para HAS

incidente foram maiores entre os pacientes com AOS inelegíveis para terapia com CPAP (1,33; IC95% 1,01-1,75), entre aqueles que recusaram a terapia com CPAP (1,96; IC95% 1,44-2,66), e entre os não aderentes à terapia com CPAP (1,78; IC95% 1,23-2,58), sendo menor nos pacientes com AOS tratados com CPAP (0,71; IC95% 0,53-0,94).



**Figura 5.** A gravidade da apneia obstrutiva do sono (AOS) foi definida pelo índice de apneia e hipopneia (IAH) como: Sem AOS (IAH<5), AOS leve (IAH, 5,0-14,9), AOS moderada (IAH, 15-29,9) e AOS grave (IAH $\geq$ 30). O valor de P fornece a diferença de sobrevida geral entre os 4 grupos de estudo. Adaptada de Marin et al.<sup>56</sup>

Os episódios repetitivos de hipóxia que ocorrem na AOS podem ativar várias vias patológicas que podem levar à disfunção endotelial e DCVs.<sup>3</sup> De fato, a AOS é considerada um fator de risco independente para DCV, com eventos cardiovasculares ocorrendo três vezes mais frequentemente em pacientes com AOS em comparação aos controles<sup>57</sup>, não só na HAS<sup>4,5,58</sup>, mas também na doença arterial coronariana (DAC), insuficiência cardíaca congestiva e eventos cerebrovasculares.<sup>59</sup>

Outro aspecto que deve ser levado em consideração na HAS são os casos de HAS resistente, pois apresentam maior risco para problemas cardiovasculares.<sup>60</sup> Pacientes que não

respondem ao tratamento da HAS representam um problema clínico intrigante e é comum atribuir a responsabilidade da dificuldade de controle pressórico ao paciente por não aderir adequadamente à terapêutica. Este, porém, não é sempre o caso. Existe embasamento epidemiológico para que se considere a investigação da existência de AOS e o seu tratamento sempre que for difícil o controle da PA.<sup>61</sup> Logan et al.<sup>62</sup> relataram encontrar IAH $\geq$ 10 em 83% dos casos de HAS resistente. Pedrosa et al.<sup>63</sup> Avaliaram causas secundárias de HAS entre 125 pacientes (idade de 52,1 anos; 43% da pressão arterial sistólica e diastólica com 176,31 e 107,19 mm Hg, respectivamente). A AOS com IAH $\geq$ 15 foi a condição mais comumente associada à HAS resistente (64,0%). Foram considerados preditores de AOS: idade $>$ 50 anos (OR 5,2; IC95% 1,9-14,2), circunferência do pescoço $\geq$ 41 cm para mulheres e  $\geq$ 43 cm para homens (OR 4,7; IC95% 1,3-16,9) e presença de ronco (OR 3,7; IC95% 1,3-11).

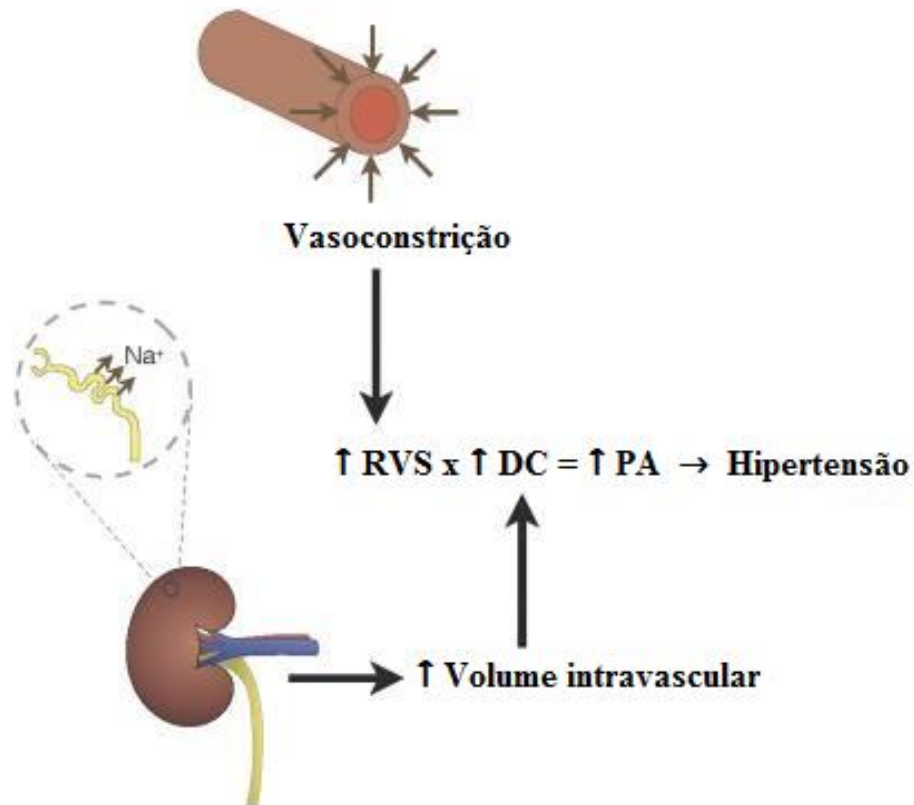
Nosso grupo de pesquisa investigou a associação entre AOS e HAS resistente em estudo controlado.<sup>64</sup> Numa amostra de 126 indivíduos com HAS do ambulatório especializado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, mediu-se a PA por monitorização ambulatorial e o IAH por polissonografia portátil. Entre os 63 casos de HAS resistente, 71% tinham IAH acima de 10 eventos por hora, valor semelhante ao relatado por Logan et al.<sup>62</sup> Nos 63 casos com a PA controlada, a prevalência de IAH $>$ 10/h foi significativamente inferior, 38%. Controlando os fatores sexo, idade e IMC, a única diferença significativa entre os grupos foi o IAH. Observou-se uma curva dose-resposta positiva entre o IAH e a prevalência de HAS resistente. Entre os casos com IAH normal, ocorreu HAS resistente em 31% dos casos; já entre os indivíduos com IAH $>$ 30, a prevalência alcançou 86%.

O CPAP é o tratamento padrão em pacientes com AOS moderada a grave, melhora a sonolência e reduz a PA.<sup>65</sup> No entanto, 46 a 83% dos pacientes com AOS foram relatados como não aderentes à terapia com CPAP.<sup>66</sup> Os resultados do recente estudo SAVE (*Sleep Apnea cardioVascular Endpoints*) indicaram que a prescrição de CPAP não impediu a ocorrência de

eventos cardiovasculares em pacientes com AOS moderada a grave e DCV estabelecida, quando comparada àqueles que receberam somente os cuidados usuais.<sup>67</sup> Isso pode ser em parte devido à adesão relativamente baixa, de menos de 4 horas por noite ao uso do CPAP. Dessa forma, outros tratamentos são necessários para melhorar a saúde cardiovascular em pacientes com AOS.

Através da criação do modelo de hipóxia intermitente cíclica noturna em humanos saudáveis, é possível estudar as consequências cardiovasculares e metabólicas da AOS.<sup>68</sup> Utilizando esse modelo é possível verificar o aumento da PA e sua manutenção ao longo das horas de vigília, além da fase aguda imediatamente após a exposição.<sup>69</sup> Em um estudo que utilizou uma única exposição hipóxica de 6 horas, houve aumento da pressão arterial média que foi associado à ativação do sistema nervoso simpático, aumento da resistência vascular sistêmica (RVS)<sup>70</sup> e ao aumento da tensão arterial pela ativação do receptor tipo I da angiotensina II.<sup>71</sup>

Além do fator simpático, o controle da PA é compartilhado pelos rins. Como a PA está relacionada ao débito cardíaco (DC) e à RVS pela equação  $PA=DC \times RVS$ , aumentos no DC ou na RVS devem produzir aumentos da PA (Figura 6).



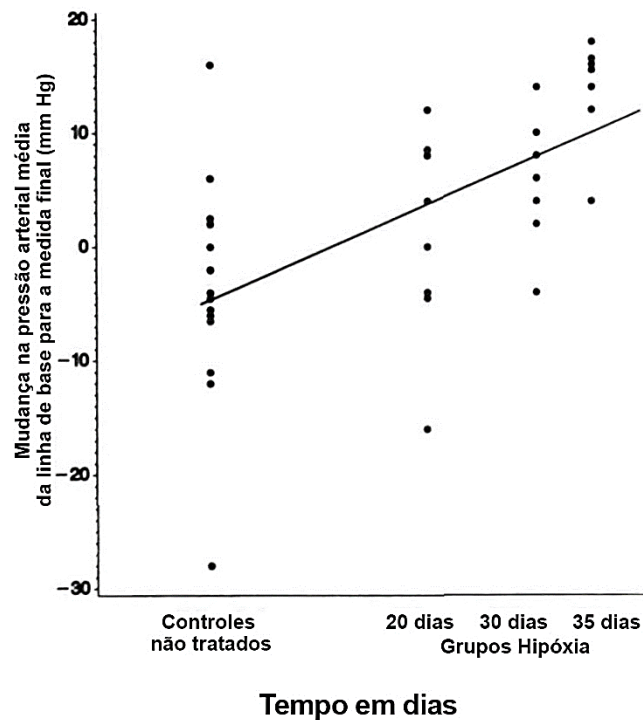
**Figura 6.** Resistência vascular sistêmica (RVS) *versus* rim: a pressão arterial (PA) é o produto da resistência vascular sistêmica (RVS) e do débito cardíaco (DC) ( $PA=RVS \times DC$ ). Alterações na reabsorção de  $Na^+$  aumentam ou diminuem o volume intravascular e resultam em aumento ou diminuição do DC, o que altera a PA. Da mesma forma, alterações no tônus vascular podem aumentar ou diminuir a RVS, o que leva a um aumento ou diminuição da PA. Adaptada de Brozovich et al.<sup>25</sup>

Embora os mecanismos da HAS pareçam simples e relativamente diretos, mais de 50 anos de investigação ainda não definiram a base molecular subjacente a essa condição médica.<sup>25</sup>

## 2.4 MODELOS DE APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO UTILIZANDO HIPÓXIA INTERMITENTE

Devido à alta prevalência de AOS em humanos e seu impacto adverso em parâmetros cardiometabólicos, neurocognitivos e psicocomportamentais, modelos experimentais de AOS foram desenvolvidos em roedores para melhorar o estudo e a compreensão dessa patologia. O modelo clássico envolve insuflação de nitrogênio nas gaiolas para produzir HIC e simular os breves períodos repetidos de hipóxia e reoxigenação que caracterizam a AOS. Fletcher et al.<sup>72</sup> foram pioneiros no uso de HIC em ratos Wistar em 1992, em estudo que examinou o impacto da hipóxia episódica na PA. Com base em estudos observacionais em humanos com AOS, os autores levantaram a hipótese de que a HIC levaria a elevações agudas e crônicas da PA. Ratos foram alojados em câmaras hipóxicas que permitiram a administração programada de nitrogênio para reduzir a concentração ambiente de oxigênio para 3 a 5% por aproximadamente 3 a 6 segundos, seguida por retorno gradual a uma concentração normal de 21% de oxigênio. O ciclo foi repetido duas vezes por minuto, durante 6 a 8 horas por dia, durante 35 dias consecutivos. Os ratos expostos à HIC exibiram aumento da PA (Figura 7), bem como evidência de hipertrofia ventricular esquerda. Com isso, foi demonstrado um fenótipo compartilhado de HAS tanto na AOS humana quanto na HIC em roedores, fornecendo evidências precoces de que o modelo de roedor serve como ferramenta útil para estudar as sequelas da AOS.





**Figura 7.** O gráfico de dispersão mostra mudança na pressão arterial média da linha de base para a medição final em controles não tratados (sem exposição a hipóxia) e ratos expostos a 20, 30 e 35 dias de hipóxia episódica. O declive linear de 0,42 mm Hg/dia indica uma resposta de diminuição da exposição à hipóxia episódica. Adaptada de Fletcher et al.<sup>72</sup>

Os períodos de hipóxia podem agir de maneiras diferentes no organismo. No caso de habitantes de altas altitudes ou de pneumopatas, a hipóxia sustentada e crônica permite adaptação, envolvendo processos moleculares e genômicos.<sup>73</sup> A HIC que ocorre na AOS, entretanto, tem consequências sobre vários tecidos, sem papel adaptativo aparente. As oscilações da concentração de oxigênio causada pelas apneias expõem os pacientes a processos semelhantes ao de isquemia/reperfusão, ensejando a produção de radicais livres e estresse oxidativo.<sup>74</sup> A literatura descreve modelos em cães, coelhos, porcos, ratos e camundongos ou mesmo em culturas de células<sup>75</sup> para simular os danos potenciais a que estão expostos sujeitos com AOS. Estes experimentos demonstraram o surgimento de HAS após curtos períodos de hipóxia intermitente.<sup>76</sup> Alguns dos modelos não reproduzem a real situação da AOS por usar

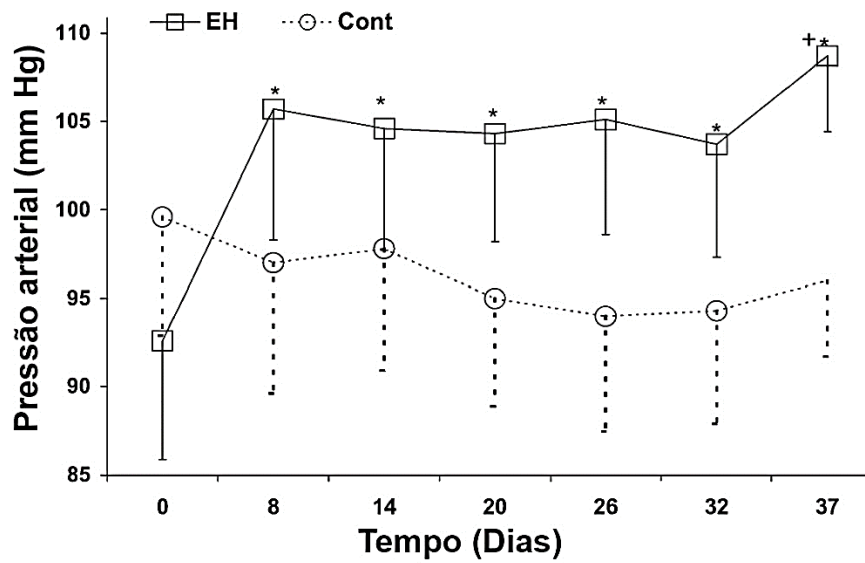
tempos de exposição a hipóxia muito variados. Por exemplo, protocolos de HIC com duração de 12 segundos, seguido por 18 segundos de normóxia,<sup>77</sup> ou períodos de hipóxia de 3 minutos alternados com períodos de normóxia de 3 minutos.<sup>78</sup> O modelo mais comumente utilizado inclui 30 segundos de hipóxia alternados com 30 segundos de normóxia durante oito horas.

Durante uma apneia ocorre elevação transitória da PA. No entanto, é importante entender o motivo do surgimento da HAS sustentada nos indivíduos com AOS. Em estudos clínicos, atribui-se o aumento sustentado da PA na AOS aos mais diversos mecanismos, incluindo hiperatividade do simpático<sup>79</sup>, estresse oxidativo e aumento da endotelina-1.<sup>80</sup> Estudos experimentais em cães<sup>76</sup> e ratos<sup>72</sup> apoiam a hipótese de que é a HIC e não a fragmentação do sono que causa a HAS sustentada. Ainda não está esclarecida a participação de mecanismos centrais e periféricos na elevação da PA. Dessa forma, algumas medicações já foram testadas para tentar entender os mecanismos envolvidos nesse processo.<sup>81</sup>

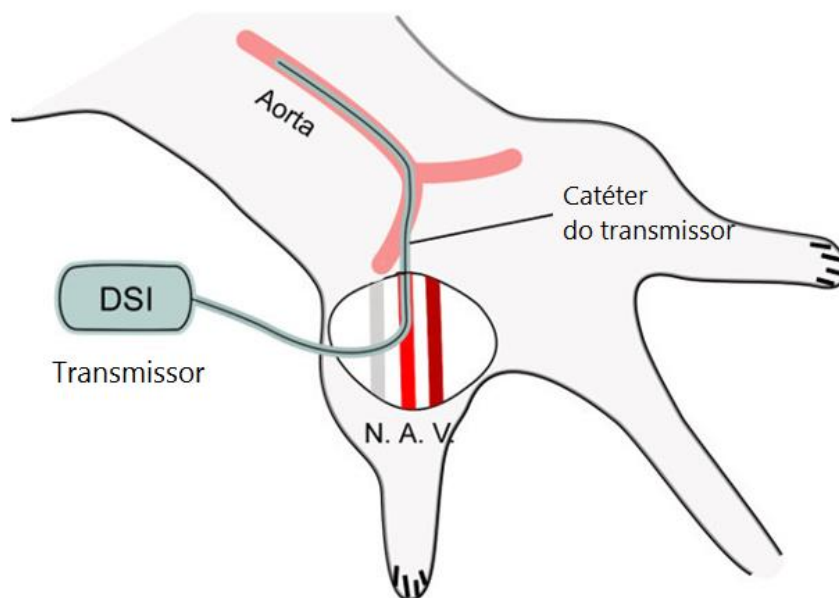
Macitentan, um antagonista do receptor de endotelina, usado no tratamento da hipertensão arterial pulmonar, impediu o aumento da pressão da PA causado exclusivamente por doença renal crônica, duas semanas de HIC ou a combinação de doença renal crônica com HIC, em ratos Sprague-Dawley. Após esse período, o macitentan reverteu a hipertensão em todos os grupos, mesmo sem melhorar a função renal.<sup>82</sup> O carvedilol, um betabloqueador não seletivo que exibe atividades intrínsecas anti- $\alpha$ 1-adrenérgicas e antioxidantes, foi usado para reverter a hipertensão induzida por HIC, promovendo redução significativa da frequência cardíaca, mas não alterando a PA.<sup>83</sup> Del Rio et al.<sup>84</sup> estudaram os efeitos do agente anti-inflamatório não esteroide ibuprofeno nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no corpo carotídeo de ratos, a potencialização das respostas quimiossensoriais do corpo carotídeo e o desenvolvimento de hipertensão após 21 dias de HIC. Eles descobriram que o ibuprofeno evitou a superexpressão das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no corpo carotídeo e na hipertensão, mas não conseguiu bloquear as respostas quimiossensoriais aumentadas do corpo carotídeo à hipóxia. Assim, é provável que

os níveis de citocinas pró-inflamatórias possam contribuir para a hipertensão induzida por HIC, atuando em outros níveis da via quimiorreflexa. O tratamento sistêmico com ibuprofeno também evitou o aumento do número de neurônios c- fos positivos na porção caudal do núcleo do trato solitário (NTS) em ratos expostos à HIC por 21 dias.

Para a escolha do número de dias em que os animais ficaram submetidos ao protocolo de HIC em nosso estudo, utilizamos como base o estudo de Tawahi et al.<sup>77</sup>, que observou aumento significativo da PA a partir de 8 dias de exposição à HIC e que permaneceu elevada até o final dos 37 dias do protocolo verificada por telemetria (Figura 8). Outro estudo publicado no *Hypertension*, apresentou elevação da PA após 7 dias de exposição à HIC.<sup>78</sup> Dessa forma, mantivemos a escolha de um período de 14 dias de exposição à HIC em nosso protocolo (Apêndice 1). Nosso grupo de pesquisa já desenvolveu estudos com o modelo de HIC em ratos e camundongos<sup>85,86,87,88,89,90,91,92,93</sup>, mas esse foi o primeiro a utilizar o sistema de telemetria para verificação da PA. O sensor de telemetria foi inserido na artéria femoral dos animais e sua bateria alocada subcutaneamente na região abdominal inferior (Figura 9).<sup>94</sup>

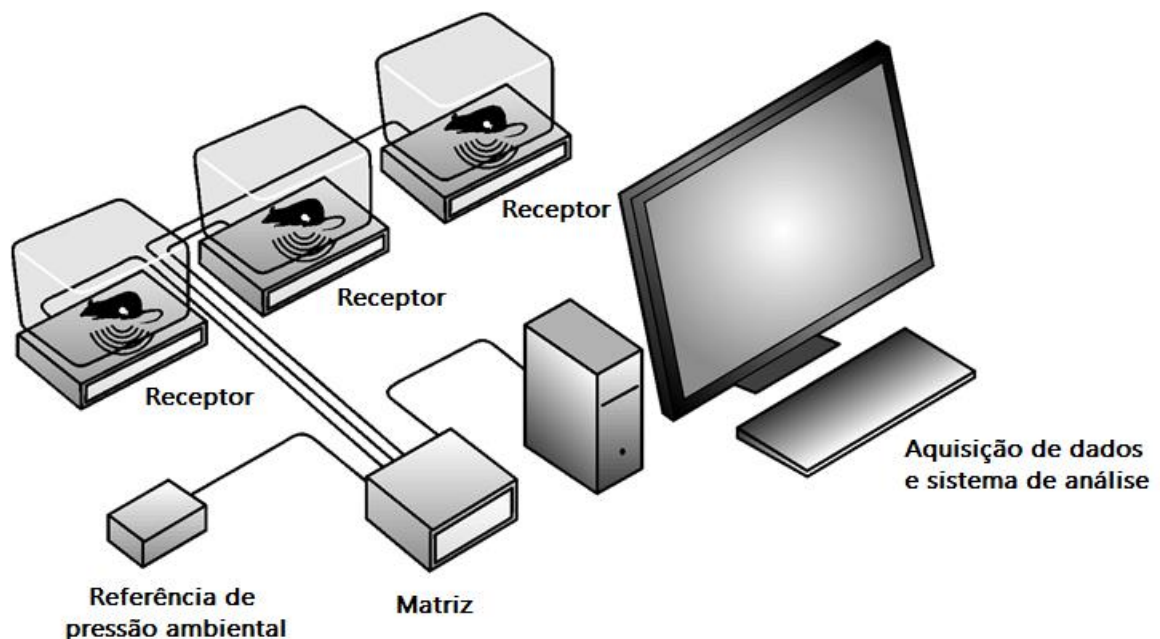


**Figura 8.** Controles (representados pelos círculos, *controls-Cont*) não demonstram aumento da pressão arterial após 37 dias de protocolo. Animais submetidos a exposição de hipóxia episódica (representados pelos quadrados, *episodic hypoxia-EH*) demonstraram elevação da pressão arterial nos primeiros 8 dias. Adaptada de Tahawi et al.<sup>77</sup>



**Figura 9.** Diagrama mostrando o cateterismo da artéria femoral para inserção do sensor de telemetria. A artéria femoral (A.) foi dissecada do nervo (N.) e veia (V.) e, em seguida perfurada. O cateter conectado ao transmissor foi inserido na artéria, colocando a ponta do cateter no nível da aorta torácica para registro cardiovascular (~4 cm). Adaptado de Hou, Blesch e Lu.<sup>94</sup>

Em nosso estudo, os animais foram alojados em gaiolas individuais e mantidos em câmaras de acrílico com volume de 21 litros equipadas com sensor de O<sub>2</sub>. As injeções de nitrogênio foram reguladas por uma válvula solenoide operada por um sistema automático (Apêndice 2). O protocolo de HIC consistiu em 30 segundos de injeção de nitrogênio para reduzir a fração inspirada de oxigênio (F<sub>I</sub>O<sub>2</sub>) para ~6% mantida durante pausa de 5 segundos na injeção de gás. Posteriormente, o ar ambiente foi introduzido na câmara usando ventilador para retornar a F<sub>I</sub>O<sub>2</sub> a 21% durante os próximos 30 segundos, seguido por pausa de 5 segundos do ventilador. Esse ciclo de 70 segundos foi repetido por 8 horas por dia, das 9:00 às 17:00 horas, por 14 dias, simulando IAH de ~50/h. As medições da PA foram realizadas diariamente através do sistema de telemetria *Data Science International* (EUA) (Figura 10).<sup>95</sup>



**Figura 10.** Diagrama do sistema de telemetria, incluindo receptores de telemetria, matriz e computador de aquisição de dados. *Data Science International, DSI*.<sup>95</sup>

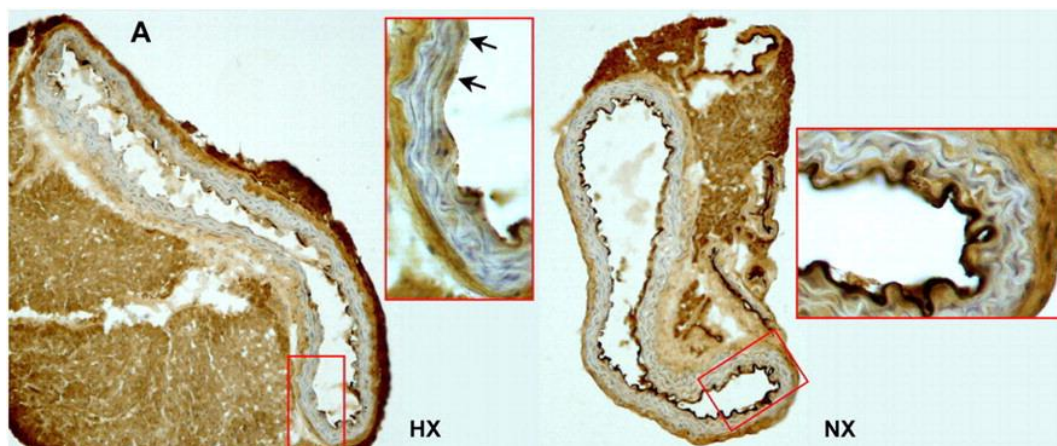
O emprego da telemetria permite medidas confiáveis da PA em roedores. O método evita a alteração da PA decorrente da manipulação dos animais. A telemetria é o método mais avançado para monitoramento de funções fisiológicas de animais de laboratório.<sup>96</sup> A técnica invasiva combina sensores dentro de cavidades corporais e transmissores para detectar e transmitir sinais biológicos dos animais para um receptor remoto que converte o sinal analógico de frequência em sinal digital a ser inserido em sistema de aquisição de dados computadorizado.<sup>97</sup> É amplamente reconhecido que a telemetria pode oferecer uma série de vantagens no que diz respeito a qualidade e quantidade de dados coletados. Autores destacam potenciais benefícios da telemetria<sup>98</sup> na redução do estresse animal quando comparada às técnicas de medição convencionais, eliminação de potenciais fontes de artefatos experimentais e redução do uso de animais em até 90%.

A precisão das medidas oferecidas pela telemetria tem particular importância para a interpretação de estudos e entendimento da fisiologia de doenças vasculares, tais como a DCV e a HAS.<sup>99</sup> A telemetria tornou-se padrão ouro para aferição da PA em animais de laboratório por permitir medições diretas e contínuas sem a necessidade de restrição ou o uso de dispositivos de contenção, reduzindo ou eliminando o desconforto causado por outros métodos.<sup>96</sup> Em cenário onde a variabilidade da PA é bastante aumentada e até o estresse leve pode causar uma medida de PA anormalmente alta, a capacidade de obter registros contínuos e precisos é bastante valiosa para investigar relações quantitativas entre a PA e outras variáveis.

## 2.5 ALTERAÇÕES VASCULARES NA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO

A HIC observada na AOS, ao produzir estresse oxidativo e inflamação, favorece a disfunção endotelial, que tem papel causal na promoção de alterações vasculares estruturais e funcionais, como remodelamento vascular e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO).<sup>17</sup> Na AOS, foi demonstrado que as células endoteliais venosas de pacientes apneicos exibiram estresse oxidativo local e inflamação relacionados à diminuição da biodisponibilidade de NO e à diminuição da dilatação mediada pelo fluxo.<sup>100</sup> Estudos experimentais em roedores demonstraram que a HIC representa um fator causal de remodelamento vascular e hipertensão<sup>18,19,20,21,22</sup>, por inflamação vascular e estresse oxidativo. A confirmação de patologias endoteliais sugere que as consequências a longo prazo da AOS não tratada incluem danos em vários sistemas orgânicos.<sup>101</sup>

Alterações vasculares importantes são relatadas em animais submetidos a protocolos de HIC.<sup>102</sup> Em camundongos, 35 dias de HIC induziu remodelação cardiovascular funcional e histológica em camundongos, com a redução de molécula de adesão celular endotelial a plaquetas-1 (*platelet and endothelial cell adhesion molecule 1*; PECAM-1) na aorta e no tecido cardíaco, mais especificamente no ventrículo esquerdo, deixando dúvidas se essa alteração representa marcador de disfunção endotelial ou evento aterogênico precoce (Figura 11).<sup>103</sup>

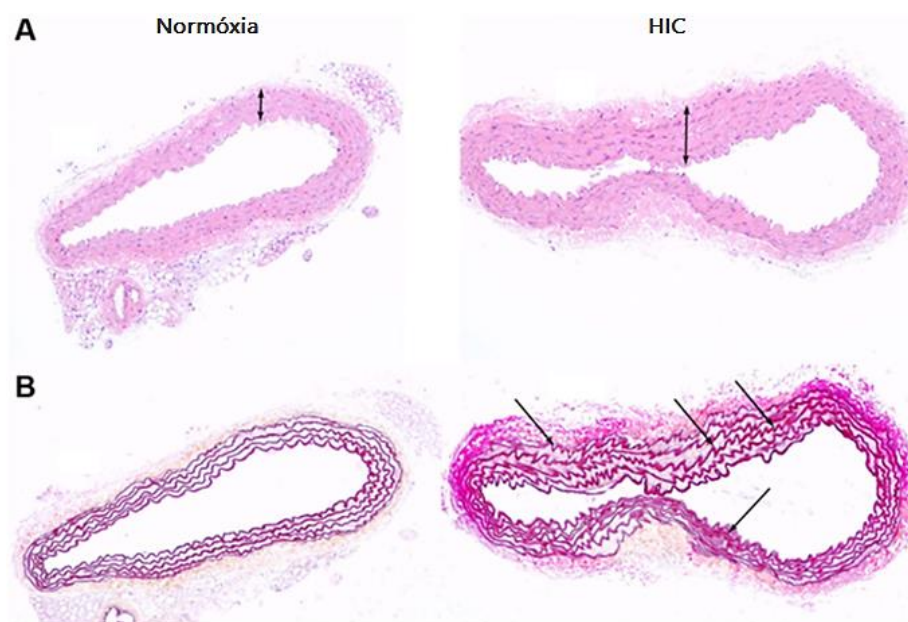


**Figura 11.** Alterações histológicas cardiovasculares induzidas por 14 dias de hipóxia intermitente. (A) Imunomarcagem da molécula de adesão celular endotelial plaquetária-1 (PECAM-1) de cortes transversais da aorta (ampliação 10×10; inserções, ampliação 10×40) diminuiu em camundongos hipóxicos (HX) *versus* normóxicos (NX), sem denudação endotelial, como sugerido pela presença de núcleos de células endoteliais (ampliação de 10×40, setas). Adaptado de Dematteis et al.<sup>103</sup>

A HAS é uma das patologias cardiovasculares que pode acelerar a ocorrência precoce do declínio da função relacionado à idade.<sup>104</sup> No sistema vascular, isso é caracterizado por remodelação patológica progressiva com enrijecimento<sup>105</sup>, tipicamente associada a alterações no colágeno e elastina da matriz extracelular.<sup>106</sup> Embora a HAS e a aterosclerose estejam associadas ao acúmulo de marcadores de envelhecimento celular na parede vascular, essas condições geralmente estão associadas à disfunção vascular e não à simples perda de capacidade proliferativa.<sup>107</sup> Dessa forma, a determinação da idade vascular foi introduzida nas principais diretrizes clínicas para prevenção cardiovascular, para indicar ao paciente como seu estilo de vida contribui à aceleração da deterioração da função vascular.<sup>108</sup> Estresse oxidativo e inflamação, os principais mecanismos de disfunção endotelial e dano arterial, estão vinculados à doença vascular, rigidez arterial e envelhecimento.<sup>109</sup> Para exemplificar, estudo publicado no *The New England Journal of Medicine*<sup>110</sup>, observou que as espessuras íntima-média da artéria carótida comum interna e média máxima predizem resultados cardiovasculares, mas apenas a espessura íntima-média da artéria carótida interna melhora significativamente a classificação



do risco de DCV verificado em sujeitos da coorte do *Framingham Offspring Study*. Em camundongos expostos a 20 semanas de HIC<sup>111</sup>, foi observado aumento da acumulação e proliferação de macrófagos metabólicos pró-inflamatórios do tipo M1 que expressam CD36 na aorta, conhecidos por mediar o desenvolvimento da aterosclerose. Através da análise histológica das aortas, foi observado aumento da espessura íntima-média e perturbação da integridade das lâminas elásticas dos animais expostos do protocolo de HIC (Figura 12). Foram observadas também a ativação de vias pró-aterogênicas envolvendo uma interação complexa de modificações de histonas em vias biológicas funcionalmente relevantes, como inflamação e estresse oxidativo em macrófagos da aorta. A descontinuação da HIC não provocou melhorias significativas no fenótipo de macrófagos da parede da aorta. No entanto, as alterações da aorta induzidas por HIC estavam ausentes em camundongos *knockout* para CD36.

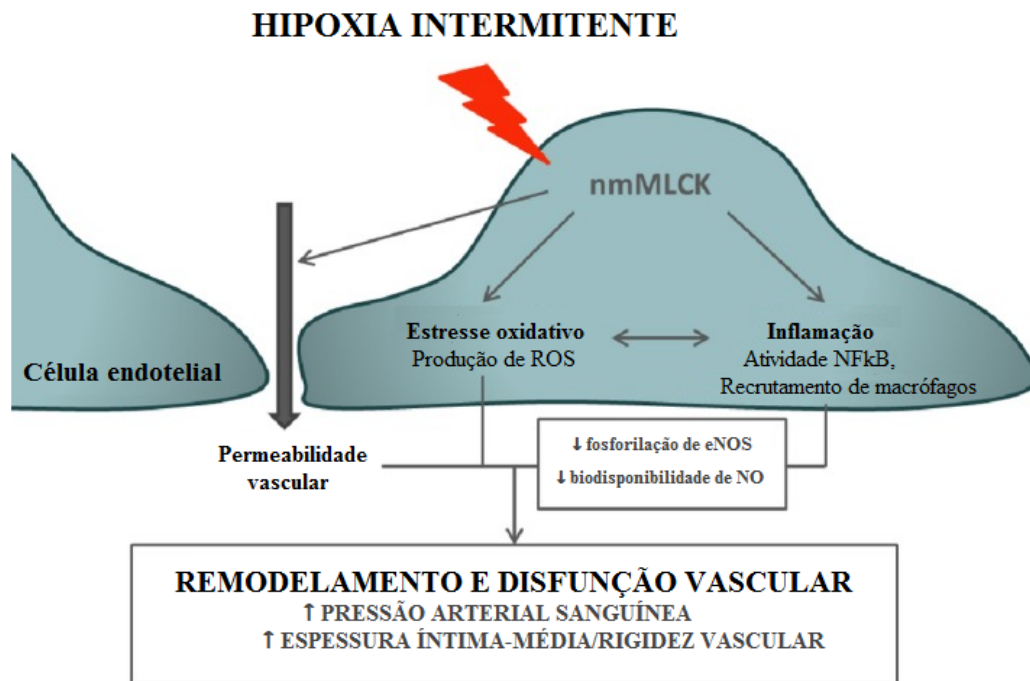


**Figura 12.** Análise histológica de aortas mostrando aumento da espessura íntima-média (painel A, superior) e perturbação da integridade das lâminas elásticas (painel B, inferior). Aortas foram coletadas de camundongos expostos a 20 semanas de hipóxia intermitente crônica (HIC, direita) e controles (normóxia, esquerda). Adaptada de Cortese et al.<sup>111</sup>

A HIC pode induzir a proliferação excessiva de células vasculares lisas que podem estar relacionadas à incidência ou progressão de várias doenças.<sup>102</sup> As células do músculo liso controlam o calibre da parede do vaso e, portanto, o fluxo sanguíneo, através da ação coordenada de muitas proteínas citoesqueléticas e contráteis. Assim, as células do músculo liso na parede dos vasos exibem fenótipo propício à contração e apoio estrutural.<sup>112</sup> Esse chamado fenótipo contrátil está comprometido em uma variedade de distúrbios vasculares, incluindo aterosclerose, arteriopatia após transplante, HAS e falha do enxerto de veias após cirurgia de revascularização do miocárdio.<sup>113</sup>

Estudo publicado em 2018 no *Journal of the American Heart Association*<sup>114</sup>, abordou o papel da quinase de cadeia leve da miosina não muscular (*non-muscle myosin light chain kinase*; nmMLCK) nas disfunções vasculares induzidas por HIC. A ativação dessa enzima tem sido associada a várias condições fisiopatológicas como inflamação vascular e aterosclerose<sup>115</sup>, lesão pulmonar aguda<sup>116</sup>, choque endotóxico<sup>117</sup> e queimaduras graves.<sup>118</sup> No estudo, camundongos submetidos a HIC, nmMLCK ativada se associa a alterações funcionais como elevação da PA, rigidez vascular e perturbações da sinalização de NO. A HIC causou disfunção da barreira endotelial com redução da resistência transendotelial e induziu o estresse oxidativo vascular associado ao remodelamento inflamatório, caracterizado pelo aumento da espessura média íntima e maior expressão e atividade de marcadores inflamatórios, como interferon- $\gamma$  e fator nuclear- $\kappa$ B, na parede vascular (Figura 13). Curiosamente, a deleção de nmMLCK impediu todas as alterações funcionais e estruturais induzidas por HIC, incluindo a restauração da sinalização de NO, correção da integridade da barreira endotelial e redução do estresse oxidativo e da resposta inflamatória associada. Dessa forma, a ativação da nmMLCK é mecanismo chave no desenvolvimento de estresse oxidativo vascular e de inflamação induzidos por HIC e no remodelamento funcional e estrutural; e as vias de sinalização relacionadas podem ser consideradas como alvos potenciais para o tratamento de complicações vasculares

relacionadas à hipóxia na AOS.

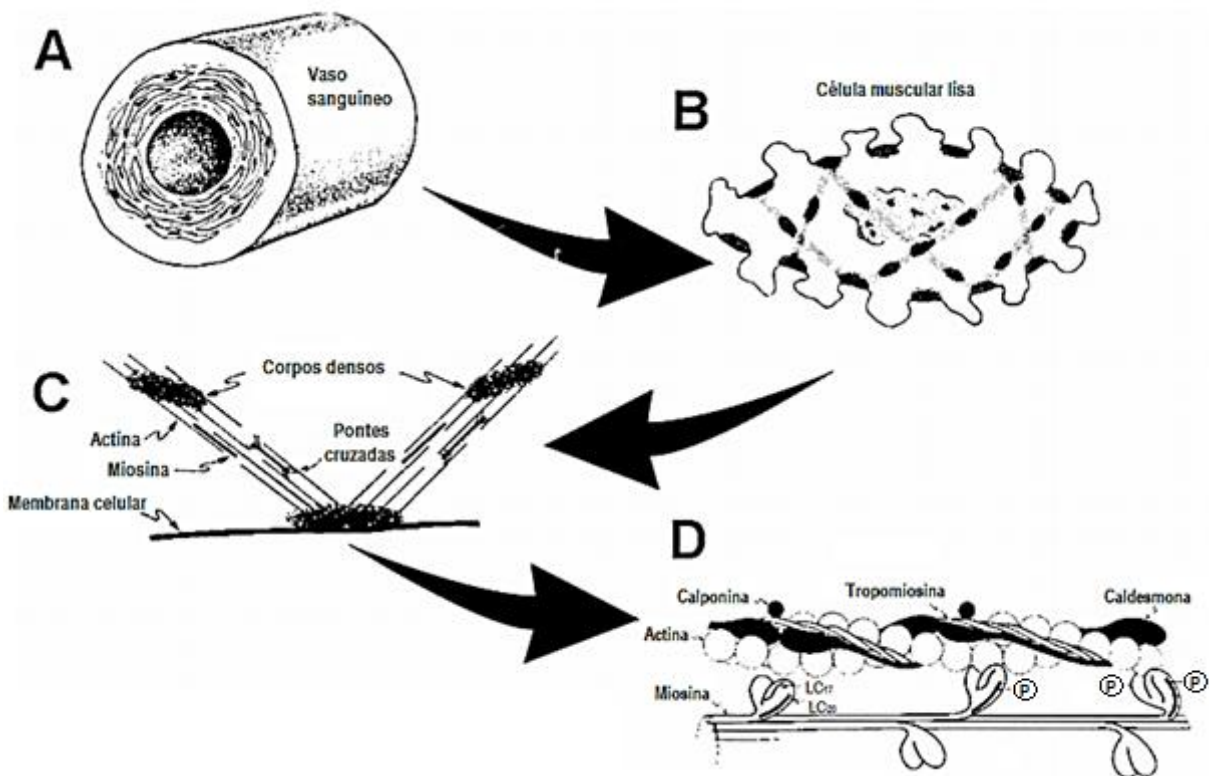


**Figura 13.** Papel da quinase de cadeia leve da miosina não muscular (nmMLCK) nas disfunções vasculares induzidas por hipóxia intermitente. A enzima multifuncional nmMLCK desempenha papel fundamental nas disfunções estruturais e funcionais induzidas pela HI, mediando distúrbios na sinalização endotelial de óxido nítrico (NO), estresse oxidativo, alteração da barreira endotelial e inflamação vascular. eNOS indica síntese de NO endotelial; NF-kB, fator nuclear-kB; e ROS, espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Arnaud et al.<sup>114</sup>

## 2.6 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO

Identificar os mecanismos envolvidos na contração do músculo liso vascular tem potencial para o entendimento de processos abrangidos na perpetuação da PA elevada. No entanto, o número de publicações sobre o controle da PA pelo músculo liso ainda permanece pequeno. O controle do músculo liso é involuntário, possuindo gatilhos para sua contração que

incluem hormônios, estimulação neural pelo sistema nervoso autônomo e fatores locais. A atividade contrátil no músculo liso é iniciada por uma interação de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina que estimula a fosforilação da cadeia leve da miosina (Figura 14).<sup>119</sup> A calmodulina, no músculo liso, participa no processo inicial de excitação e no início da fase de ponte cruzada que terminará na contração.<sup>120</sup> Para ativar a contração do músculo liso, a cabeça da cadeia leve da miosina deve ser fosforilada, o que é realizado pela quinase da cadeia leve da miosina. Essa quinase é ativada por calmodulina quando ocorre a ligação com o  $\text{Ca}^{2+}$ , tornando a contração do músculo liso dependente da presença de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>121</sup> Outra maneira pela qual a calmodulina afeta a contração muscular é controlando o movimento do  $\text{Ca}^{2+}$  nas membranas da célula e do retículo sarcoplasmático.<sup>122</sup> As bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  o retiram do citoplasma ou o armazenam no retículo endoplasmático e esse controle ajuda a regular processos a jusante. A remoção de  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol e a estimulação da miosina fosfatase iniciam o processo de relaxamento do músculo liso.<sup>123</sup>



**Figura 14.** Anatomia do sistema contrátil do músculo liso. (A) Corte transversal de um vaso sanguíneo mostrando as células musculares lisas dispostas circunferencialmente. (B) Ilustração de uma célula muscular lisa contraída. As unidades contráteis (áreas sombreadas) abrangem membrana a membrana e são compostas por corpos densos intracelulares e adesivos densos da membrana. À medida que as unidades contráteis aplicam força à membrana celular, grandes evaginações aparecem ao longo da membrana celular. (C) Ampliação de uma única unidade contrátil, mostrando a ligação de filamentos finos de actina aos corpos densos e adesivos densos na membrana celular. Os filamentos grossos de miosina possuem pontes cruzadas projetando-se em direção aos filamentos de actina. (D) Ilustração dos filamentos finos e grossos. O filamento da miosina é composto por moléculas individuais de miosina, com cada miosina tendo duas cabeças globulares. Cada cabeça possui duas cadeias leves associadas, cadeia leve essencial LC17 e cadeia leve reguladora LC20. O início da contração requer que a LC20 seja fosforilada (P, fosfato) por uma quinase da cadeia leve da miosina dependente de cálcio-calmodulina. O filamento de actina é uma hélice em fita dupla composta por monômeros de actina globulares individuais. O sistema regulador ligado à actina, atualmente previsto, é composto por tropomiosina, caldesmon e calponina. Adaptada de Guilford e Warshaw.<sup>124</sup>

Caldesmona e calponina, constituintes dos filamentos finos do músculo liso, são considerados moduladores potenciais da contração do músculo liso. Ambos interagem com a actina e inibem a atividade da ATPase (adenosinatrifosfatase) da actomiosina do músculo

liso.<sup>125</sup> A caldesmona é uma proteína que se liga à actomiosina, aumentando a capacidade de manter a contração e servindo como elemento mediador inibitório da contração muscular lisa  $\text{Ca}^{2+}$  dependente.<sup>126</sup> De forma semelhante, a calponina atua como regulador inibitório da contratilidade do músculo liso através da inibição das interações com actomiosina.<sup>127,128,129</sup>

Decidiu-se estudar a expressão de proteínas envolvidas na contração do músculo liso, actina, miosina, calmodulina, tropomiosina, caldesmona e calponina, por seu potencial de relevância. Por serem reguladoras inibitórias da contratilidade do músculo liso, caldesmona e calponina foram as proteínas analisadas em destaque no presente estudo.

Caldesmona é encontrada em abundância nas células musculares lisas.<sup>23</sup> Em mamíferos, a caldesmona é expressa em duas isoformas: h-caldesmona, de maior peso molecular (*high-caldesmon*) e expressa em células musculares lisas contráteis diferenciadas; e l-caldesmona, de menor peso molecular (*low-caldesmon*), sem a região central, e expressa em células musculares vasculares proliferativas e células não musculares.<sup>130</sup> Em nosso estudo utilizamos anticorpo para imunomarcagem de caldesmona que expressa as duas isoformas. A caldesmona é uma proteína reguladora potente e versátil, tanto na contratilidade quanto na motilidade celular<sup>26</sup>, sendo responsável pela inibição direta da atividade da miosina ATPase do músculo liso.<sup>25</sup> Foi proposto um modelo de contração em que, na fase sustentada de contração tônica, a tensão poderia ser mantida pela ligação da miosina à F-actina através da caldesmona. Essa contração é caracterizada por alta tensão com baixos níveis de fosforilação da miosina e consumo de energia, chamada de "*latch state*" (estado de trava).<sup>131</sup>

A calponina é uma proteína reguladora associada ao filamento de actina expressa no músculo liso e em outras células não musculares. As três isoformas de calponina, calponina 1 (básica), calponina 2 (neutra) e calponina 3 (ácida), são encontradas no tecido muscular liso em espécies de vertebrados. As três isoformas de calponina são proteínas de ligação à actina com funções na inibição da miosina ATPase ativada pela actina e na estabilização do citoesqueleto

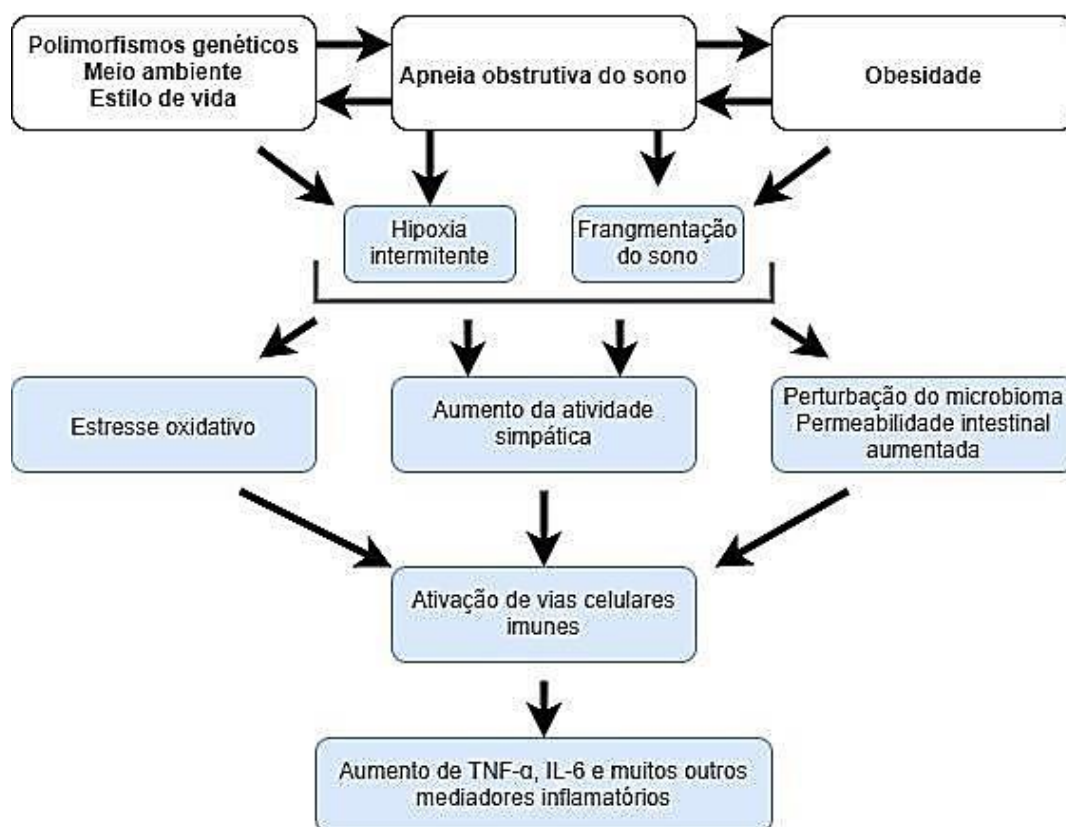
de actina, enquanto cada isoforma executa diferentes papéis fisiológicos com base em suas expressões específicas do tipo de célula. Em nosso estudo utilizamos anticorpo para imunomarcação de calponina 1. A calponina 1 é expressa especificamente nas células musculares lisas e desempenha papel de *fine-tuning* da contratilidade do músculo liso.<sup>24</sup> Evidências demonstraram o papel da calponina como proteína de ligação à actina que inibe a atividade da miosina ATPase do músculo liso<sup>132,133</sup>, dificultando o movimento dos filamentos de actina sobre as cabeças de miosina imobilizadas.<sup>23</sup>

## 2.7 INFLAMAÇÃO

A inflamação faz parte da complexa resposta biológica dos tecidos do corpo a estímulos prejudiciais, células danificadas ou a irritantes. Essa resposta protetora envolve células imunes, vasos sanguíneos e mediadores moleculares com função de eliminar a causa inicial da lesão e iniciar o reparo do tecido. A AOS se associa à inflamação através dos repetidos episódios de interrupção da respiração à noite, aumentando os marcadores inflamatórios. As cascatas inflamatórias envolvidas nesse processo ocorrem através de diferentes mediadores, como por exemplo, citocinas, interleucinas, prostaglandinas, entre outras.

David Gozal, o mais prolífico autor, com mais de 600 artigos na área dos efeitos da HIC, considera que os DRS em geral e, mais particularmente a AOS, deve ser vista como doença inflamatória crônica de baixo grau. Para dar suporte a essa hipótese reuniu evidências em humanos publicadas nas últimas décadas sobre o papel do TNF- $\alpha$  e da interleucina-6 (IL-6) no estado inflamatório proposto. Neste conceito, parte da assinatura fenotípica mórbida na AOS seria explicada causalmente por processos inflamatórios subjacentes, levando a disfunções de

órgãos-alvo (Figura 15).<sup>27</sup>



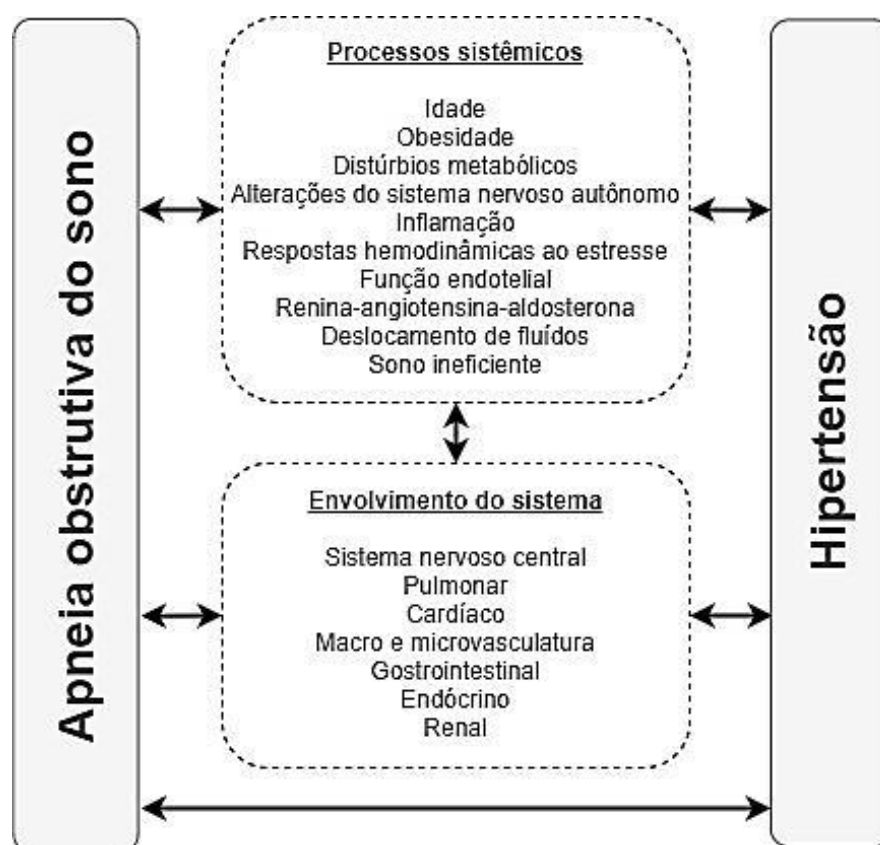
**Figura 15.** Diagrama esquemático que ilustra as interações putativas entre apneia obstrutiva do sono, obesidade e fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida, levando a uma cascata de vias fisiopatológicas que resultam em aumento da inflamação sistêmica, conforme ilustrado pelo aumento dos níveis do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6). Adaptada de Kheirandish-Gozal e Gozal.<sup>27</sup>

Buscando investigar se citocinas pró-inflamatórias no NTS podem desempenhar papel na hipertensão induzida por HIC, ratos Sprague-Dawley foram expostos a HIC por 7 a 28 dias. Os cérebros foram removidos e processados para medir IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no NTS usando imunofluorescência. No 21º dia do protocolo, os níveis de RNA mensageiro estavam significativamente aumentados no NTS de ratos expostos a HIC em comparação aos animais controle. No 28º dia, observou-se aumento significativo da imunofluorescência de IL-1 $\beta$ , IL-6



e TNF- $\alpha$  no NTS de ratos expostos a HIC em comparação aos animais controle. Os resultados sugerem que citocinas pró-inflamatórias no NTS podem contribuir para a manutenção da hipertensão em animais expostos à HIC.<sup>134</sup>

A relação entre AOS e HAS sugere que a HIC é provavelmente a causa da alta prevalência de HAS nessa população e que quimiorreceptores periféricos e do sistema nervoso simpático desempenham papéis importantes no processo fisiopatológico.<sup>135</sup> Por serem processos complexos e com etiologias multifatoriais, HAS e AOS apresentam possível caráter bidirecional das relações de causa-efeito (Figura 16).<sup>136</sup>



**Figura 16.** Representação esquemática das interações complexas e bidirecionais entre apneia obstrutiva do sono e hipertensão. Adaptada de Mikolajczyk e Guzik.<sup>136</sup>

A fisiopatologia das alterações induzidas por HIC inclui aumento de marcadores inflamatórios<sup>137</sup>, sendo que em modelo de AOS desenvolvido para humanos, 6 horas de exposição à HIC induziu aumento significativo nas pressões arteriais sistólica, diastólica e média.<sup>72</sup> Em ratos, a HIC produziu aumento da pressão arterial sistólica e diastólica após 35 dias de HIC<sup>72</sup> e aumento na PA e frequência cardíaca após 10 dias de HIC<sup>8</sup>. Em camundongos, após 2 semanas de HIC, a elevação da PA foi predominante diastólica.<sup>103</sup>

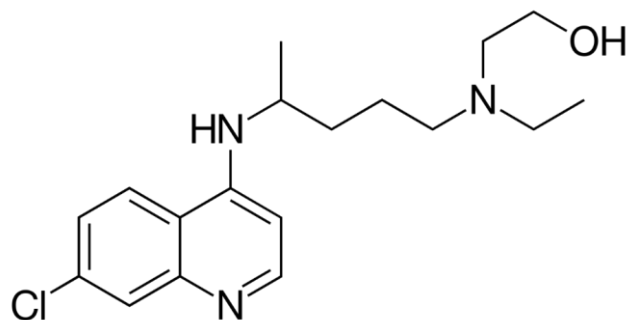
Assim como a AOS pode gerar inflamação através da HIC, nos últimos anos, um vasto corpo de evidências se acumulou indicando o papel do sistema imunológico na regulação da PA e na modulação da patologia hipertensiva.<sup>138</sup> Numerosas células do sistema imunológico foram indicadas por desempenhar papel importante no desenvolvimento e manutenção da HAS. Em resposta a estímulos hipertensivos, como angiotensina II e alto teor de sal, as células T se tornam pró-inflamatórias e se infiltram no cérebro, adventícia dos vasos sanguíneos e gordura periventricular, coração e rim. Citocinas pró-inflamatórias derivadas de células T, como IFN- $\gamma$  (*interferon gamma*), TNF- $\alpha$  e interleucina-17A exacerbam as respostas hipertensivas, mediando tanto disfunção endotelial quanto cardíaca, lesão renal e neurodegenerativa. A modulação da ativação imune adaptativa na HAS foi atribuída ao estresse oxidativo dos órgãos-alvo que leva à geração de neoantígenos. A HAS também está associada à ativação das células B e à produção de autoanticorpos, sendo que respostas hipertensivas podem ser inibidas pela ação reguladora dos linfócitos T e anti-inflamatória da interleucina-10.<sup>136</sup> Estudos experimentais encontraram infiltração inflamatória e disfunção imunológica do tecido renal intersticial, adventícia vascular e gordura renal perivascular em ratos espontaneamente hipertensos (SHR, *spontaneously hypertensive rat*)<sup>139</sup>. Inicialmente, pensava-se ser uma consequência da hipertensão, não sua causa.<sup>140</sup> No entanto, estudos experimentais subsequentes mostraram melhora da HAS após a redução da inflamação intersticial renal por muitos métodos diferentes, como Tongxinluo, um medicamento antioxidante chinês<sup>141</sup>, micofenolato de mofetil<sup>142</sup> e interleucina-10.<sup>143</sup> Os estudos

também encontraram uma correlação entre a gravidade da inflamação e o grau de hipertensão.

Outro fator a ser levado em consideração no desenvolvimento da inflamação é a terceira idade. Durante esse período da vida, se desenvolve uma inflamação crônica, estéril e de baixo grau, denominada por alguns autores pelo neologismo *inflammaging*.<sup>144</sup> Tal estado inflamatório contribuiria para a patogênese das doenças do envelhecimento. Sob esse novo ponto de vista imunometabólico para doenças idade-relacionadas, se considera serem as doenças crônicas não apenas o resultado do envelhecimento e da inflamação, mas também aceleradores do processo de envelhecimento.

## 2.8 HIDROXICLOROQUINA

O fármaco antimalárico HCQ (Figura 17), por suas propriedades anti-inflamatórias, é comumente utilizado para o tratamento de doenças reumáticas, em particular AR e doenças do tecido conjuntivo tais como lúpus eritematoso sistêmico (LES). HCQ reduz a ativação do sistema de imunidade inato por inibição da estimulação dos receptores tipo Toll<sup>145</sup>, que podem desempenhar papel importante na ativação de células inflamatórias na aterosclerose.<sup>146</sup>



**Figura 17.** Molécula da hidroxicloroquina.

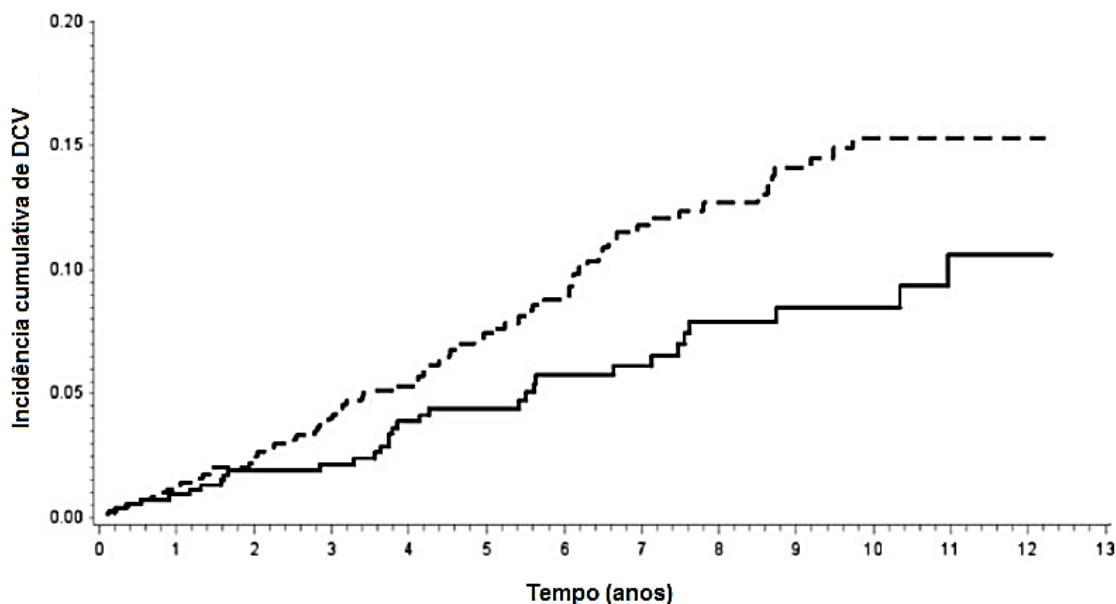
Estudos experimentais e clínicos transformaram o papel antimalárico tradicional da cloroquina (CQ) e análogos estruturais, relacionando essas drogas a agentes terapêuticos potentes para uma série de indicações não maláricas. A aplicabilidade clínica em expansão para esses medicamentos inclui distúrbios reumatológicos e cardiovasculares, doença renal crônica, processos oncológicos e outras infecções não maláricas. Esses avanços clínicos estão relacionados principalmente às ações farmacológicas pleiotrópicas desses medicamentos, incluindo imunomodulação, propriedades anti-inflamatórias e capacidade de induzir autofagia e apoptose a nível celular.<sup>147</sup> Confirmando essa hipótese, em 2020, a CQ foi considerada “altamente eficaz” no controle da infecção por coronavírus *in vitro*.<sup>148</sup> Nos pacientes com LES, a CQ inibe a síntese de vários membros da família das metaloproteinases de matriz, especialmente de MMP-9 (*Matrix metalloproteinase 9*)<sup>149</sup>, enzimas capazes de degradar o colágeno intersticial na capa fibrótica da placa aterosclerótica.<sup>150</sup>

Alguns estudos sugerem que a HCQ reduz a produção de citocinas importantes na patogênese da aterosclerose, como interleucina-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ .<sup>28,29</sup> A terapia de bloqueio do TNF- $\alpha$  foi associada redução do risco de DAC entre pacientes com AR.<sup>151</sup> Através dos resultados observados em pesquisas, a hipótese sobre a efetividade do uso da HCQ na DAC foi levantada.<sup>152</sup> A HCQ pode ser uma opção promissora para pacientes com DAC por seus múltiplos benefícios.<sup>153</sup> Em estudo de coorte retrospectivo realizado em 826 pacientes com LES

tratados com HCQ, foi encontrada uma taxa de risco significativamente reduzida para DAC entre esses pacientes.<sup>154</sup> Segundo os autores, os possíveis mecanismos desse efeito protetor incluem inibição da inflamação sistêmica, regulação de anticorpos antifosfolípides<sup>155</sup>, proteção contra disfunção endotelial, redução da dose de esteroides e perfis lipídicos aprimorados.

Estudos de coorte mostraram que a HCQ diminui o colesterol de pacientes com LES e AR.<sup>156,157,158,159</sup> Além disso, na AR, o uso de HCQ tem sido associada a menor incidência de diabetes tipo 2<sup>160,161,162</sup>, níveis mais baixos de hemoglobina glicosilada<sup>163</sup> e melhor sensibilidade à insulina e função de células beta.<sup>164</sup> Em dois estudos randomizados utilizando diabéticos com inadequado controle glicêmico, a HCQ reduziu significativamente os níveis de glicose.<sup>165,166</sup>

A DCV é a principal causa de morte em pacientes com AR.<sup>167</sup> Para demonstrar a associação do uso de HCQ na DCV, foi realizado um estudo de coorte retrospectivo com 1266 pacientes com AR por um seguimento de 12,5 anos.<sup>30</sup> Os pacientes foram categorizados como usuários de HCQ (n=547) *versus* não usuários (n=719). O desfecho primário foi DCV incidente definido como um composto de DAC, acidente vascular cerebral, ataque isquêmico transitório, morte cardíaca súbita e doença arterial periférica com procedimento de revascularização. Durante o período de observação, ocorreram 102 eventos de DCV, 3 em usuários de HCQ e 99 em não usuários. O modelo de Cox ajustado mostrou uma taxa de risco de 0,28 (IC95% 0,12-0,63) para DCV incidente e 0,30 (IC95% 0,13-0,68) para DAC incidente, acidente vascular cerebral e ataque isquêmico transitório para usuários de HCQ *versus* não usuários, respectivamente. Neste estudo o uso de HCQ foi associada à redução de 72% no risco de DCV incidente em pacientes com AR (Figura 18).



**Figura 18.** Probabilidade de doença cardiovascular (DCV) incidente de acordo com o uso de hidroxicloroquina. Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier*: Curva sólida representa os usuários de hidroxicloroquina e curva pontilhada representa os não usuários. Adaptada de Sharma et al.<sup>30</sup>

Além disso, HCQ pode ter propriedades antitrombóticas.<sup>168,169</sup> Em camundongos, HCQ reduziu o tamanho e a duração do trombo<sup>170</sup>, e provocou diminuição da espessura da parede vascular e da progressão da aterosclerose.<sup>171</sup> Em um estudo caso-controle em pacientes com LES, o uso de HCQ foi associado a um risco reduzido de complicações tromboembólicas.<sup>172</sup>

Para demonstrar as propriedades da HCQ na prevenção secundária de DCVs ateroscleróticas, está em andamento o estudo OXI (*Oxiklorin*)<sup>173</sup>, que determinará se o tratamento com HCQ, em comparação com o placebo, pode reduzir os eventos cardiovasculares recorrentes entre pacientes com infarto do miocárdio. O estudo está em fase de recrutamento, de forma que se o estudo piloto com 200 pacientes for bem-sucedido, 2500 pacientes serão recrutados em centros adicionais na Finlândia e nos países nórdicos.

Efeitos colaterais comuns do uso de HCQ em humanos incluem anorexia, labilidade emocional, cefaleia, visão borrada, dor abdominal, náusea, erupção cutânea e prurido. Dentre os efeitos raros visualizados em usuários de doses altas e prolongadas, podem ocorrer síndrome

de Stevens-Johnson<sup>174</sup>, cardiomiopatia<sup>175,176</sup>, retinopatia<sup>177</sup> e eritema multiforme.<sup>178</sup>

Evidências sugerem que a HAS pode resultar da perda de tolerância imunológica e a autoimunidade resultante pode ser um fator subjacente importante de sua patogênese.<sup>179</sup> Além disso, a presença de HAS e DCV é frequentemente observada em pacientes com doenças autoimunes.<sup>180</sup> Em humanos, pacientes com LES apresentaram maior variabilidade da PA de visita-a-visita do que os indivíduos controle e, o uso da HCQ, foi associado à redução de variabilidade da PA de visita-a-visita.<sup>181</sup> Em modelo de camundongo fêmea de LES tratado com HCQ 10mg/kg/dia durante 5 semanas, a HCQ reduziu a hipertensão, disfunção endotelial e danos aos órgãos.<sup>182</sup>

Por sua vez, a CQ tem efeito anti-hipertensivo demonstrado em ratos. Após 21 dias de tratamento com CQ (40 mg/kg/dia via injeção intraperitoneal) em um grupo de SHR adultos (12 semanas de idade) e outro de SHR jovens (5 semanas de idade), a CQ impediu o aumento da PA em SHR adultos, mas não impediu em SHR jovens.<sup>183</sup> Respostas inatas do sistema imunológico a padrões moleculares associados a danos (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*) estão envolvidas na hipertensão. O DNA mitocondrial circulante é um DAMP que ativa o receptor Toll-like e é elevado em ratos SHR. Os resultados indicam que a CQ também possui ações anti-hipertensivas, possivelmente através da regulação da sinalização Toll-like, o que pode diminuir o risco de DCV em pacientes autoimunes com HAS.

A dose de medicação utilizada em nossa pesquisa baseou-se no estudo de Long et al.<sup>184</sup>, que utilizou 50mg/kg/dia via intraperitoneal para verificar os efeitos do desenvolvimento de hipertensão pulmonar em ratos Sprague-Dawley. Em nosso experimento, reduzimos a dosagem após o estudo piloto para 35mg/kg/dia, pois na dosagem de 50mg/kg/dia os animais ficaram demasiadamente prostrados, com perda de apetite e, conseqüentemente, de peso. Esses efeitos adversos da medicação foram sanados com a nova dosagem.

Tomadas em conjunto, as evidências derivadas de estudos em pacientes com doenças

reumáticas, convergem para o papel da HCQ na redução de risco cardiovascular. Considerando a AOS uma doença crônica com componente inflamatório, assim como as condições reumáticas, supõe-se que a HCQ, por seus efeitos favoráveis na redução de fatores que causam aumento do risco cardiovascular, possa reduzir a disfunção endotelial associada a AOS. Não encontramos até o momento estudos abordando o efeito da HCQ sobre a PA, frequência cardíaca e alterações vasculares em animais submetidos à HIC.

Em face aos dados obtidos na revisão da literatura se decidiu realizar a presente tese. Considerou-se o modelo animal o mais apropriado em função do caráter preliminar dos dados que sustentam a hipótese abaixo.



### **3. HIPÓTESE CONCEITUAL**

A ação anti-inflamatória da HCQ impede o aumento da PA e altera a expressão de proteínas envolvidas no controle do músculo liso arteriolar em modelo animal de HIC, simulando AOS.

#### 4. JUSTIFICATIVA

O estudo derivado desta tese se justifica com base nos seguintes pontos:

- A AOS é relevante, prevalente e aumenta morbidade, mortalidade e desfechos desfavoráveis em doenças como câncer e cardiopatia;
- A AOS é reconhecida como principal causa de HAS que possui grandes repercussões na saúde humana;
- A presença de fatores inflamatórios e de alterações vasculares na AOS que suportam a ideia de ser uma doença inflamatória de grau leve;
- A necessidade de formas toleráveis de tratamento, pois o uso de CPAP, o padrão-áureo para o tratamento da AOS, tem sua efetividade limitada pela adesão insuficiente ao tratamento;
- O potencial papel auxiliar da HCQ no controle da PA em pacientes com AOS se torna mais relevante por ser essa medicação anti-inflamatória, de baixo custo e com efeitos positivos na prevenção de DCV;
- Apesar de já ter sido testado o efeito de HCQ na PA, não existem estudos experimentais nem clínicos utilizando HCQ em pacientes com AOS;
- O estudo é ético e foi aprovado em todas as instâncias.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da hidroxicloroquina no controle da pressão arterial em modelo de hipóxia intermitente crônica simulando apneia do sono.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito da HCQ sobre o comportamento da PA aferida por sistema de telemetria durante 14 dias de exposição à HIC;
- Avaliar o efeito da HCQ na composição do músculo liso vascular pela medida da expressão de proteínas, utilizando a técnica de imunistoquímica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERAT

---

<sup>1</sup> Senaratna CV, Perret JL, Lodge CJ, Lowe AJ, Campbell BE, Matheson MC, Hamilton GS, Dharmage SC. Prevalence of obstructive sleep apnea in the general population: A systematic review. *Sleep Med Rev.* 2017;34:70-81.

<sup>2</sup> Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, Heinzer R, Ip MSM, Morrell MJ, Nunez CM, Patel SR, Penzel T, Pépin JL, Peppard PE, Sinha S, Tufik S, Valentine K, Malhotra A. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir Med.* 2019;7:687-98.

<sup>3</sup> Badran M, Ayas N, Laher I. Insights into obstructive sleep apnea research. *Sleep Med.* 2014;15:485-95.

<sup>4</sup> Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, D'Agostino RB, Newman AB, Lebowitz MD, Pickering TG. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. *Sleep Heart Health Study. JAMA.* 2000;283:1829-36. Erratum in: *JAMA* 2002;288:1985.

<sup>5</sup> Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med.* 2000;342:1378-84.

<sup>6</sup> do Carmo JM, da Silva AA, Moak SP, da Silva FS, Spradley FT, Hall JE. Role of melanocortin 4 receptor in hypertension induced by chronic intermittent hypoxia. *Acta Physiol (Oxf).* 2019;225:e13222.

<sup>7</sup> Ganesh BP, Nelson JW, Eskew JR, Ganesan A, Ajami NJ, Petrosino JF, Bryan RM Jr, Durgan DJ. Prebiotics, Probiotics, and Acetate Supplementation Prevent Hypertension in a Model of Obstructive Sleep Apnea. *Hypertension.* 2018;72:1141-50.

<sup>8</sup> Perim RR, Bonagamba LG, Machado BH. Cardiovascular and respiratory outcome of preconditioned rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol.* 2015;100:1008-17.

- 
- <sup>9</sup> Prabhakar NR, Peng YJ, Jacono FJ, Kumar GK, Dick TE. Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32:447-9.
- <sup>10</sup> Zoccal DB, Bonagamba LG, Antunes-Rodrigues J, Machado BH. Plasma corticosterone levels is elevated in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Auton Neurosci.* 2007;134:115-7.
- <sup>11</sup> Iturriaga R, Moya EA, Del Rio R. Carotid body potentiation induced by intermittent hypoxia: implications for cardiorespiratory changes induced by sleep apnoea. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36:1197-204.
- <sup>12</sup> Nanduri J, Makarenko V, Reddy VD, Yuan G, Pawar A, Wang N, Khan SA, Zhang X, Kinsman B, Peng YJ, Kumar GK, Fox AP, Godley LA, Semenza GL, Prabhakar NR. Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:2515-20.
- <sup>13</sup> Kanagy NL, Walker BR, Nelin LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension.* 2001;37:511-5.
- <sup>14</sup> Allahdadi KJ, Cherng TW, Pai H, Silva AQ, Walker BR, Nelin LD, Kanagy NL. Endothelin type A receptor antagonist normalizes BP in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H434-40.
- <sup>15</sup> Shamsuzzaman AS, Gersh BJ, Somers VK. Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease. *JAMA.* 2003;290:1906-14.
- <sup>16</sup> Golbidi S, Badran M, Ayas N, Laher I. Cardiovascular consequences of sleep apnea. *Lung.* 2012;190:113-32.
- <sup>17</sup> Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res.* 2011;34:665-73.

- 
- <sup>18</sup> Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, Pepin JL, Guillermet C, Pelli G, Burger F, Buatois V, Ribuot C, Baguet JP, Mach F, Levy P, Dematteis M. The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:724-31.
- <sup>19</sup> Poulain L, Richard V, Lévy P, Dematteis M, Arnaud C. Toll-like receptor-4 mediated inflammation is involved in the cardiometabolic alterations induced by intermittent hypoxia. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:620258.
- <sup>20</sup> Gras E, Belaidi E, Briançon-Marjollet A, Pépin JL, Arnaud C, Godin-Ribuot D. Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *J Appl Physiol (1985).* 2016;120:437-43.
- <sup>21</sup> Troncoso Brindeiro CM, da Silva AQ, Allahdadi KJ, Youngblood V, Kanagy NL. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H2971-6.
- <sup>22</sup> Friedman JK, Nitta CH, Henderson KM, Codianni SJ, Sanchez L, Ramiro-Diaz JM, Howard TA, Giermakowska W, Kanagy NL, Gonzalez Bosc LV. Intermittent hypoxia-induced increases in reactive oxygen species activate NFATc3 increasing endothelin-1 vasoconstrictor reactivity. *Vascul Pharmacol.* 2014;60:17-24.
- <sup>23</sup> Shirinsky VP, Biryukov KG, Hettasch JM, Sellers JR. Inhibition of the relative movement of actin and myosin by caldesmon and calponin. *J Biol Chem.* 1992 Aug5;267(22):15886-92.
- <sup>24</sup> Liu R, Jin JP. Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: Regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. *Gene.* 2016;585:143-53.
- <sup>25</sup> Brozovich FV, Nicholson CJ, Degen CV, Gao YZ, Aggarwal M, Morgan KG. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacol Rev.* 2016;68:476-532.

- 
- <sup>26</sup> Wang CL. Caldesmon and the regulation of cytoskeletal functions. *Adv Exp Med Biol.* 2008;644:250-72.
- <sup>27</sup> Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Obstructive Sleep Apnea and Inflammation: Proof of Concept Based on Two Illustrative Cytokines. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3).
- <sup>28</sup> Jang CH, Choi JH, Byun MS, Jue DM. Chloroquine inhibits production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:703-10.
- <sup>29</sup> Weber SM, Levitz SM. Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomotropic mechanism. *J Immunol.* 2000;165:1534-40.
- <sup>30</sup> Sharma TS, Wasko MC, Tang X, Vedamurthy D, Yan X, Cote J, Bili A. Hydroxychloroquine Use Is Associated With Decreased Incident Cardiovascular Events in Rheumatoid Arthritis Patients. *J Am Heart Assoc.* 2016;5.
- <sup>31</sup> McNicholas WT, Luo Y, Zhong N. Sleep apnoea: a major and under-recognised public health concern. *J Thorac Dis.* 2015;7:1269-72.
- <sup>32</sup> Ryan CM, Bradley TD. Pathogenesis of obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol.* 2005;99:2440-50.
- <sup>33</sup> Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, Marcus CL, Mehra R, Parthasarathy S, Quan SF, Redline S, Strohl KP, Davidson Ward SL, Tangredi MM; American Academy of Sleep Medicine. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med.* 2012;8:597-619.
- <sup>34</sup> Malhotra A, White DP. Obstructive sleep apnoea. *Lancet.* 2002;360(9328):237-45.
- <sup>35</sup> American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders. Diagnostic and coding manual (ICSD-2). 2nd ed. Westchester, Illinois, 2005.

- 
- <sup>36</sup> Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev.* 2010;90:47-112.
- <sup>37</sup> Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, Daniels S, Floras JS, Hunt CE, Olson LJ, Pickering TG, Russell R, Woo M, Young T. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High BP Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council on Cardiovascular Nursing. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:686-717.
- <sup>38</sup> International Classification of Sleep Disorders, 3rd ed, American Academy of Sleep Medicine, Darien, IL 2014.
- <sup>39</sup> Bao G, Guilleminault C. Upper airway resistance syndrome - one decade later. *Curr Opin Pulm Med.* 2004;10:461-7.
- <sup>40</sup> Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med.* 1993;328:1230-5.
- <sup>41</sup> Duran J, Esnaola S, Rubio R, Iztueta A. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:685-9.
- <sup>42</sup> Bixler EO, Vgontzas AN, Lin HM, Ten Have T, Rein J, Vela-Bueno A, Kales A. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:608-13.
- <sup>43</sup> Bixler EO, Vgontzas AN, Ten Have T, Tyson K, Kales A. Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:144-8.
- <sup>44</sup> Bearpark H, Elliott L, Grunstein R, Cullen S, Schneider H, Althaus W, Sullivan C. Snoring and sleep apnea A population study in Australian men. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:1459-65.



- 
- <sup>45</sup> Ip MS, Lam B, Lauder IJ, Tsang KW, Chung KF, Mok YW, Lam WK. A community study of sleep-disordered breathing in middle-aged Chinese men in Hong Kong. *Chest*. 2001;119:62-9.
- <sup>46</sup> Sharma SK, Kumpawat S, Banga A, Goel A. Prevalence and risk factors of obstructive sleep apnea syndrome in a population of Delhi, India. *Chest*. 2006;130:149-56.
- <sup>47</sup> Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LR. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med*. 2010;11:441-6.
- <sup>48</sup> Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet*. 2005;365:1046-53.
- <sup>49</sup> Ioachimescu OC, Janocko NJ, Ciavatta MM, Howard M, Warnock MV. Obstructive Lung Disease and Obstructive Sleep Apnea (OLDOSA) cohort study: 10-year assessment. *J Clin Sleep Med*. 2020. [Epub ahead of print]
- <sup>50</sup> Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, Chen J, He J. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. *Circulation*. 2016;134:441-50.
- <sup>51</sup> Global Health Observatory (GHO) data: NCD mortality and morbidity. [www.who.int/gho/ncd/mortality\\_morbidity/en/](http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/)
- <sup>52</sup> Egan BM, Kjeldsen SE, Grassi G, Esler M, Mancia G. The global burden of hypertension exceeds 1.4 billion people: should a systolic BP target below 130 become the universal standard? *J Hypertens*. 2019;37:1148-53.
- <sup>53</sup> Young T, Peppard P, Palta M, Hla KM, Finn L, Morgan B, Skatrud J. Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch Intern Med*. 1997;157:1746-52.

- 
- <sup>54</sup> Quan SF, Howard BV, Iber C, Kiley JP, Nieto FJ, O'Connor GT, Rapoport DM, Redline S, Robbins J, Samet JM, Wahl PW. The Sleep Heart Health Study: design, rationale, and methods. *Sleep*. 1997;20:1077-85.
- <sup>55</sup> Lavie P, Herer P, Hoffstein V. Obstructive sleep apnoea syndrome as a risk factor for hypertension: population study. *Br Med J*. 2000;320:479-82.
- <sup>56</sup> Marin JM, Agustí A, Villar I, Forner M, Nieto D, Carrizo SJ, Barbé F, Vicente E, Wei Y, Nieto FJ, Jelic S. Association between treated and untreated obstructive sleep apnea and risk of hypertension. *JAMA*. 2012;307:2169-76.
- <sup>57</sup> Young T, Finn L, Peppard PE, Szklo-Coxe M, Austin D, Nieto FJ, Stubbs R, Hla KM. Sleep disordered breathing and mortality: eighteen-year follow-up of the Wisconsin sleep cohort. *Sleep*. 2008;31:1071-8.
- <sup>58</sup> Caples SM, Gami AS, Somers VK. Obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med*. 2005;142:187-97.
- <sup>59</sup> Shahar E, Whitney CW, Redline S, Lee ET, Newman AB, Javier Nieto F, O'Connor GT, Boland LI, Schwartz JE, Samet JM. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:19-25
- <sup>60</sup> Gus I, Harzheim E, Zaslavsky C, Medina C, Gus M. Prevalence, awareness, and control of systemic arterial hypertension in the state of Rio Grande do Sul. *Arq Bras Cardiol*. 2004;83:429-33;424-8.
- <sup>61</sup> Lavie P, Hoffstein V. Sleep apnea syndrome: a possible contributing factor to resistant. *Sleep*. 2001;24:721-5.
- <sup>62</sup> Logan AG, Perlikowski SM, Mente A, Tisler A, Tkacova R, Niroumand M, Leung RS, Bradley TD. High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug-resistant hypertension. *J Hypertens*. 2001;19:2271-7.

- 
- <sup>63</sup> Pedrosa RP, Drager LF, Gonzaga CC, Sousa MG, de Paula LK, Amaro AC, Amodeo C, Bortolotto LA, Krieger EM, Bradley TD, Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea: the most common secondary cause of hypertension associated with resistant hypertension. *Hypertension*. 2011;58:811-7.
- <sup>64</sup> Gonçalves SC, Martinez D, Gus M, de Abreu-Silva EO, Bertoluci C, Dutra I, Branchi T, Moreira LB, Fuchs SC, de Oliveira AC, Fuchs FD. Obstructive sleep apnea and resistant hypertension: a case-control study. *Chest*. 2007;132:1858-62.
- <sup>65</sup> Martínez-García MA, Capote F, Campos-Rodríguez F, Lloberes P, Díaz de Atauri MJ, Somoza M, Masa JF, González M, Sacristán L, Barbé F, Durán-Cantolla J, Aizpuru F, Mañas E, Barreiro B, Mosteiro M, Cebrián JJ, de la Peña M, García-Río F, Maimó A, Zapater J, Hernández C, Grau SanMartí N, Montserrat JM; Spanish Sleep Network. Effect of CPAP on BP in patients with obstructive sleep apnea and resistant hypertension: the HIPARCO randomized clinical trial. *JAMA*. 2013;310:2407-15.
- <sup>66</sup> Weaver TE, Grunstein RR. Adherence to continuous positive airway pressure therapy: the challenge to effective treatment. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5:173-8.
- <sup>67</sup> McEvoy RD, Antic NA, Heeley E, Luo Y, Ou Q, Zhang X, Mediano O, Chen R, Drager LF, Liu Z, Chen G, Du B, McArdle N, Mukherjee S, Tripathi M, Billot L, Li Q, Lorenzi-Filho G, Barbe F, Redline S, Wang J, Arima H, Neal B, White DP, Grunstein RR, Zhong N, Anderson CS; SAVE Investigators and Coordinators. CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *N Engl J Med*. 2016;375:919-31.
- <sup>68</sup> Tamisier R, Gilmartin GS, Launois SH, Pépin JL, Nespoulet H, Thomas R, Lévy P, Weiss JW. A new model of chronic intermittent hypoxia in humans: effect on ventilation, sleep, and BP. *J Appl Physiol (1985)*. 2009;107:17-24.

- 
- <sup>69</sup> Tamisier R, Pépin JL, Rémy J, Baguet JP, Taylor JA, Weiss JW, Lévy P. 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime BP and sympathetic activity in healthy humans. *Eur Respir J*. 2011;37:119-28.
- <sup>70</sup> Gilmartin GS, Lynch M, Tamisier R, Weiss JW. Chronic intermittent hypoxia in humans during 28 nights results in BP elevation and increased muscle sympathetic nerve activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H925-31.
- <sup>71</sup> Foster GE, Hanly PJ, Ahmed SB, Beaudin AE, Pialoux V, Poulin MJ. Intermittent hypoxia increases arterial BP in humans through a Renin-Angiotensin system-dependent mechanism. *Hypertension*. 2010;56:369-77.
- <sup>72</sup> Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC, 3rd, Unger T. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of BP in rats. *Hypertension*. 1992;19:555-61.
- <sup>73</sup> Kobayashi S, Zimmermann H, Millhorn DE. Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport. *J Neurochem*. 2000;74:621-32.
- <sup>74</sup> Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest*. 2002;122:1162-7.
- <sup>75</sup> Chopra S, Polotsky VY, Jun JC. Sleep Apnea Research in Animals. Past, Present, and Future. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54:299-305.
- <sup>76</sup> Brooks D, Horner RL, Kozar LG, Render-Teixeira CL, Phillipson EA. Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model. *J Clin Invest*. 1997;99:106-9.
- <sup>77</sup> Tahawi Z, Orolinova N, Joshua IG, Bader M, Fletcher EC. Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats. *J Appl Physiol*. 2001;90:2007-13.

- 
- <sup>78</sup> Hinojosa-Laborde C, Mifflin SW. Sex differences in BP response to intermittent hypoxia in rats. *Hypertension*. 2005;46:1016-21.
- <sup>79</sup> Boa, G, Metreveli N, Li R, Taylor A, Fletcher EC. BP response to chronic episodic hypoxia: role of the sympathetic nervous system. *J Appl Physiol*. 1997;83:95-101.
- <sup>80</sup> Lurie A. Endothelial dysfunction in adults with obstructive sleep apnea. *Adv Cardiol*. 2011;46:139-70.
- <sup>81</sup> Diogo LN, Monteiro EC. The efficacy of antihypertensive drugs in chronic intermittent hypoxia conditions. *Front Physiol*. 2014;5:361.
- <sup>82</sup> Morales-Loredo H, Jones D, Barrera A, Mendiola PJ, Garcia J, Pace C, Murphy M, Kanagy NL, Gonzalez Bosc LV. A dual blocker of endothelin A/B receptors mitigates hypertension but not renal dysfunction in a rat model of chronic kidney disease and sleep apnea. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019;316:F1041-F1052.
- <sup>83</sup> Diogo LN, Pereira SA, Nunes AR, Afonso RA, Santos AI, Monteiro EC. Efficacy of carvedilol in reversing hypertension induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *Eur J Pharmacol*. 2015;765:58-67.
- <sup>84</sup> Del Rio R, Moya EA, Parga MJ, Madrid C, Iturriaga R. Carotid body inflammation and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia. *Eur Respir J*. 2012;39:1492-500.
- <sup>85</sup> Martinez D, Vasconcellos LF, de Oliveira PG, Konrad SP. Weight loss and brown adipose tissue reduction in rat model of sleep apnea. *Lipids Health Dis*. 2008;31:7-26.
- <sup>86</sup> Rosa DP, Martinez D, Picada JN, Semedo JG, Marroni NP. Hepatic oxidative stress in an animal model of sleep apnoea: effects of different duration of exposure. *Comp Hepatol*. 2011;10:1.
- <sup>87</sup> Vieira LR, Martinez D, Forgiarini LF, da Rosa DP, de Muñoz GA, Fagundes M, Martins EF, Montanari CC, Fiori CZ. Uncoupling protein-2 mRNA expression in mice subjected to intermittent hypoxia. *J Bras Pneumol*. 2015;41:167-74.

- 
- <sup>88</sup> Kim LJ, Martinez D, Fiori CZ, Baronio D, Kretzmann NA, Barros HM. Hypomyelination, memory impairment, and blood-brain barrier permeability in a model of sleep apnea. *Brain Res.* 2015;1597:28-36.
- <sup>89</sup> Baronio D, Martinez D, Fiori CZ, Bambini-Junior V, Forgiarini LF, Pase da Rosa D, Kim LJ, Cerski MR. Altered aquaporins in the brains of mice submitted to intermittent hypoxia model of sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013;185:217-21.
- <sup>90</sup> Fiori CZ, Martinez D, Baronio D, da Rosa DP, Kretzmann NA, Forgiarini LF, Montanari CC, Marroni NP, Carissimi A. Downregulation of uncoupling protein-1 mRNA expression and hypoadiponectinemia in a mouse model of sleep apnea. *Sleep Breath.* 2014;18:541-8.
- <sup>91</sup> Kaminski RS, Martinez D, Fagundes M, Martins EF, Montanari CC, Rosa DP, Fiori CZ, Marroni NP. Melatonin prevents hyperglycemia in a model of sleep apnea. *Arch Endocrinol Metab.* 2015;59:66-70.
- <sup>92</sup> da Rosa DP, Forgiarini LF, e Silva MB, Fiori CZ, Andrade CF, Martinez D, Marroni NP. Antioxidants inhibit the inflammatory and apoptotic processes in an intermittent hypoxia model of sleep apnea. *Inflamm Res.* 2015;64:21-9.
- <sup>93</sup> Perini, S., Martinez, D., Montanari, C.C., Fiori, C.Z. Enhanced expression of melanoma progression markers in mouse model of sleep apnea. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition).* 2016;41:11-18.
- <sup>94</sup> Hou S, Blesch A, Lu P. A radio-telemetric system to monitor cardiovascular function in rats with spinal cord transection and embryonic neural stem cell grafts. *J Vis Exp.* 2014;e51914.
- <sup>95</sup> Data Science International: telemetry of small animals  
<https://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/small-animal-telemetry>
- <sup>96</sup> Braga VA, Prabhakar NR. Refinement of telemetry for measuring BP in conscious rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2009;48:268-71.

- 
- <sup>97</sup> Kramer K, Kinter LB. Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. *Physiol Genomics*. 2003;13:197-205.
- <sup>98</sup> Morton DB, Hawkins P, Bevan R, Heath K, Kirkwood J, Pearce P, Scott L, Whelan G, Webb A; British Veterinary Association Animal Welfare Foundation; Fund for Replacement of Animals in Medical Experiments; Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals; Universities Federation for Animal Welfare. Refinements in telemetry procedures. Seventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement, Part A. *Lab Anim*. 2003;37:261-99.
- <sup>99</sup> Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davisson RL, Hall JE; AHA Council on High BP Research, Professional and Public Education Subcommittee. Recommendations for BP measurement in animals: summary of an AHA scientific statement from the Council on High BP Research, Professional and Public Education Subcommittee. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:478-9.
- <sup>100</sup> Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, Higgins C, Canfield SM, Onat D, Colombo PC, Basner RC, Factor P, LeJemtel TH. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2008;117:2270-8.
- <sup>101</sup> Kanagy NL. Vascular effects of intermittent hypoxia. *ILAR J*. 2009;50:282-8.
- <sup>102</sup> Kyotani Y, Takasawa S, Yoshizumi M. Proliferative Pathways of Vascular Smooth Muscle Cells in Response to Intermittent Hypoxia. *Int J Mol Sci*. 2019;20:2706.
- <sup>103</sup> Dematteis M, Julien C, Guillermet C, Sturm N, Lantuejoul S, Mallaret M, Lévy P, Gozal E. Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:227-35.
- <sup>104</sup> Sun Z. Aging, arterial stiffness, and hypertension. *Hypertension*. 2015;65:252-6.
- <sup>105</sup> Wilk G, Osmenda G, Matusik P, Nowakowski D, Jasiewicz-Honkisz B, Ignacak A, Czeńnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. Endothelial function assessment in atherosclerosis:

---

comparison of brachial artery flow-mediated vasodilation and peripheral arterial tonometry. *Pol Arch Med Wewn.* 2013;123:443-5

<sup>106</sup> Duca L, Blaise S, Romier B, Laffargue M, Gayral S, El Btaouri H, Kawecki C, Guillot A, Martiny L, Debelle L, Maurice P. Matrix ageing and vascular impacts: focus on elastin fragmentation. *Cardiovasc Res.* 2016;110:298-308.

<sup>107</sup> Kovacic JC, Moreno P, Hachinski V, Nabel EG, Fuster V. Cellular senescence, vascular disease, and aging: part 1 of a 2-part review. *Circulation.* 2011;123:1650-60.

<sup>108</sup> Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren WM, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syväanne M, Scholte Op Reimer WJ, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F; Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice; European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Atherosclerosis.* 2012;223:1-68.

<sup>109</sup> Guzik TJ, Touyz RM. Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension. *Hypertension.* 2017;70:660-7.

<sup>110</sup> Polak JF, Pencina MJ, Pencina KM, O'Donnell CJ, Wolf PA, D'Agostino RB Sr. Carotid-wall intima-media thickness and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2011;365:213-21.

<sup>111</sup> Cortese R, Gileles-Hillel A, Khalyfa A, Almendros I, Akbarpour M, Khalyfa AA, Qiao Z, Garcia T, Andrade J, Gozal D. Aorta macrophage inflammatory and epigenetic changes in a murine model of obstructive sleep apnea: Potential role of CD36. *Sci Rep.* 2017;7:43648.



- 
- <sup>112</sup> Beamish JA, He P, Kottke-Marchant K, Marchant RE. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16:467-91.
- <sup>113</sup> Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:767-801.
- <sup>114</sup> Arnaud C, Bouyon S, Recoquillon S, Brasseur S, Lemarié E, Briancon-Marjollet A, Gonthier B, Toral M, Faury G, Martinez MC, Andriantsitohaina R, Pepin JL. Nonmuscle Myosin Light Chain Kinase: A Key Player in Intermittent Hypoxia-Induced Vascular Alterations. *J Am Heart Assoc.* 2018;7.
- <sup>115</sup> Sun C, Wu MH, Yuan SY. Nonmuscle myosin light-chain kinase deficiency attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced endothelial barrier dysfunction and monocyte migration. *Circulation.* 2011;124:48-57.
- <sup>116</sup> Wainwright MS, Rossi J, Schavocky J, Crawford S, Steinhorn D, Velentza AV, Zasadzki M, Shirinsky V, Jia Y, Haiech J, Van Eldik LJ, Watterson DM. Protein kinase involved in lung injury susceptibility: evidence from enzyme isoform genetic knockout and in vivo inhibitor treatment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:6233-8.
- <sup>117</sup> Ralay Ranaivo H, Carusio N, Wangensteen R, Ohlmann P, Loichot C, Tesse A, Chalupsky K, Lobysheva I, Haiech J, Watterson DM, Andriantsitohaina R. Protection against endotoxic shock as a consequence of reduced nitrosative stress in MLCK210-null mice. *Am J Pathol.* 2007;170:439-46.
- <sup>118</sup> Reynoso R, Perrin RM, Breslin JW, Daines DA, Watson KD, Watterson DM, Wu MH, Yuan S. A role for long chain myosin light chain kinase (MLCK-210) in microvascular hyperpermeability during severe burns. *Shock.* 2007;28:589-95.
- <sup>119</sup> Liu Z, Khalil RA. Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2018;153:91-122.

- 
- <sup>120</sup> Tansey MG, Luby-Phelps K, Kamm KE, Stull JT. Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1994;269:9912-20.
- <sup>121</sup> Martinsen A, Dessy C, Morel N. Regulation of calcium channels in smooth muscle: new insights into the role of myosin light chain kinase. *Channels (Austin)*. 2014;8:402-13.
- <sup>122</sup> Walsh MP. Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem*. 1994;135:21-41.
- <sup>123</sup> Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*. 2003;27:201-6.
- <sup>124</sup> Guilford WH, Warshaw DM. The molecular mechanics of smooth muscle myosin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1998;119:451-8.
- <sup>125</sup> Makuch R, Birukov K, Shirinsky V, Dabrowska R. Functional interrelationship between calponin and caldesmon. *Biochem J*. 1991;280:33-8.
- <sup>126</sup> Zacour ME, Teoh H, Halayko AJ, Ward ME. Mechanisms of aortic smooth muscle hyporeactivity after prolonged hypoxia in rats. *J Appl Physiol*. 2002;92:2625-32.
- <sup>127</sup> Allen BG, Walsh MP. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *Trends Biochem Sci*. 1994;19:362-8.
- <sup>128</sup> Takahashi K, Abe M, Hiwada K, Kokubu T. A novel troponin T-like protein (calponin) in vascular smooth muscle: interaction with tropomyosin paracrystals. *J Hypertens Suppl*. 1988;6:S40-3.
- <sup>129</sup> Je HD, Gangopadhyay SS, Ashworth TD, Morgan KG. Calponin is required for agonist-induced signal transduction--evidence from an antisense approach in ferret smooth muscle. *J Physiol*. 2001;537:567-77.
- <sup>130</sup> Kron SJ, Toyoshima YY, Uyeda TQ, Spudich JA. Assays for actin sliding movement over myosin-coated surfaces. *Methods Enzymol*. 1991;196:399-416.

- 
- <sup>131</sup> Sobieszek A, Sarg B, Lindner H, Seow CY. Phosphorylation of caldesmon by myosin light chain kinase increases its binding affinity for phosphorylated myosin filaments. *Biol Chem.* 2010;391:1091-104.
- <sup>132</sup> Winder SJ, Walsh MP. Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 1990;265:10148-55.
- <sup>133</sup> Mezgueldi M, Fattoum A, Derancourt J, Kassab R. Mapping of the functional domains in the amino-terminal region of calponin. *J Biol Chem.* 1992;267:15943-51.
- <sup>134</sup> Oyarce MP, Iturriaga R. Proinflammatory Cytokines in the Nucleus of the Solitary Tract of Hypertensive Rats Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1071:69-74.
- <sup>135</sup> Lesske J, Fletcher EC, Bao G, Unger T. Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system. *J Hypertens.* 1997;15:1593-603.
- <sup>136</sup> Mikolajczyk TP, Guzik TJ. Adaptive Immunity in Hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2019;21:68.
- <sup>137</sup> Aziz F, Chaudhary K. The Triad of Sleep Apnea, Hypertension, and Chronic Kidney Disease: A Spectrum of Common Pathology. *Cardiorenal Med.* 2016;7:74-82.
- <sup>138</sup> Rodriguez-Iturbe B, Zhan CD, Quiroz Y, Sindhu RK, Vaziri ND. Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2003;41:341-6.
- <sup>139</sup> Heijnen BF, Van Essen H, Schalkwijk CG, Janssen BJ, Struijker-Boudier HA. Renal inflammatory markers during the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2014;37:100-9.

- 
- <sup>140</sup> Bendich A, Belisle EH, Strausser HR. Immune system modulation and its effect on the BP of the spontaneously hypertensive male and female rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;99:600-7.
- <sup>141</sup> Luo WM, Kong J, Gong Y, Liu XQ, Yang RX, Zhao YX. Tongxinluo Protects against Hypertensive Kidney Injury in Spontaneously-Hypertensive Rats by Inhibiting Oxidative Stress and Activating Forkhead Box O1 Signaling. *PLoS One.* 2015;10:e0145130.
- <sup>142</sup> Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, Rincon J, Chavez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gómez-Garre D, Largo R, Egidio J, Johnson RJ, Rodríguez-Iturbe B. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;281:F38-47.
- <sup>143</sup> Tinsley JH, South S, Chiasson VL, Mitchell BM. Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and BP in hypertensive pregnant rats. *Am J Physiol Regulat Integr Compar Physiol.* 2010;298:R713-9.
- <sup>144</sup> Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14:576-90.
- <sup>145</sup> Kuznik A, Bencina M, Svajger U, Jeras M, Rozman B, Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J Immunol.* 2011;186:4794-804.
- <sup>146</sup> Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002;105:1158-61.
- <sup>147</sup> Shukla AM, Shukla AW. Expanding horizons for clinical applications of chloroquine, hydroxychloroquine, and related structural analogues. *Drugs Context.* 2019;8.
- <sup>148</sup> Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, Shi Z, Hu Z, Zhong W, Xiao G. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 2020.

- 
- <sup>149</sup> Lesiak A, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A, Lukamowicz J, McCauliffe DP, Wozniacka A. Effect of chloroquine phosphate treatment on serum MMP-9 and TIMP-1 levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2010;19:683-8.
- <sup>150</sup> Newby AC. Metalloproteinases promote plaque rupture and myocardial infarction: A persuasive concept waiting for clinical translation. *Matrix Biol*. 2015;44-46:157-66.
- <sup>151</sup> Jacobsson LT, Turesson C, Gulfe A, Kapetanovic MC, Petersson IF, Saxne T, Geborek P. Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2005;32:1213-8.
- <sup>152</sup> Sun L, Liu M, Li R, Zhao Q, Liu J, Yang Y, Zhang L, Bai X, Wei Y, Ma Q, Zhou J, Yuan Z, Wu Y. Hydroxychloroquine, a promising choice for coronary artery disease? *Med Hypotheses*. 2016;93:5-7.
- <sup>153</sup> Tang C, Godfrey T, Stawell R, Nikpour M. Hydroxychloroquine in lupus: emerging evidence supporting multiple beneficial effects. *Intern Med J*. 2012;42:968-78.
- <sup>154</sup> Yang DH, Leong PY, Sia SK, Wang YH, Wei JC. Long-Term Hydroxychloroquine Therapy and Risk of Coronary Artery Disease in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Med*. 2019;8.
- <sup>155</sup> Miranda S, Billoir P, Damian L, Thiebaut PA, Schapman D, Le Besnerais M, Jouen F, Galas L, Levesque H, Le Cam-Duchez V, Joannides R, Richard V, Benhamou Y. Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: Role of reduced inflammation and endothelial dysfunction. *PLoS One*. 2019;14:e0212614.
- <sup>156</sup> Wallace DJ, Metzger AL, Stecher VJ, Turnbull BA, Kern PA. Cholesterol-lowering effect of hydroxychloroquine in patients with rheumatic disease: reversal of deleterious effects of steroids on lipids. *Am J Med*. 1990;89:322-6.

- 
- <sup>157</sup> Morris SJ, Wasko MC, Antohe JL, Sartorius JA, Kirchner HL, Dancea S, Bili A. Hydroxychloroquine use associated with improvement in lipid profiles in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63:530-4.
- <sup>158</sup> Kerr G, Aujero M, Richards J, Sayles H, Davis L, Cannon G, Caplan L, Michaud K, Mikuls T. Associations of hydroxychloroquine use with lipid profiles in rheumatoid arthritis: pharmacologic implications. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66:1619-26.
- <sup>159</sup> Petri M, Lakatta C, Magder L, Goldman D. Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary artery disease risk factors in systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis. *Am J Med*. 1994;96:254-9.
- <sup>160</sup> Solomon DH, Massarotti E, Garg R, Liu J, Canning C, Schneeweiss S. Association between disease-modifying antirheumatic drugs and diabetes risk in patients with rheumatoid arthritis and psoriasis. *JAMA*. 2011;305:2525-31.
- <sup>161</sup> Bili A, Sartorius JA, Kirchner HL, Morris SJ, Ledwich LJ, Antohe JL, Dancea S, Newman ED, Wasko MC. Hydroxychloroquine use and decreased risk of diabetes in rheumatoid arthritis patients. *J Clin Rheumatol*. 2011;17:115-20.
- <sup>162</sup> Wasko MC, Hubert HB, Lingala VB, Elliott JR, Luggen ME, Fries JF, Ward MM. Hydroxychloroquine and risk of diabetes in patients with rheumatoid arthritis. *JAMA*. 2007;298:187-93.
- <sup>163</sup> Rekedal LR, Massarotti E, Garg R, Bhatia R, Gleeson T, Lu B, Solomon DH. Changes in glycosylated hemoglobin after initiation of hydroxychloroquine or methotrexate treatment in diabetes patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 2010;62:3569-73.
- <sup>164</sup> Wasko MC, McClure CK, Kelsey SF, Huber K, Orchard T, Toledo FG. Antidiabetogenic effects of hydroxychloroquine on insulin sensitivity and beta cell function: a randomised trial. *Diabetologia*. 2015;58:2336-43.

- 
- <sup>165</sup> Quatraro A, Consoli G, Magno M, Caretta F, Nardoza A, Ceriello A, Giugliano D. Hydroxychloroquine in decompensated, treatment-refractory noninsulin-dependent diabetes mellitus. A new job for an old drug? *Ann Intern Med.* 1990;112:678-81.
- <sup>166</sup> Gerstein HC, Thorpe KE, Taylor DW, Haynes RB. The effectiveness of hydroxychloroquine in patients with type 2 diabetes mellitus who are refractory to sulfonylureas – a randomized trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2002;55:209-19.
- <sup>167</sup> Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JE, Stampfer MJ, Curhan GC. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation.* 2003;107:1303-7.
- <sup>168</sup> Petri M. Use of hydroxychloroquine to prevent thrombosis in systemic lupus erythematosus and in antiphospholipid antibody-positive patients. *Curr Rheumatol Rep.* 2011;13:77-80.
- <sup>169</sup> Achuthan S, Ahluwalia J, Shafiq N, Bhalla A, Pareek A, Chandurkar N, Malhotra S. Hydroxychloroquine's efficacy as an antiplatelet agent study in healthy volunteers: a proof of concept study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2015;20:174-80.
- <sup>170</sup> Edwards MH, Pierangeli S, Liu X, Barker JH, Anderson G, Harris EN. Hydroxychloroquine reverses thrombogenic properties of antiphospholipid anti-bodies in mice. *Circulation.* 1997;96:4380-4.
- <sup>171</sup> Shukla AM, Bose C, Karaduta OK, Apostolov EO, Kaushal GP, Fahmi T, Segal MS, Shah SV. Impact of hydroxychloroquine on atherosclerosis and vascular stiffness in the presence of chronic kidney disease. *PLoS One.* 2015;10:e0139226.
- <sup>172</sup> Jung H, Bobba R, Su J, Shariati-Sarabi Z, Gladman DD, Urowitz M, Lou W, Fortin PR. The protective effect of antimalarial drugs on thrombovascular events in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2010;62:863-8.

- 
- <sup>173</sup> Hartman O, Kovanen PT, Lehtonen J, Eklund KK, Sinisalo J. Hydroxychloroquine for the prevention of recurrent cardiovascular events in myocardial infarction patients: rationale and design of the OXI trial. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother.* 2017;3:92-7.
- <sup>174</sup> Leckie MJ, Rees RG. Stevens-Johnson syndrome in association with hydroxychloroquine treatment for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41:473-4.
- <sup>175</sup> Yogasundaram H, Putko BN, Tien J, Paterson DI, Cujec B, Ringrose J, Oudit GY. Hydroxychloroquine-induced cardiomyopathy: case report, pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Can J Cardiol.* 2014;30:1706-15.
- <sup>176</sup> Muthukrishnan P, Roukoz H, Grafton G, Jessurun J, Colvin-Adams M. Hydroxychloroquine-induced cardiomyopathy: a case report. *Circ Heart Fail.* 2011;4:e7-8.
- <sup>177</sup> Marmor MF, Carr RE, Easterbrook M, Farjo AA, Mieler WF; American Academy of Ophthalmology. Recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology.* 2002;109:1377-82.
- <sup>178</sup> Abou Assalie N, Durcan R, Durcan L, Petri MA. Hydroxychloroquine-Induced Erythema Multiforme. *J Clin Rheumatol.* 2017;23:127-8.
- <sup>179</sup> Mathis KW, Broome HJ, Ryan MJ. Autoimmunity: an underlying factor in the pathogenesis of hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2014;16:424.
- <sup>180</sup> Mellana WM, Aronow WS, Palaniswamy C, Khera S. Rheumatoid arthritis: cardiovascular manifestations, pathogenesis, and therapy. *Curr Pharm Des.* 2012;18:1450-6.
- <sup>181</sup> Reese T, Dickson AL, Shuey MM, Gandelman JS, Barnado A, Barker KA, Neal JE, Khan OA, Dupont WD, Stein CM, Chung CP. Increased BP visit-to-visit variability in patients with systemic lupus erythematosus: association with inflammation and comorbidity burden. *Lupus.* 2019;28:954-60.



---

<sup>182</sup> Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Romero M, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Gómez-Morales M, O'Valle F, López-Farré AJ, Algieri F, Gálvez J, Pérez-Vizcaino F, Sabio JM, Duarte J. Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension*. 2014;64:330-7.

<sup>183</sup> McCarthy CG, Wenceslau CF, Goulopoulou S, Ogbi S, Matsumoto T, Webb RC. Autoimmune therapeutic chloroquine lowers BP and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res*. 2016;113:384-94.

<sup>184</sup> Long L, Yang X, Southwood M, Lu J, Marciniak SJ, Dunmore BJ, Morrell NW. Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation. *Circ Res*. 2013;112:1159-70.

## **7. ARTIGO 1**

# EFFECTS OF HYDROXYCHLOROQUINE ON BLOOD PRESSURE CONTROL IN SLEEP APNEA

## Abstract

*Introduction:* Obstructive sleep apnea (OSA) is recognized as independently associated with high blood pressure (BP). Protocols of chronic intermittent hypoxia (CIH) increase BP and heart rate (HR) in animal models of OSA. Hypertension has been linked to inflammation. Hydroxychloroquine (HCQ) has been proven to exert anti-inflammatory effects. We hypothesized that CIH causes hypertension via inflammation-mediated mechanisms.

*Objectives:* To investigate whether CIH-induced high BP can be inhibited by HCQ administration. *Methods:* Seventeen male 12-week-old Wistar rats were implanted with telemetry sensors for continuous BP verification. They underwent a 14-day CIH protocol with daily intraperitoneal injections of either 35mg/kg of HCQ diluted in saline (CIH+HCQ group, n=5) or saline vehicle (CIH group, n=6). An additional control group was run with saline vehicle injection and no CIH (Sham group, n=6). Nitrogen was introduced in the cages to reduce the oxygen fraction from 21% to ~6%. During 8 hours daily the system simulated an apnea/hypopnea index of 51/h. *Results:* Groups showed no difference in baseline BP and HR. The CIH group reached significantly greater BP and HR in relation to Sham. In the CIH+HCQ group, BP and HR remained stable throughout the 14 days of the protocol. In the Sham group, all variables decreased over the course of the study. The CIH group had a significant increase in creatinine levels from day 1 to day 14. The time×group interaction was significant for all variables. *Conclusion:* The CIH model significantly increases BP, supporting previous reports

of the role of OSA on the pathogenesis of high BP. Our data suggest a potential inflammatory pathway in the OSA-hypertension relationship, which is mitigated by treatment with HCQ. Studies in humans are needed to assess the effect of HCQ as adjunctive therapy in OSA.

**Keywords:** chronic intermittent hypoxia, sleep apnea, hydroxychloroquine, blood pressure, hypertension

## INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea (OSA) is a highly prevalent disorder<sup>1</sup>, affecting up to 38% in the general adult population<sup>2</sup>, and is characterized by repetitive collapse of the pharyngeal airway during sleep, leading to intermittent hypoxia followed by reoxygenation. These can activate several pathological pathways such as oxidative stress and inflammation that can lead to endothelial dysfunction and cardiovascular disease (CVD).<sup>3</sup> Indeed, OSA is considered an independent risk factor for CVD, with cardiovascular events occurring three times more frequently in patients with OSA compared to controls<sup>4</sup>. These events include systemic arterial hypertension<sup>5,6,7</sup> but also coronary artery disease, congestive cardiac failure, and cerebrovascular events.<sup>8</sup>

To evaluate the relationship between intermittent hypoxia and hypertension, the experimental model of chronic intermittent hypoxia (CIH) has been used to study the mechanisms underlying the sustained increase in arterial blood pressure (BP) observed after long-term exposure to intermittent hypoxia.<sup>9,10,11</sup> Rats exposed to CIH respond with several cardiovascular and metabolic sequelae including oxidative stress, hypertension<sup>12,13,14,15</sup>, impaired vascular function<sup>16,17</sup>, glucose intolerance<sup>18</sup>, and endothelial dysfunction.<sup>19</sup>

Hydroxychloroquine (HCQ) have been proven to exert anti-inflammatory effects through down-regulation of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ .<sup>20,21</sup> Used in treatments, HCQ may be a potential therapeutic agent for inflammation associated with pulmonary fibrosis<sup>22</sup> and acts as a bradycardic agent in sinoatrial node (SAN) cells, in atrial preparations, and *in vivo*.<sup>23</sup> In a 2016 retrospective study published in the Journal of the American Heart Association, HCQ use was associated with a 72% decrease in risk for CVD in patients with rheumatoid arthritis.<sup>24</sup> We hypothesized that in rats, CIH causes

high BP through vascular inflammation that could be controlled by anti-inflammatory medication. To test this, we compared changes in BP in Wistar rats exposed to 14 days of CIH with and without treatment with HCQ.

## **METHODS**

### **Sample size**

The sample size was calculated based on means and standard deviations of BP observed in a study<sup>25</sup> that measured BP after intermittent hypoxia. Sample size calculations were performed for repeated measures analysis of variance within-between interaction using G\*Power software 3.1.9.2.<sup>26</sup> To an effect size of 0.6 for a power of 90% at P alpha <0.05, for three groups, a sample size of at least 5 in each group was required, totaling 15 animals.

### **Animals**

Male Wistar rats were used for control (Sham; n=6), chronic intermittent hypoxia (CIH; n=6) and chronic intermittent hypoxia plus use of HCQ (CIH+HCQ; n=5) protocols. Their initial mean weight was ~413 g. Rats were fed with standard rat chow diet *ad libitum*, temperature and humidity were controlled (20-24°C; 40-60%), and animals were housed in a 12:12 light-dark cycle with lights on at 07:00 h. All experimental protocols were approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil (CEUA 130490).

## **Protocols**

Animals were housed in individual cages and maintained in 21-liter Plexiglas chambers equipped with O<sub>2</sub> sensors (Medical Oxygen Monitor Model MX300, Teledyne Analytical Instruments). Injections of nitrogen (Air Liquide, Porto Alegre, Brazil) were regulated by a solenoid valve operated by an automatic system (Novus Produtos Eletrônicos Ltda., Canoas, Brazil).

The intermittent hypoxia protocol consisted of 30 seconds of nitrogen injection to reduce the inspired oxygen fraction (F<sub>I</sub>O<sub>2</sub>) ~6%. F<sub>I</sub>O<sub>2</sub> was maintained at ~6% for an additional 5 seconds, after which room air was introduced in the chamber using a ventilator to return the F<sub>I</sub>O<sub>2</sub> to 21% during the next 30 seconds, followed by a 5-second pause of the ventilator. This 70-second cycle was repeated continuously for 8 hours each day from 9:00am to 5:00pm, for 14 days, simulating an apnea-hypopnea index (AHI) of ~50/h. Gas injectors were positioned to avoid possible stress by jets of gas. The Sham group was submitted to the same ventilator activity as the other groups, but no gas mixture was inserted in the cages in the hypoxia cycle (simulated intermittent hypoxia), to control the effect of stress by timer noises, valve fan and by placing the cap on the cages. At the end of the cardiovascular recordings, rats were killed with an isoflurane overdose.

## **Telemetry monitoring of blood pressure and heart rate**

Mean arterial blood pressure (MAP), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart rate (HR) was measured in conscious rats using radio-telemetry apparatus (PA-C40 and C50 PXT, Data Science International, USA). To implant the sensor, rats were anesthetized with 5% isoflurane and maintained with 2% isoflurane in 100% O<sub>2</sub> during the surgical procedure. The tip of a cannula-coupled telemetry device was introduced into the femoral artery.<sup>27</sup> On the surgery day, rats received one dose of oxytetracycline (60mg/kg,

intramuscular). After surgery, rats received an injection of ketoprofen (5mg/kg/day per 3 days, once a day, subcutaneous) and tramadol (20mg/kg/day per 3 days, twice a day, intraperitoneal). The BP recording was started after 5 days of recovery. The raw data from each rat was collected twice daily during five minutes at the beginning and end of the intermittent hypoxia exposure and averaged for each period using the ART Dataquest Platform (Data Science International, USA) for 14 days.

### **Treatment**

Rats were randomly assigned to receive either 35mg/kg/day of HCQ (7-Chloro-4-[4-(N-ethyl-N-b-hydroxyethylamino)-1-methylbutylamino] quinoline sulfate) diluted in saline (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) or saline vehicle, administered via intraperitoneal injections for 14 days. The HCQ dose was chosen based on the investigation by Long et al. who observed beneficial effects on indices of pulmonary hypertension with 25-50mg/kg/day.<sup>28</sup>

### **Biochemical analyses**

Blood samples were collected from the lateral tail vein of the rats one day before the surgery to implant the telemetry sensor and on the 14<sup>th</sup> day of the protocol, before euthanasia. Plasma creatinine levels were determined by jaffé without deproteinization method (SIEMENS Modular Advia:1800) and plasma glucose was determined by enzymatic hexokinase method (SIEMENS Modular Advia:1800).

### **Statistical analysis**

Generalized Estimating Equations (GEE) with linear distribution and unstructured matrix was used to compare the groups in the pre- and post- protocol. GEE was performed using SPSS version 18.0 (Statistical Package for Social Science). The results are represented as the



mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The statistical significance level was set as  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Rats were randomly assigned to the Sham (n=6), CIH (n=6) and CIH+HCQ (n=5). Groups showed no differences in baseline MAP, PAS, PAD, and HR (Table 1).

**Table 1.** Mean and SEM of MAP, SBP, DBP and HR in Day-1.

	<b>Sham group</b> <b>(mean<math>\pm</math>SEM)</b>	<b>CIH group</b> <b>(mean<math>\pm</math>SEM)</b>	<b>CIH+HCQ group</b> <b>(mean<math>\pm</math>SEM)</b>
<b>MAP (mm Hg)</b>	123 $\pm$ 2.6	114 $\pm$ 6.8	117 $\pm$ 4.3
<b>SBP (mm Hg)</b>	139 $\pm$ 3.4	130 $\pm$ 2.2	130 $\pm$ 8.1
<b>DBP (mm Hg)</b>	105 $\pm$ 2.7	101 $\pm$ 7.8	103 $\pm$ 4.6
<b>HR (bpm)</b>	380 $\pm$ 16.7	363 $\pm$ 8.5	384 $\pm$ 11.1

Sham (control; n=6), CIH (chronic intermittent hypoxia; n=6 except in heart rate where n=5) and CIH+HCQ (chronic intermittent hypoxia plus use of hydroxychloroquine; n=5). Results were obtained by generalized estimating equations. Data are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

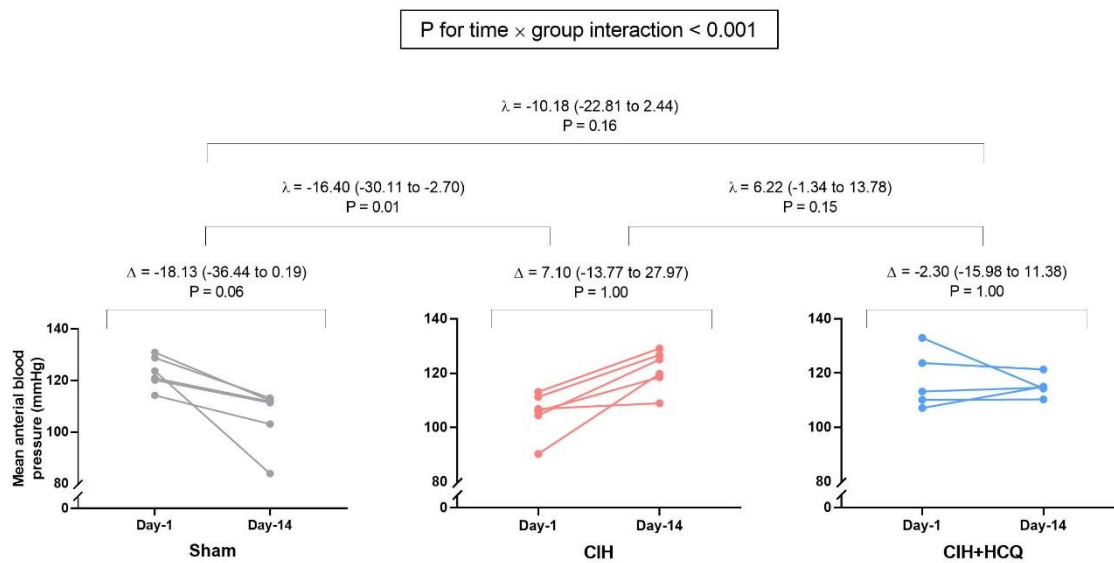
The variables of physiological interest on day 1 and day 14 are presented by group in Table 2. Sham group showed a significant increase in body weight between pre-study (day-1) and post-study (day-14). CIH group showed a significant increase in creatinine levels. CIH+HCQ group showed a significant reduction in body weight. There were no significant differences in glucose levels among the groups. The time $\times$ group interaction was significant for body weight and creatinine levels.

**Table 2.** Pre- and post-study characteristics of the study groups.

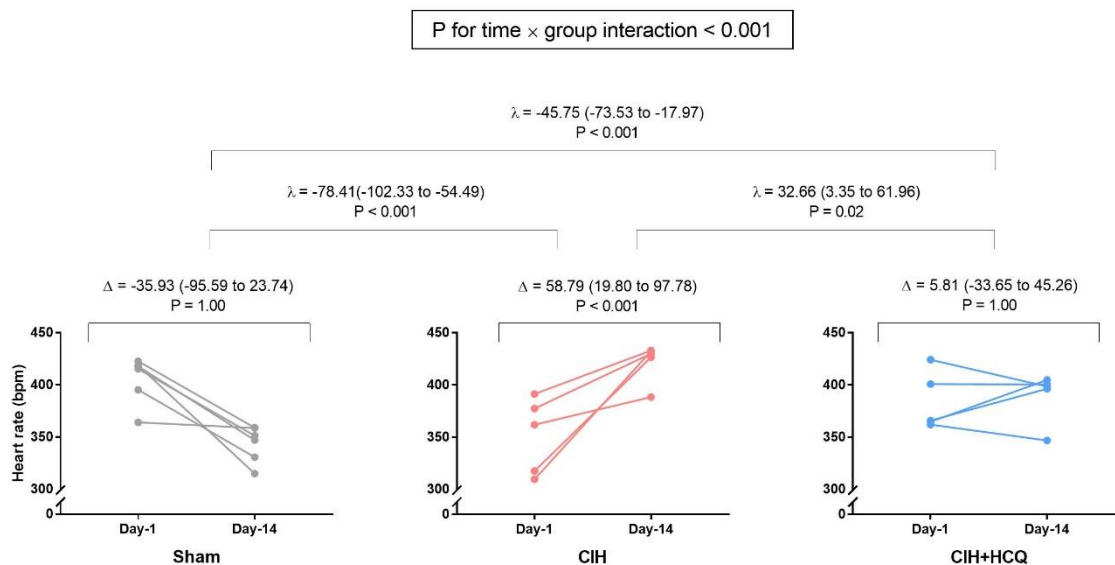
Outcome	Pre-study value (mean and SEM)	Post-study <i>minus</i> pre-study (mean and 95%CI)	Bonferroni P value for pre-study <i>versus</i> post-study	P value for time×group interaction
Weight (g)				
Sham	437.82 (17.36)	20.10 (5.76 to 34.44)	<b>.006</b>	
CIH	396.74 (12.24)	-1.73 (-11.88 to 8.42)	.7	<b>&lt;.001</b>
CIH+HCQ	424.81 (16.92)	-25.54 (-34.34 to -16.75)	<b>&lt;.001</b>	
Glucose (mg/dL)				
Sham	154.33 (8.48)	-7.33 (-31.83 to 17.17)	.6	
CIH	149.17 (5.18)	6.33 (-22.67 to 35.33)	.7	.6
CIH+HCQ	148.40 (3.47)	-13.20 (-39.62 to 13.22)	.3	
Creatinine (mg/dL)				
Sham	0.40 (0.22)	-0.03 (-.12 to .06)	.5	
CIH	0.38 (0.19)	0.17 (.08 to 0.27)	<b>&lt;.001</b>	<b>.006</b>
CIH+HCQ	0.40 (0.01)	0.02(-.04 to .09)	.5	

Sham (control; n=6), CIH (chronic intermittent hypoxia; n=6) and CIH+HCQ (chronic intermittent hypoxia plus use of hydroxychloroquine; n=5). Data are shown as mean ± standard error of the mean and as post-study (day-14) *minus* pre-study (day-1) change (95% confidence interval). P values were obtained from generalized estimating equations with Bonferroni's correction for multiple comparisons. Results with a probability of alpha error<0.05 were considered significant and are shown in bold typeface.

Figures 2 and 3 show changes in MAP and HR within-group, comparing the mean of the variable on day 14 *minus* the average of day 1, and between-groups, comparing the average results on day 14 (first group *minus* second group). The time×group interaction was significant for both variables. In the within-group analysis, the CIH group showed an increase in HR from day 1 to day 14. In the between-groups analysis, the CIH group showed a significant increase in MAP relative to Sham, and HR was significantly different among the three groups. The full results of the GEE model with Bonferroni's correction are shown in Supplementary Tables S1 and S2.

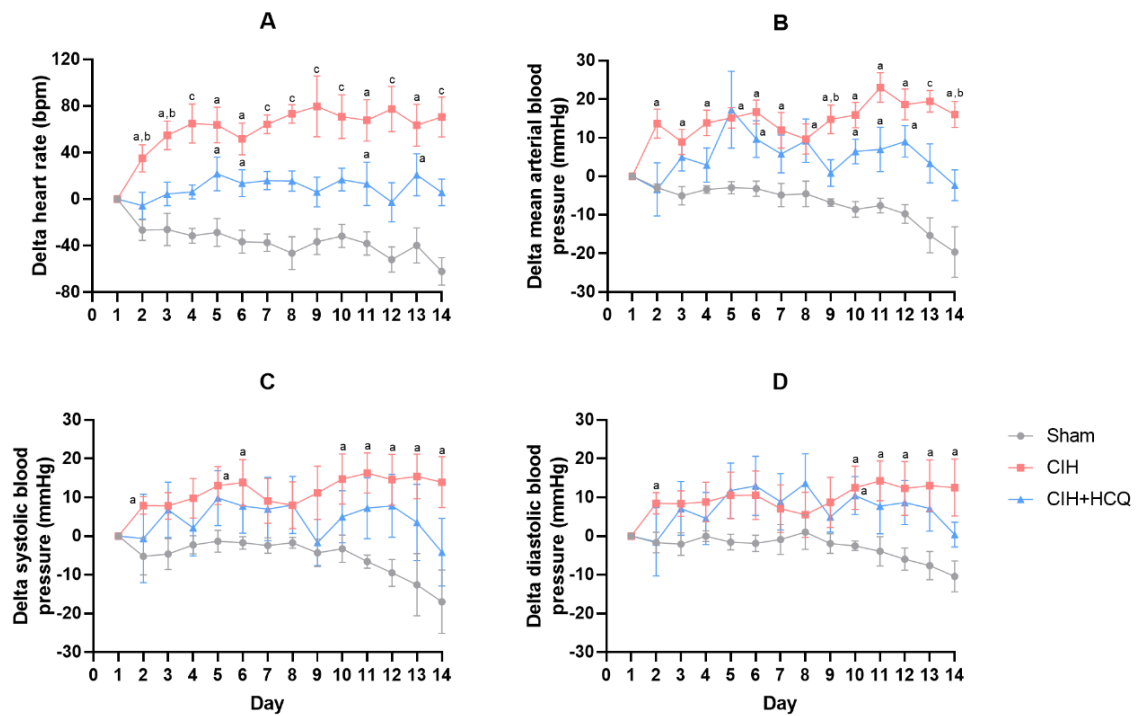


**Figure 2.** Plot of the changes in mean arterial blood pressure in the three groups at Day-1 and Day-14 ( $\Delta$  = means arterial BP at Day-14 *minus* Day-1) and changes between-groups at Day-14 ( $\lambda$  = first group *minus* second group). The within-participant and between-group significances were obtained by generalized estimating equations. Bonferroni's correction was applied for between-group comparisons. Values in parenthesis represent a 95% confidence interval. Results with a probability of alpha error < 0.05 were considered significant. Sham (control; n=6), CIH (chronic intermittent hypoxia; n=6) and CIH+HCQ (chronic intermittent hypoxia plus use of hydroxychloroquine; n=5). No significant MAP change was seen within the three groups. The differences between Sham and CIH groups were statistically significant. The differences between CIH and CIH+HCQ and between Sham and CIH+HCQ were no significant after adjustment. The time×group interaction was significant for mean blood pressure.



**Figure 3.** Plot of the changes in heart rate in the three groups at Day-1 and Day-14 ( $\Delta$  = means heart rate at Day-14 *minus* Day-1) and changes between-groups at Day-14 ( $\lambda$  = first group *minus* second group). The within-participant and between-group significances were obtained by generalized estimating equations. Bonferroni's correction was applied for between-group comparisons. Values in parenthesis represent a 95% confidence interval. Results with a probability of alpha error < 0.05 were considered significant. Sham (control; n=6), CIH (chronic intermittent hypoxia; n=5) and CIH+HCQ (chronic intermittent hypoxia plus use of hydroxychloroquine; n=5). A significant HR change was seen within the CIH group. The differences among the groups were statistically significant. The time  $\times$  group interaction was significant for heart rate.

Figure 4 shows the effects of HCQ on HR, MAP, SBP, and DBP, plotted as the change from day 1 during 14 days of CIH exposure. Also shown are changes in HR, MAP, SBP, and DBP in animals exposed to CIH with a vehicle and in the normoxia control group with a vehicle. P values were obtained from generalized estimating equations with Bonferroni's correction for multiple comparisons. All the groups show a statistically significant time  $\times$  group interaction (p < 0.001).



**Figure 4.** Effects of hydroxychloroquine on changes from day-1 (delta variation) of heart rate (A), mean arterial blood pressure (B), systolic blood pressure (C) and diastolic blood pressure (D) during the intermittent hypoxia exposure against intermittent hypoxia group with a vehicle and the normoxia control group with a vehicle. Sham (control; n=6), CIH (chronic intermittent hypoxia; n=6 except in heart rate where n=5) and CIH+HCQ (chronic intermittent hypoxia plus use of hydroxychloroquine; n=5). Results with a probability of alpha error<0.05 were considered significant. In analyzing 14-days data, the P values are adjusted by Bonferroni's correction. <sup>a</sup> significantly different from the Sham group; <sup>b</sup> significantly different from the CIH+HCQ group; <sup>c</sup> significantly different from the two other groups.

## DISCUSSION

The present results support the working hypothesis that high BP in CIH is due to inflammation. Rats exposed to 14 days of CIH without HCQ showed increased MAP, SBP, and DBP; in contrast, rats treated with HCQ showed no change in MAP, SBP, or DBP in response to CIH, suggesting that HCQ treatment may have prevented hypertension by inhibiting

inflammatory pathways. However, HCQ's action as an immunomodulator does not exclude the possible participation of autonomic and/or renal mechanisms. Higher levels of creatinine in the CIH group suggest alteration of the renal function, which could be a direct cause or consequence of the increased BP or a result of the CIH protocol. A significant increase in HR was the most distinct finding among the three groups, as seen in figure 3. The possibility of a direct action of HCQ on the autonomic system is supported by previous studies.

Concerning inflammation, evidence suggesting an independent link between inflammation and hypertension supports this result. Pathophysiology of CIH-induced changes includes an increase in inflammatory markers.<sup>29</sup> Experimental studies found inflammatory infiltration and immune dysfunction of renal interstitial, vascular adventitia and perivascular fat renal tissue in spontaneously hypertensive rats (SHR).<sup>30,31</sup> At first, it was thought to be a consequence of hypertension, not its cause.<sup>32</sup> Nonetheless, subsequent experimental studies showed an improvement of hypertension after the reduction of renal interstitial inflammation by different methods such as Tongxinluo, an antioxidative Chinese medicine<sup>33</sup>, mycophenolate mofetil<sup>34</sup> and interleukin-10.<sup>35</sup> The studies also found a correlation between the severity of the inflammation and the degree of hypertension.<sup>30</sup>

In our findings, the SBP and DBP showed a similar significant increase in the CIH group compared to the Sham group after day-10, in line with previous findings after 35 days of CIH in rats.<sup>36</sup> A similar increase in BP and HR has been shown after 10 days of CIH protocol.<sup>11,37</sup> In mice, after 2 weeks of CIH, the BP elevation was predominantly diastolic.<sup>38</sup> In a human model, 6 hours of exposure to isocapnic CIH induced a significant increase in SBP, DBP, and MAP.<sup>39</sup> In the Sham group, we can see a decrease in BP and HR, as expected<sup>25</sup> due to acclimation.

It has been suggested that hypertension results from a loss of immunological tolerance and the resulting autoimmunity may be an important underlying factor of its pathogenesis.<sup>40</sup>

Furthermore, the underlying presence of hypertension and CVD are frequently observed in patients with autoimmune diseases.<sup>41</sup> In humans, patients with systemic lupus erythematosus (SLE) had greater visit-to-visit variability in BP than control subjects, and HCQ use was associated with reduced BP visit-to-visit variability.<sup>42</sup> In a female mouse model of SLE treated with HCQ 10mg/kg/day by gavage for 5 weeks, HCQ reduced hypertension, endothelial dysfunction, and organ damage.<sup>43</sup> In mice, 28 days of HCQ (100 mg/kg) administered in drinking water had no effect on BP measured by tail-cuff plethysmography.<sup>23</sup> In our study, we used telemetry to measure the variables, the most advanced method for monitoring physiological functions of laboratory animals.<sup>44</sup> This method does not produce stress on the animals, reducing confounds in the collected results.

Chloroquine (CQ), a drug with a similar composition to HCQ, has been shown to have an anti-hypertensive effect in rats. Twenty-one days of treatment with CQ (40 mg/kg/day via intraperitoneal injection) prevented the development of high BP in adult (12 weeks old) SHR, but not in young (5 weeks) SHR.<sup>45</sup> Innate immune system responses to damage-associated molecular patterns (DAMPs) are involved in hypertension. Circulating mitochondrial DNA is a DAMP that activates Toll-like receptor (TLR) 9 and is elevated in SHR. The results indicate that CQ also has antihypertensive actions, possibly through the regulation of TLR 9 signaling, which may lower cardiovascular disease risk in autoimmune patients with hypertension.<sup>46</sup> Macitentan, an endothelin receptor antagonist used in the treatment of pulmonary arterial hypertension, prevented the increases in MAP caused by chronic kidney disease (CKD), two weeks of CIH and the combination of CKD+CIH, in Sprague-Dawley rats. After this period, macitentan reversed hypertension in all groups, even without improving renal function.<sup>47</sup>

Concerning renal changes, high levels of creatinine can indicate renal complications caused by CIH or hypertension in rats. Researchers found that serum creatinine is higher in OSA patients compared to controls.<sup>48</sup> Similarly, patients with coronary artery disease also have

increased levels of serum creatinine compared to controls, showing a positive correlation with hypertension.<sup>49</sup> In our findings, the group treated with HCQ did not have an increase in creatinine. This could be because HCQ has already been shown to have positive effects in patients with SLE.<sup>50</sup> A study including 450 SLE patients demonstrated that HCQ was protective against renal insufficiency: 64% of patients treated with HCQ achieved remission within a year, as compared to 22% of patients without HCQ.<sup>51</sup> Therefore, renal damage may be delayed or prevented by HCQ.<sup>52</sup>

Concerning the autonomic nervous system changes, there was a significant increase in HR in the CIH group, but no change in HR in the CIH+HCQ. HR is determined by the intrinsic rate of spontaneous activity in the SAN. Critically, HR is modulated by the autonomic nervous system.<sup>53</sup> The sympathetic nervous system increases HR by increasing spontaneous action potential firing in SAN myocytes while the parasympathetic nervous system decreases HR by reducing the frequency of spontaneous SAN action potential firing.<sup>54</sup> Persistent sympathetic activation and hypertension associated with OSA seem to be due to a combination of altered chemo- and baro-reflexes resulting in sympathetic activation and action of elevated circulating levels of vasoactive hormones on vasculature.<sup>55,56</sup>

In our study, we can infer the possibility of a direct action of HCQ on the autonomic system. Acute *in vivo* experiments to measure HR and BP responses to intravenous doses of HCQ via the left carotid artery in anesthetized adult male Sprague Dawley rats showed a significant transient reduction in HR at cumulative doses of 7.5 mg/kg and above. At 20 mg/kg and above, HR remains significantly below the baseline rate even during the compensatory period. In contrast, MAP is compensated for at all doses used and the transient drop in BP is significant only at doses of 20 mg/kg and above.<sup>23</sup> At extremely high doses, MAP was observed to be significantly reduced, which may reflect an additional vasodilator or negative inotropic action of HCQ. HCQ acts as a bradycardic agent in SAN cells, in atrial preparations and *in vivo*.



Changes in body weight are difficult to interpret since the loss of appetite may be a common adverse reaction to either HCQ or CIH. The CIH+HCQ group lost weight after 14 days of the protocol. The Sham group, without the stressors of hypoxia and HCQ, gained weight. Our results were similar to findings in mice exposed to CIH after 14 days<sup>38</sup>, which also showed significant increases in weight. In mice, no significant weight loss was observed after 28 days of administration of HCQ (100 mg/kg) via drinking water.<sup>23</sup> Thus, it is likely that the weight loss we observed in the CIH+HCQ group could be caused by the effects of CIH<sup>38</sup> and the use of HCQ.

These results are preliminary and studies with a larger number of animals will still be needed to confirm them. Some differences may not have been significant due to the lack of statistical power, given the small number of animals. Since we did not assess inflammatory markers, we are not able to confirm the role of inflammation, although our results are highly suggestive. This is the first study and, therefore, the best available evidence on the effect of the HCQ on CIH-induced hypertension.

## **CONCLUSION**

The model of CIH is capable of increasing BP, supporting previous findings of the role of CIH in the pathogenesis of arterial hypertension. HCQ may have prevented BP increase via inflammatory, autonomic, and/or renal pathways. Our data represent the first step towards further studies on the potential beneficial effects of HCQ as adjunctive therapy in OSA.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Table S1.** Pairwise Group and Time comparisons of estimated marginal means based on the difference in the Day-14 of mean arterial blood pressure against the Day-1 with Bonferroni's correction.

Time	(I) Group	(J) Group	Mean difference (I-J)	SEM	Bonferroni significance	95%CI for difference	
						Lower	Upper
Day-1	Sham	CIH	8.83	6.26	0.48	-6.16	23.82
	Sham	CIH+HCQ	5.64	4.84	0.73	-5.95	17.23
	CIH	CIH+HCQ	-3.19	7.24	1.00	-20.52	14.14
Day-14	Sham	CIH	<b>-16.40</b>	5.72	<b>0.01</b>	-30.11	-2.70
	Sham	CIH+HCQ	-10.18	5.27	0.16	-22.81	2.44
	CIH	CIH+HCQ	6.22	3.16	0.15	-1.34	13.78
Group	(I) Time	(J) Time					
Sham	Day-14	Day-1	-18.13	5.30	0.06	-36.44	0.19
CIH	Day-14	Day-1	7.10	6.04	1.00	-13.77	27.98
CIH+HCQ	Day-11	Day-1	-2.30	3.96	1.00	-15.98	11.38

Sham (control; n=6), CIH (chronic intermittent hypoxia; n=6 except in heart rate where n=5) and CIH+HCQ (chronic intermittent hypoxia plus use of hydroxychloroquine; n=5). P values were obtained from generalized estimating equations with Bonferroni's correction for multiple comparisons. Results with a probability of alpha error<0.05 were considered significant and are shown in bold typeface.

**Table S2.** Pairwise Group and Time comparisons of estimated marginal means based on the difference in the Day-14 of heart rate against the Day-1 with Bonferroni's correction.

Time	(I) Group	(J) Group	Mean difference (I-J)	SEM	Bonferroni significance	95%CI for difference	
						Lower	Upper
Day-1	Sham	CIH	16.30	18.74	1.00	-28.55	61.16
	Sham	CIH+HCQ	-4.02	20.03	1.00	-51.98	43.94
	CIH	CIH+HCQ	-20.32	14.00	0.44	-53.85	13.20
Day-14	Sham	CIH	<b>-78.41</b>	9.99	<b>&lt;0.001</b>	-102.33	-54.49
	Sham	CIH+HCQ	<b>-45.75</b>	11.60	<b>&lt;0.001</b>	-73.53	-17.97
	CIH	CIH+HCQ	<b>32.66</b>	12.24	<b>0.02</b>	3.35	61.96
Group	(I) Time	(J) Time					
Sham	Day-14	Day-1	-35.93	17.27	1.00	-95.59	23.74
CIH	Day-14	Day-1	<b>58.79</b>	11.28	<b>&lt;0.001</b>	19.80	97.78
CIH+HCQ	Day-14	Day-1	5.81	11.42	1.00	-33.65	45.26

Sham (control; n=6), CIH (chronic intermittent hypoxia; n=6 except in heart rate where n=5) and CIH+HCQ (chronic intermittent hypoxia plus use of hydroxychloroquine; n=5). P values were obtained from generalized estimating equations with Bonferroni's correction for multiple comparisons. Results with a probability of alpha error<0.05 were considered significant and are shown in bold typeface.

## REFERENCES

---

- <sup>1</sup> Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, Heinzer R, Ip MSM, Morrell MJ, Nunez CM, Patel SR, Penzel T, Pépin JL, Peppard PE, Sinha S, Tufik S, Valentine K, Malhotra A. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir Med.* 2019;7:687-98.
- <sup>2</sup> Senaratna CV, Perret JL, Lodge CJ, Lowe AJ, Campbell BE, Matheson MC, Hamilton GS, Dharmage SC. Prevalence of obstructive sleep apnea in the general population: A systematic review. *Sleep Med Rev.* 2017;34:70-81.
- <sup>3</sup> Badran M, Ayas N, Laher I. Insights into obstructive sleep apnea research. *Sleep Med.* 2014;15:485-95.
- <sup>4</sup> Young T, Finn L, Peppard PE, Szklo-Coxe M, Austin D, Nieto FJ, Stubbs R, Hla KM. Sleep disordered breathing and mortality: eighteen-year follow-up of the Wisconsin sleep cohort. *Sleep.* 2008;31:1071-8.
- <sup>5</sup> Caples SM, Gami AS, Somers VK. Obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med.* 2005;142:187-97.
- <sup>6</sup> Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, D'Agostino RB, Newman AB, Lebowitz MD, Pickering TG. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. *Sleep Heart Health Study. JAMA.* 2000;283:1829-36. Erratum in: *JAMA* 2002;288:1985.
- <sup>7</sup> Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med.* 2000;342:1378-84.
- <sup>8</sup> Shahar E, Whitney CW, Redline S, Lee ET, Newman AB, Javier Nieto F, O'Connor GT, Boland LI, Schwartz JE, Samet JM. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:19-25

- 
- <sup>9</sup> do Carmo JM, da Silva AA, Moak SP, da Silva FS, Spradley FT, Hall JE. Role of melanocortin 4 receptor in hypertension induced by chronic intermittent hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)*. 2019;225:e13222.
- <sup>10</sup> Ganesh BP, Nelson JW, Eskew JR, Ganesan A, Ajami NJ, Petrosino JF, Bryan RM Jr, Durgan DJ. Prebiotics, Probiotics, and Acetate Supplementation Prevent Hypertension in a Model of Obstructive Sleep Apnea. *Hypertension*. 2018;72:1141-50.
- <sup>11</sup> Perim RR, Bonagamba LG, Machado BH. Cardiovascular and respiratory outcome of preconditioned rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol*. 2015;100:1008-17.
- <sup>12</sup> Prabhakar NR, Peng YJ, Jacono FJ, Kumar GK, Dick TE. Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32:447-9.
- <sup>13</sup> Zoccal DB, Bonagamba LG, Antunes-Rodrigues J, Machado BH. Plasma corticosterone levels is elevated in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Auton Neurosci*. 2007;134:115-7.
- <sup>14</sup> Iturriaga R, Moya EA, Del Rio R. Carotid body potentiation induced by intermittent hypoxia: implications for cardiorespiratory changes induced by sleep apnoea. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36:1197-204.
- <sup>15</sup> Nanduri J, Makarenko V, Reddy VD, Yuan G, Pawar A, Wang N, Khan SA, Zhang X, Kinsman B, Peng YJ, Kumar GK, Fox AP, Godley LA, Semenza GL, Prabhakar NR. Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:2515-20.
- <sup>16</sup> Kanagy NL, Walker BR, Nelin LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension*. 2001;37:511-5.

- 
- <sup>17</sup> Allahdadi KJ, Cherng TW, Pai H, Silva AQ, Walker BR, Nelin LD, Kanagy NL. Endothelin type A receptor antagonist normalizes BP in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H434-40.
- <sup>18</sup> Shamsuzzaman AS, Gersh BJ, Somers VK. Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease. *JAMA*. 2003;290:1906-14.
- <sup>19</sup> Golbidi S, Badran M, Ayas N, Laher I. Cardiovascular consequences of sleep apnea. *Lung*. 2012;190:113-32.
- <sup>20</sup> Jang CH, Choi JH, Byun MS, Jue DM. Chloroquine inhibits production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45:703-10.
- <sup>21</sup> Weber SM, Levitz SM. Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomotropic mechanism. *J Immunol*. 2000;165:1534-40.
- <sup>22</sup> Liu L, Ren J, He Z, Men K, Mao Y, Ye T, Chen H, Li L, Xu B, Wei Y, Wei X. Cholesterol-modified Hydroxychloroquine-loaded Nanocarriers in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. *Sci Rep*. 2017;7:10737.
- <sup>23</sup> Capel RA, Herring N, Kalla M, Yavari A, Mirams GR, Douglas G, Bub G, Channon K, Paterson DJ, Terrar DA, Burton RA. Hydroxychloroquine reduces heart rate by modulating the hyperpolarization-activated current If: Novel electrophysiological insights and therapeutic potential. *Heart Rhythm*. 2015;12:2186-94.
- <sup>24</sup> Sharma TS, Wasko MC, Tang X, Vedamurthy D, Yan X, Cote J, Bili A. Hydroxychloroquine Use Is Associated With Decreased Incident Cardiovascular Events in Rheumatoid Arthritis Patients. *J Am Heart Assoc*. 2016;5.
- <sup>25</sup> Tahawi Z, Orolinova N, Joshua IG, Bader M, Fletcher EC. Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats. *J Appl Physiol*. 2001;90:2007-13.

- 
- <sup>26</sup> Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39:175-91.
- <sup>27</sup> Del Rio R, Andrade DC, Lucero C, Arias P, Iturriaga R. Carotid Body Ablation Abrogates Hypertension and Autonomic Alterations Induced by Intermittent Hypoxia in Rats. *Hypertension*. 2016;68:436-45.
- <sup>28</sup> Long L, Yang X, Southwood M, Lu J, Marciniak SJ, Dunmore BJ, Morrell NW. Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation. *Circ Res*. 2013;112:1159-70.
- <sup>29</sup> Aziz F, Chaudhary K. The Triad of Sleep Apnea, Hypertension, and Chronic Kidney Disease: A Spectrum of Common Pathology. *Cardiorenal Med*. 2016;7:74-82.
- <sup>30</sup> Rodriguez-Iturbe B, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286:F606-16.
- <sup>31</sup> Heijnen BF, Van Essen H, Schalkwijk CG, Janssen BJ, Struijker-Boudier HA. Renal inflammatory markers during the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2014;37:100-9.
- <sup>32</sup> Bendich A, Belisle EH, Strausser HR. Immune system modulation and its effect on the BP of the spontaneously hypertensive male and female rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1981;99:600-7.
- <sup>33</sup> Luo WM, Kong J, Gong Y, Liu XQ, Yang RX, Zhao YX. Tongxinluo Protects against Hypertensive Kidney Injury in Spontaneously-Hypertensive Rats by Inhibiting Oxidative Stress and Activating Forkhead Box O1 Signaling. *PLoS One*. 2015;10:e0145130.
- <sup>34</sup> Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, Rincon J, Chavez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gómez-

---

Garre D, Largo R, Egido J, Johnson RJ, Rodríguez-Iturbe B. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;281:F38-47.

<sup>35</sup> Tinsley JH, South S, Chiasson VL, Mitchell BM. Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and BP in hypertensive pregnant rats. *Am J Physiol Regulat Integr Compar Physiol.* 2010;298:R713-19.

<sup>36</sup> Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC 3rd, Unger T. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of BP in rats. *Hypertension.* 1992;19:555-61.

<sup>37</sup> Bazilio DS, Bonagamba LGH, Moraes DJA, Machado BH. Cardiovascular and respiratory profiles during the sleep-wake cycle of rats previously submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol.* 2019 Sep;104(9):1408-1419.

<sup>38</sup> Dematteis M, Julien C, Guillermet C, Sturm N, Lantuejoul S, Mallaret M, Lévy P, Gozal E. Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:227-35.

<sup>39</sup> Foster GE, Hanly PJ, Ahmed SB, Beaudin AE, Pialoux V, Poulin MJ. Intermittent hypoxia increases arterial BP in humans through a Renin-Angiotensin system-dependent mechanism. *Hypertension.* 2010;56:369-77.

<sup>40</sup> Mathis KW, Broome HJ, Ryan MJ. Autoimmunity: an underlying factor in the pathogenesis of hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2014;16:424.

<sup>41</sup> Mellana WM, Aronow WS, Palaniswamy C, Khera S. Rheumatoid arthritis: cardiovascular manifestations, pathogenesis, and therapy. *Curr Pharm Des.* 2012;18:1450-6.

<sup>42</sup> Reese T, Dickson AL, Shuey MM, Gandelman JS, Barnado A, Barker KA, Neal JE, Khan OA, Dupont WD, Stein CM, Chung CP. Increased BP visit-to-visit variability in patients with systemic lupus erythematosus: association with inflammation and comorbidity burden. *Lupus.* 2019;28:954-60.



- 
- <sup>43</sup> Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Romero M, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Gómez-Morales M, O'Valle F, López-Farré AJ, Algieri F, Gálvez J, Pérez-Vizcaino F, Sabio JM, Duarte J. Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension*. 2014;64:330-7.
- <sup>44</sup> Braga VA, Prabhakar NR. Refinement of telemetry for measuring BP in conscious rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2009;48:268-71.
- <sup>45</sup> McCarthy CG, Wenceslau CF, Goulopoulou S, Ogbi S, Matsumoto T, Webb RC. Autoimmune therapeutic chloroquine lowers BP and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res*. 2016;113:384-94.
- <sup>46</sup> McCarthy CG, Wenceslau CF, Goulopoulou S, Baban B, Matsumoto T, Webb RC. Chloroquine Suppresses the Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens*. 2017;30:173-181.
- <sup>47</sup> Morales-Loredo H, Jones D, Barrera A, Mendiola PJ, Garcia J, Pace C, Murphy M, Kanagy NL, Gonzalez Bosc LV. A dual blocker of endothelin A/B receptors mitigates hypertension but not renal dysfunction in a rat model of chronic kidney disease and sleep apnea. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019 May 1;316(5):F1041-52.
- <sup>48</sup> Uyar M, Davutoğlu V, Gündoğdu N, Kosovalı D, Sarı İ. Renal functions in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Breath*. 2016;20:191-5.
- <sup>49</sup> Bagheri B, Radmard N, Faghani-Makrani A, Rasouli M. Serum Creatinine and Occurrence and Severity of Coronary Artery Disease. *Med Arch*. 2019;73:154-6.
- <sup>50</sup> Fangtham M, Petri M. 2013 update: Hopkins lupus cohort. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15:360.
- <sup>51</sup> Kasitanon N, Fine DM, Haas M, Magder LS, Petri M. Hydroxychloroquine use predicts complete renal remission within 12 months among patients treated with mycophenolate mofetil therapy for membranous lupus nephritis. *Lupus*. 2006;15:366-70.

- 
- <sup>52</sup> Fessler BJ, Alarcón GS, McGwin G Jr, Roseman J, Bastian HM, Friedman AW, Baethge BA, Vilá L, Reveille JD; LUMINA Study Group. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: XVI. Association of hydroxychloroquine use with reduced risk of damage accrual. *Arthritis Rheum.* 2005;52:1473-80.
- <sup>53</sup> Mangoni ME, Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev.* 2008;88:919-82.
- <sup>54</sup> Moghtadaei M, Langille E, Rafferty SA, Bogachev O, Rose RA. Altered heart rate regulation by the autonomic nervous system in mice lacking natriuretic peptide receptor C (NPR-C). *Sci Rep.* 2017;7:17564.
- <sup>55</sup> Prabhakar NR, Kumar GK. Mechanisms of sympathetic activation and BP elevation by intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;174:156-61.
- <sup>56</sup> Lesske J, Fletcher EC, Bao G, Unger T. Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia-influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system. *J Hypertens.* 1997;15:1593-603.

## **8. ARTIGO 2**

# EFFECTS OF HYDROXYCHLOROQUINE ON VASCULAR ALTERATIONS IN SLEEP APNEA

## Abstract

*Introduction:* Chronic intermittent hypoxia (CIH) is a feature of obstructive sleep apnea (OSA) that may be responsible for high blood pressure (BP). Animal models of OSA, using CIH, produce inflammation and structural vascular changes. Hydroxychloroquine (HCQ) exerts anti-inflammatory action. We hypothesized that the anti-inflammatory of HCQ alters BP and affects the expression of the vascular protein. *Objectives:* To test whether HCQ reduces BP and affects calponin and caldesmon CIH-induced expression in the vascular smooth muscle. *Methods:* Seventeen male 12-week-old Wistar rats were implanted with telemetry sensors for BP verification. They underwent a 14-day CIH protocol with daily intraperitoneal injections of either 35mg/kg of HCQ diluted in saline (CIH+HCQ group, n=5) or saline vehicle (CIH group, n=6). An additional control group was run with saline vehicle injection and no CIH (Sham group, n=6). Nitrogen was introduced in the cages to reduce the oxygen fraction from 21% to ~6%. During 8 hours daily the system simulated an apnea/hypopnea index of 51/h. On the 14<sup>th</sup> day, aorta and renal artery samples were collected for immunohistochemistry to quantify the expression of calponin and caldesmon. *Results:* BP increased significantly in the CIH group relative to Sham at the end of the protocol, with a significant time×group interaction. A significant increase in calponin expression in the aorta was seen in the CIH+HCQ group relative to the CIH group, with significant time×group interaction. No significant difference in caldesmon expression in the aorta between the groups was seen. *Conclusion:* The increase in

BP in a CIH model was accompanied by a reduction in calponin expression, suggesting a possible role of this protein in the pathogenesis of high BP. Our data suggest a potential inflammatory pathway in the OSA-hypertension relationship, which is mitigated by treatment with HCQ. Studies in humans are warranted to assess the effect of HCQ as adjunctive therapy in OSA.

**Keywords:** chronic intermittent hypoxia, sleep apnea, hydroxychloroquine, blood pressure, hypertension, vascular alterations, calponin, caldesmon

## INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea (OSA) is characterized by the repetitive collapse of the pharynx during sleep, leading to intermittent hypoxia followed by reoxygenation. It affects 9% to 38% of the adult population in general.<sup>1</sup> In individuals aged between 30 and 69, the global prevalence would be almost one billion people affected, being over 50% in some countries.<sup>2</sup>

The repetitive episodes of hypoxia can activate several pathological mechanisms, such as oxidative stress and inflammation, which can lead to endothelial dysfunction and cardiovascular diseases (CVD).<sup>3</sup> Systemic arterial hypertension is the main associated disease.<sup>4,5</sup>

The experimental model of chronic intermittent hypoxia (CIH) *in vitro*, in humans and animals is used to study the mechanisms underlying the sustained increase in blood pressure (BP) observed after long-term exposure to CIH, the main effect of OSA.<sup>6,7,8</sup> Rats exposed to CIH respond with several cardiovascular and metabolic changes, including oxidative stress, hypertension<sup>9,10,11,12</sup>, impaired vascular function<sup>13,14</sup>, glucose intolerance<sup>15</sup> and endothelial dysfunction.<sup>16</sup>

The animal model of CIH, by producing oxidative stress and inflammation, promotes endothelial dysfunction, which has a causal role in promoting structural vascular changes.<sup>17</sup> Experimental studies in rodents have shown that CIH alone is a causative factor of vascular remodeling and hypertension in part due to vascular inflammation<sup>18,19,20</sup>, and oxidative stress.<sup>21,22</sup>

The smooth muscle in the middle layer regulates the lumen of blood vessels. Its contraction, through the binding of actin and myosin, is modulated by proteins such as caldesmon<sup>23</sup> and calponin.<sup>24</sup> Calponin 1 is specifically expressed in smooth muscle cells and

plays a role in fine-tuning smooth muscle contractility.<sup>25</sup> Data from *in vitro* experiments suggest that calponin 1 functions as an inhibitory regulator of smooth muscle contractility by inhibiting actomyosin interactions.<sup>26,27,28</sup> Caldesmon is responsible for the direct inhibition of myosin ATPase activity.<sup>24</sup> Caldesmon stabilizes the actin cytoskeleton by multiple molecular mechanisms, including protection of filamentous actin against severing by inhibition of actomyosin interaction and its inhibitory action is modulated by both Ca<sup>2+</sup> and phosphorylation.<sup>29,30</sup>

OSA has characteristics of low-grade chronic inflammatory disease.<sup>31</sup> Thus, part of the morbid phenotypic signature of OSA would be causally explained by inflammatory processes that induce target organ dysfunction. Hydroxychloroquine (HCQ) exerts anti-inflammatory effects through negative regulation of pro-inflammatory cytokines.<sup>32,33</sup> Used in treatments, HCQ may be a potential therapeutic agent for inflammation associated with pulmonary fibrosis<sup>34</sup> and acts as a bradycardic agent in sinoatrial node cells, in atrial preparations, and *in vivo*.<sup>35</sup> In a 2016 retrospective study published in the Journal of American Heart Association, HCQ use was associated with a 72% decrease in risk for CVD in patients with rheumatoid arthritis.<sup>36</sup>

We hypothesized that the anti-inflammatory action of HCQ reduces BP and alters vascular proteins expression in an animal model of OSA. We exposed three groups of Wistar rats to 14 days of CIH to compare changes in BP and vascular proteins expression among groups, in search of some response to HCQ.

## **METHODS**

### **Sample size**

The sample size was calculated based on means and standard deviations of BP observed in a study<sup>37</sup> that measured BP after intermittent hypoxia. Sample size calculations were performed for repeated measures analysis of variance within-between interaction using G\*Power software 3.1.9.2.<sup>38</sup> To an effect size of 0.6 for a power of 90% at P alpha <0.05, for three groups, a sample size of at least 5 in each group was required, totaling 15 animals.

### **Animals**

Male Wistar rats were used for control (Sham; n=6), chronic intermittent hypoxia (CIH; n=6) and chronic intermittent hypoxia plus use of hydroxychloroquine (CIH+HCQ; n=5) protocols. Their initial mean weight was ~413 g. Rats were fed with standard rat chow diet *ad libitum*, temperature and humidity were controlled (20-24°C; 40-60%), and animals were housed in a 12:12 light-dark cycle with lights on at 07:00 h. All experimental protocols were approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil (CEUA 130490).

### **Protocols**

Animals were housed in individual cages and maintained in 21-liter Plexiglas chambers equipped with O<sub>2</sub> sensors (Medical Oxygen Monitor Model MX300, Teledyne Analytical Instruments). Injections of nitrogen (Air Liquide, Porto Alegre, Brazil) were regulated by a solenoid valve operated by an automatic system (Novus Produtos Eletrônicos Ltda., Canoas, Brazil).



The intermittent hypoxia protocol consisted of 30 seconds of nitrogen injection to reduce the inspired oxygen fraction ( $F_{I}O_2$ ) ~6%.  $F_{I}O_2$  was maintained at ~6% for an additional 5 seconds, after which room air was introduced in the chamber using a ventilator to return the  $F_{I}O_2$  to 21% during the next 30 seconds, followed by a 5-second pause of the ventilator. This 70-second cycle was repeated continuously for 8 hours each day from 9:00am to 5:00pm, for 14 days, simulating an apnea-hypopnea index (AHI) of ~50/h. Gas injectors were positioned to avoid possible stress by jets of gas. The Sham group was submitted to the same ventilator activity as the other groups, but no gas mixture was inserted in the cages in the hypoxia cycle (simulated intermittent hypoxia), to control the effect of stress by timer noises, valve fan and by placing the cap on the cages. At the end of the cardiovascular recordings, rats were killed with an isoflurane overdose.

### **Telemetry monitoring of blood pressure**

Mean arterial blood pressure (MAP) was measured in conscious rats using radio-telemetry apparatus (PA-C40 and C50 PXT, Data Science International, USA). To implant the sensor, rats were anesthetized with 5% isoflurane and maintained with 2% isoflurane in 100%  $O_2$  during the surgical procedure. The tip of a cannula-coupled telemetry device was introduced into the femoral artery.<sup>39</sup> On the surgery day, rats received one dose of oxytetracycline (60mg/kg, intramuscular). After surgery, rats received an injection of ketoprofen (5mg/kg/day per 3 days, once a day, subcutaneous) and tramadol (20mg/kg/day per 3 days, twice a day, intraperitoneal). The BP recording was started after 5 days of recovery. The raw data from each rat was collected twice daily during five minutes at the beginning and end of the intermittent hypoxia exposure and averaged for each period using the ART Dataquest Platform (Data Science International, USA) for 14 days.

## **Treatment**

Rats were randomly assigned to receive either 35mg/kg/day of HCQ (7-Chloro-4-[4-(N-ethyl-N-b-hydroxyethylamino)-1-methylbutylamino] quinoline sulfate) diluted in saline (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) or saline vehicle, administered via intraperitoneal injections for 14 days. The HCQ dose was chosen based on the investigation by Long et al. who observed beneficial effects on indices of pulmonary hypertension with 25-50mg/kg/day.<sup>40</sup>

## **Histological analysis**

On day 14, the animals were euthanized using an overdose of isoflurane and tissue samples (aorta and renal artery) were taken and fixed in a preserver containing 10% formalin buffer, processed and embedded in paraffin, and then sectioned at a microtome set to a thickness of 3 µm. The sections were placed on previously indicating slides of tissue microarrays. All samples were stained with hematoxylin-eosin to examine the general structure.

To perform the immunohistochemistry technique, the slides were heated in an oven at 75°C for 2 hours, deparaffinized in xylol, rehydrated in ethyl alcohol and then washed in distilled water and maintained 5 min in PBS. Antigenic recovery was performed in a water bath for 20 minutes at 94°C in pH 6 citrate buffer and the slides cooled in the buffer for 20 minutes. Endogenous peroxidase activity was blocked with 5% hydrogen peroxide solution in methanol for 20 minutes in the dark. Protein blocking was performed with 5% dilute skimmed milk powder in PBS for 20 minutes. The sections were subsequently incubated overnight in a 4°C refrigerator with the primary antibody caldesmon (Caldesmon A-2: sc-271222, 1:50 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) and calponin (Calponin 1 Calp: sc-58707, 1:200 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA). After incubation, the secondary anti-mouse antibody was applied at 1:200 dilution and incubated for 1 hour and 30 minutes at room temperature and visualization of the reaction was obtained with Liquid Dab

(Dako, K3468; Agilent Technologies, Ins., Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. After visualization, the slides were counterstained in Harris hematoxylin for 20 seconds, the cuts were dehydrated in absolute alcohol and placed in xylol for mounting the Entellan resin blades.

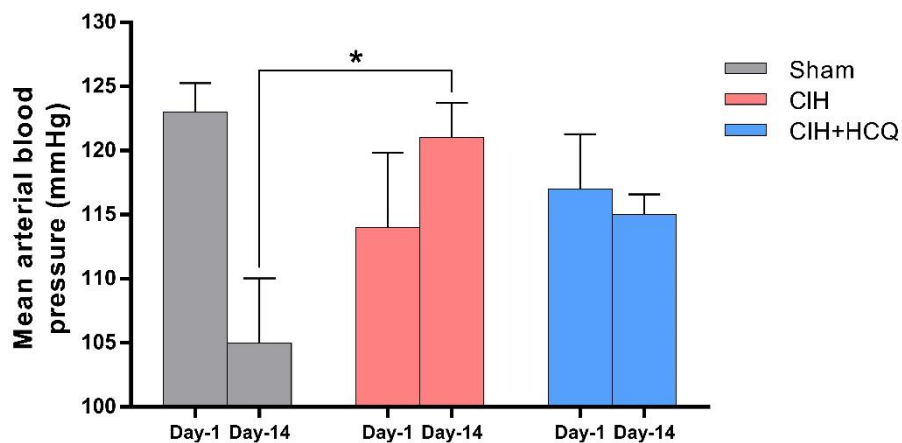
All sections were analyzed by blind evaluator for allocation groups with the Zeiss Axio Scope.A1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at 400x magnification, captured with Axiocam 105 color camera and digitized with Zeiss microscope software. Proteins were measured by the amount of positive labeling with the ImageJ<sup>41</sup> software calibrated in  $\mu\text{m}$ . For the aorta artery, 3 fields from each artery were evaluated from two sections, totaling 6 fields from each animal. For the renal artery, only one field of each animal was evaluated.

### **Statistical analysis**

Generalized Estimating Equations (GEE) with linear distribution and unstructured matrix was used to compare the groups in the pre and post protocol to MAP. GEE with gamma distribution and unstructured matrix was used to compare antibodies expression in the aorta artery in the groups. To compare the antibodies in renal artery in the groups it was used Kruskal-Wallis Test. The tests were performed using SPSS version 18.0 (Statistical Package for Social Science). The results are represented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and minimum, percentile 25, median, percentile 75, and maximum. The statistical significance level was set as  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Rats were randomly assigned to the Sham (n=6), CIH (n=6) and CIH+HCQ (n=5). Groups showed no difference in baseline MAP (day-1: Sham, 123±2 mm Hg; CIH, 114±6 mm Hg; CIH+HCQ, 117±4 mm Hg). In the between-groups analysis, MAP presented a significant increase in the CIH group in relation to Sham comparing the average results on day 14. The time×group interaction was significant (P<0.001) (Figure 1).



**Figure 1.** Plot of the changes between groups at Day-14 in mean arterial blood pressure (mean ± standard error of the mean). The within-participant and between-group significances were obtained by generalized estimating equations. Bonferroni's correction was applied for between-group comparisons. Results with a probability of alpha error<0.05 were considered significant. Sham (control; n=6), CIH (chronic intermittent hypoxia; n=6) and CIH+HCQ (chronic intermittent hypoxia plus use of hydroxychloroquine; n=5). \*P=0.01.

The aorta artery was properly excised, fixed and stained in 17 rats, Sham (n=6), CIH (n=6) and CIH+HCQ (n=5); renal artery in 14 rats, Sham (n=4), CIH (n=6) and CIH+HCQ (n=4). The coloration of the cross-sections of the aorta is shown in Figure 2. The means and

SEM of caldesmon expression from immunohistochemistry in the aorta artery were Sham= $4.16\pm 0.85$ , CIH= $5.91\pm 1.05$ , and CIH+HCQ= $3.68\pm 1.02$ . To calponin, the values were Sham= $30.19\pm 4.92$ , CIH= $20.11\pm 2.03$ , and CIH+HCQ= $42.12\pm 6.44$ . The results from GEE to protein expression are shown in Table 1. The CIH+HCQ group showed a significant increase in calponin expression measured in  $\mu\text{m}$  relative to the CIH group. The time $\times$ group interaction was significant for calponin. Figure 3 shows the differences between-groups on day 14 in the expression of caldesmon and calponin in the aorta.

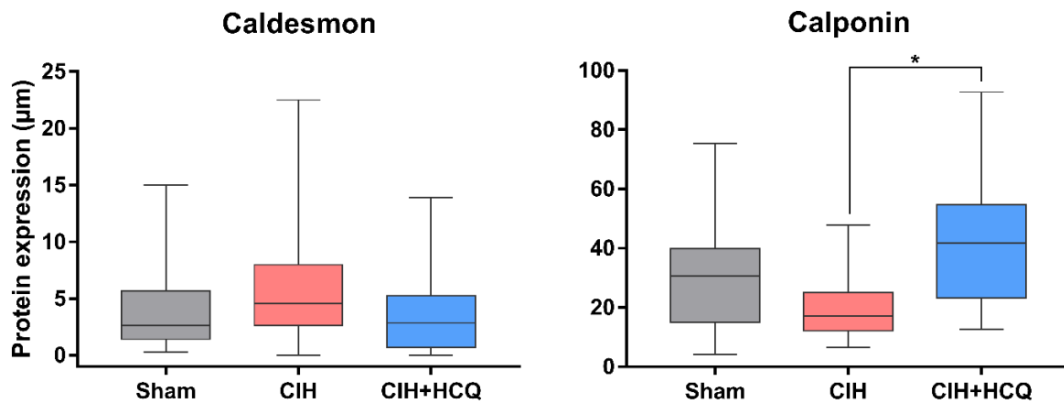


**Figure 2.** Aorta artery cross-sections staining. A, hematoxylin-eosin staining. B, caldesmon antibody. C, calponin antibody. The expression of caldesmon and calponin in the aorta artery can be seen in brown. Magnification of 10 x 40. Scale in  $\mu\text{m}$ .

**Table 1.** Pairwise group and time comparisons of estimated marginal means of caldesmon and calponin in the aorta artery based on the difference between-groups with Bonferroni's correction.

Antibody	(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	SEM	Bonferroni Significance	95%CI for Difference		P value for time×group interaction
						Lower	Upper	
Caldesmon	Sham	CIH	-1.76	1.35	.6	-4.99	1.48	.2
	Sham	CIH+HCQ	0.48	1.32	1.00	-2.69	3.65	
	CIH	CIH+HCQ	2.23	1.46	.4	-1.27	5.73	
Calponin	Sham	CIH	10.08	5.32	.2	-2.65	22.82	<.001
	Sham	CIH+HCQ	-11.93	8.10	.4	-31.32	7.47	
	CIH	CIH+HCQ	<b>-22.01</b>	6.75	<b>.003</b>	-38.18	-5.85	

Sham (control; n=6), CIH (chronic intermittent hypoxia; n=6) and CIH+HCQ (chronic intermittent hypoxia plus use of hydroxychloroquine; n=5). P values were obtained from generalized estimating equations with Bonferroni's correction for multiple comparisons. Results with a probability of alpha error<0.05 were considered significant and are shown in bold typeface.



**Figure 3.** Boxplot represents minimum, percentile 25, median, percentile 75, and maximum of the caldesmon and calponin expression in the aorta artery among the groups on the 14<sup>th</sup> day. The differences are significant for calponin only between CIH and CIH+HCQ groups. The within-participant and between-group significances were obtained by generalized estimating equations. Bonferroni's correction was applied for between-group comparisons. Results with a probability of alpha error<0.05 were considered significant. Sham (control; n=6), CIH (chronic intermittent hypoxia; n=5) and CIH+HCQ (chronic intermittent hypoxia plus use of hydroxychloroquine; n=5). \*P=0.003.

The means and SEM from protein expression in the renal artery were shown in Table 2. With Kruskal-Wallis statistical analysis, we did not find a significant difference between the groups to antibodies caldesmon (p=0.682) and calponin (p=0.159) in the renal artery.

**Table 2.** Immunohistochemical expression of caldesmon and calponin in the renal artery in the study groups.

<b>Groups (mean±SEM)</b>	<b>Caldesmon (µm)</b>	<b>Calponin (µm)</b>
Sham	9.07±4.39	26.90±10.44
CIH	14.20±5.00	30.59±3.76
CIH+HCQ	19.61±11.59	16.67±2.20

Sham (control; n=4), CIH (chronic intermittent hypoxia; n=6) and CIH+HCQ (chronic intermittent hypoxia plus use of hydroxychloroquine; n=4). Data are shown as mean ± standard error of the mean (SEM).

## DISCUSSION

The present results support the working hypothesis that HCQ prevents the increase in BP in animals exposed to 14 days of CIH. Increased calponin expression in the aorta wall suggests that HCQ may act directly on the smooth muscle. Our model of CIH is capable of increasing BP, supporting previous findings of the role of CIH in the pathogenesis of arterial hypertension. If the increase in MAP demonstrated in rats exposed to 14 days of CIH was mediated by inflammation, it is possible that HCQ prevented increases in BP by inhibiting inflammatory pathways, thus causing changes in calponin expression that would lead to increased BP. It is well-known that CIH simulating OSA leads to inflammation, vascular remodeling, endothelial dysfunction, and an increase in circulating inflammatory markers. Thus, CIH may be a potential contributor to OSA-related cardiovascular morbidity.

Our main hypothesis was based on a possible change in caldesmon expression. In our data, however, the caldesmon expression in the aorta was similar among the groups. If a significant increase in caldesmon expression in the CIH group was found, associated with the increase of BP in this group, the “latch state” of caldesmon would be an explanation as discussed below.

The increase in calponin expression could be reflective of the stabilization of BP in animals exposed to 14 days of CIH and treated with HCQ. One possible explanation is that HCQ prevented the increase in MAP by stimulating the expression of calponin in the arteriolar network. In our experiment, the calponin expression was seen indirectly in the aorta. Although the role of calponin in BP regulation is still controversial, some pieces of evidence suggest that it may act by causing vascular relaxation.

The mechanisms by which BP increases after a few days of CIH exposure are not clear. Periods of intermittent hypoxia over 7 h per day increase BP in mice from day 1.<sup>42</sup> This elevation in BP is sustained up to the end of the experiment, day 17. Additionally, CIH increases nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 3 (NFATc3) transcriptional activity in the aorta and mesenteric arteries. The NFATc3 isoform is specifically implicated in vascular development<sup>43</sup>, maintenance of a contractile phenotype<sup>44</sup>, and regulation of vascular smooth muscle cell contractility.<sup>45</sup> In Sprague-Dawley rats exposed to repetitive cycles of CIH or room air for 30 days, daily measurements of MAP using the telemetry system showed increases starting 5 days after CIH exposure, which lasted until the end of the 30-day observation period.<sup>46</sup>

Models of BP increase after CIH have been employed to test the effects of different medications.<sup>47</sup> Macitentan, an endothelin receptor antagonist used in the treatment of pulmonary arterial hypertension, prevented the increases in MAP caused by chronic kidney disease (CKD), two weeks of CIH and the combination of CKD+CIH, in Sprague-Dawley rats. After this period, macitentan reversed hypertension in all groups, even without improving renal



function.<sup>48</sup> Carvedilol, an unselective beta-blocker that exhibits intrinsic anti-  $\alpha$ 1-adrenergic and antioxidant activity, was used in a model of CIH-induced hypertension, promoting a significant reduction in HR but not in BP.<sup>49</sup> Ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, prevented hypertension in a model of CIH-induced by controlling overexpression in the cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  in the carotid body and by preventing the increase of c-fos-positive neurons in the nucleus tractus solitarii.<sup>50</sup> None of the studies cited above tested the anti-inflammatory drug hydroxychloroquine to treat CIH-induced high BP.

Supporting the hypothesis that sleep apnea is an inflammatory disease<sup>31</sup> that can increase the risk of CVD<sup>51</sup>, reports indicate that mice exposed to 8 weeks of CIH showed an increase of endothelial dysfunction, accompanied by an increase of systemic oxidative stress and inflammation as well as increased aortic expression of inflammatory cytokines.<sup>52</sup> In another protocol, mice exposed to 35 days of CIH showed an increase in vasopressive catecholamines and BP. Histologic alterations started on day 14, with decreased endothelial of platelet endothelial cell adhesion molecule expression in descending aorta and left heart.<sup>53</sup> In support of our findings, CIH also induces an increase in inflammatory markers.<sup>54</sup>

Evidence suggests an independent link between inflammation and hypertension that may explain our finding that HCQ prevented the increase in BP seen following CIH exposure. Experimental studies found inflammatory infiltration and immune dysfunction of renal interstitial, vascular adventitia and perivascular fat renal tissue in spontaneously hypertensive rats (SHR).<sup>55,56</sup> At first, it was thought to be a consequence of hypertension, not its cause.<sup>57</sup> Subsequent experimental studies, however, showed an improvement of hypertension after the reduction of renal interstitial inflammation by different methods such as antioxidant diet<sup>58</sup>, and Tongxinluo, an antioxidative from Chinese medicine<sup>59</sup>, mycophenolate mofetil<sup>60</sup> and interleukin-10.<sup>61</sup>

In patients with systemic lupus erythematosus (SLE), who were found to have greater

visit-to-visit variability in BP than control subjects, HCQ use reduced visit-to-visit variability in BP.<sup>62</sup> In mice, BP (measured by tail-cuff plethysmography) remained stable throughout 28 days of administration of HCQ (100 mg/kg) in the drinking water.<sup>35</sup> It has been shown that early treatment with HCQ prevents the development of endothelial dysfunction in a murine model of SLE.<sup>63</sup> In a female mouse model of SLE treated with HCQ 10mg/kg/day by gavage for 5 weeks, HCQ reduced hypertension, endothelial dysfunction, and organ damage.<sup>64</sup> In our study, we used telemetry to measure the variables, the most advanced method for monitoring physiological functions of laboratory animals.<sup>65</sup> This method does not produce stress on the animals, reducing confounds with the collected results.

Chloroquine (CQ), a drug with a similar composition to HCQ, has an anti-hypertensive effect in rats. Twenty-one days of treatment with CQ (40 mg/kg/day via intraperitoneal injection) prevented the development of high BP in adult (12 weeks old) SHR, but not in young (5 weeks) SHR. Innate immune system responses to damage-associated molecular patterns (DAMPs) are involved in hypertension. Circulating mitochondrial DNA is a DAMP that activates Toll-like receptor 9 and is elevated in SHR. The results indicate that CQ also has antihypertensive actions, possibly through the regulation of TLR 9 signaling, which may lower CVD risk in autoimmune patients with hypertension.<sup>66</sup>

CIH can induce the excessive proliferation of vascular smooth cells that may be related to the incidence or progression of several diseases.<sup>67</sup> In a cultured rat aortic smooth muscle cells, CIH induces the proliferation of the vascular smooth cells with the increases in epidermal growth factor family, a protein that stimulates cell growth and differentiation, and erbB2, a receptor that mediates intracellular signaling for several physiological effects including cell proliferation.<sup>68</sup> The arteriolar smooth muscle is the effector in the system that regulates the blood vessel lumen. Actin and myosin may be regulated at the thin filament level by caldesmon and calponin.<sup>69</sup> Caldesmon, one of the largest proteins in nature, can be seen as an energy saver

when causing direct inhibition of myosin ATPase activity.<sup>24</sup> A model of contraction has been proposed that in the sustained phase of a tonic contraction, tension can be maintained by the binding of myosin to F-actin through caldesmon. This contraction is characterized by high tension at low levels of myosin phosphorylation and energy consumption, and it is often referred to as the “latch state”.<sup>70</sup> The several possibilities of binding and diverse biochemical properties suggest caldesmon is a potent and versatile regulatory protein both in contractility and cell motility.<sup>30</sup>

Our finding of increased calponin expression in the group exposed to CIH+HCQ is plausible. Calponin 1, which was measured in the study, is specifically expressed in smooth muscle cells and plays a role in fine-tuning smooth muscle contractility.<sup>25</sup> Some studies reported that calponin directly regulates the vascular contractility<sup>71</sup>, but others have reported negative results.<sup>72</sup> The majority of the reports suggest that calponin 1 functions as an inhibitory regulator of smooth muscle contractility through inhibiting actomyosin interactions<sup>26,27,28</sup>, thus promoting vascular relaxation. The increase in calponin expression in our study might have had a fundamental role in preventing the increase in MAP, which could have been mediated by HCQ.

These results are preliminary and studies with a larger number of animals will still be needed to confirm them. Some differences may not have been significant due to the lack of statistical power, given the small number of animals. For the present hypothesis, it would be important to measure changes in the level of small vessels. Thus, the finding of increased calponin expression in the aorta in the CIH+HCQ group provides indirect evidence of the drug's action on BP. Since we did not assess inflammatory markers, we are not able to confirm this hypothesis. This was the first study to test the effect of HCQ on CIH-induced hypertension and vascular alterations.

## **CONCLUSION**

The model of CIH is capable of increasing BP, confirming previous findings of the role of CIH in the pathogenesis of arterial hypertension. Our data suggest that HCQ controlled the increase in BP in animals exposed to 14 days of CIH and increased the expression of calponin in the aorta artery. Finally, studies demonstrating microvascular changes in blood vessels are extremely difficult to perform but promise to yield important knowledge about cellular mechanisms and results of long-term treatment of OSA on CVD.

## **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## REFERENCES

---

<sup>1</sup> Senaratna CV, Perret JL, Lodge CJ, Lowe AJ, Campbell BE, Matheson MC, Hamilton GS, Dharmage SC. Prevalence of obstructive sleep apnea in the general population: A systematic review. *Sleep Med Rev.* 2017;34:70-81.

<sup>2</sup> Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, Heinzer R, Ip MSM, Morrell MJ, Nunez CM, Patel SR, Penzel T, Pépin JL, Peppard PE, Sinha S, Tufik S, Valentine K, Malhotra A. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir Med.* 2019;7:687-698.

<sup>3</sup> Badran M, Ayas N, Laher I. Insights into obstructive sleep apnea research. *Sleep Med.* 2014;15:485-95.

<sup>4</sup> Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, D'Agostino RB, Newman AB, Lebowitz MD, Pickering TG. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. *Sleep Heart Health Study. JAMA.* 2000;283:1829-36. Erratum in: *JAMA* 2002;288:1985.

<sup>5</sup> Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med.* 2000;342:1378-84.

<sup>6</sup> do Carmo JM, da Silva AA, Moak SP, da Silva FS, Spradley FT, Hall JE. Role of melanocortin 4 receptor in hypertension induced by chronic intermittent hypoxia. *Acta Physiol (Oxf).* 2019;225:e13222.

<sup>7</sup> Ganesh BP, Nelson JW, Eskew JR, Ganesan A, Ajami NJ, Petrosino JF, Bryan RM Jr, Durgan DJ. Prebiotics, Probiotics, and Acetate Supplementation Prevent Hypertension in a Model of Obstructive Sleep Apnea. *Hypertension.* 2018;72:1141-50.

<sup>8</sup> Perim RR, Bonagamba LG, Machado BH. Cardiovascular and respiratory outcome of preconditioned rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol.* 2015;100:1008-17.

- 
- <sup>9</sup> Prabhakar NR, Peng YJ, Jacono FJ, Kumar GK, Dick TE. Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32:447-9.
- <sup>10</sup> Zoccal DB, Bonagamba LG, Antunes-Rodrigues J, Machado BH. Plasma corticosterone levels is elevated in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Auton Neurosci.* 2007;134:115-7.
- <sup>11</sup> Iturriaga R, Moya EA, Del Rio R. Carotid body potentiation induced by intermittent hypoxia: implications for cardiorespiratory changes induced by sleep apnoea. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36:1197-204.
- <sup>12</sup> Nanduri J, Makarenko V, Reddy VD, Yuan G, Pawar A, Wang N, Khan SA, Zhang X, Kinsman B, Peng YJ, Kumar GK, Fox AP, Godley LA, Semenza GL, Prabhakar NR. Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:2515-20.
- <sup>13</sup> Kanagy NL, Walker BR, Nelin LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension.* 2001;37:511-5.
- <sup>14</sup> Allahdadi KJ, Cherng TW, Pai H, Silva AQ, Walker BR, Nelin LD, Kanagy NL. Endothelin type A receptor antagonist normalizes BP in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H434-40.
- <sup>15</sup> Shamsuzzaman AS, Gersh BJ, Somers VK. Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease. *JAMA.* 2003;290:1906-14.
- <sup>16</sup> Golbidi S, Badran M, Ayas N, Laher I. Cardiovascular consequences of sleep apnea. *Lung.* 2012;190:113-32.
- <sup>17</sup> Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res.* 2011;34:665-73.

- 
- <sup>18</sup> Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, Pepin JL, Guillermet C, Pelli G, Burger F, Buatois V, Ribuot C, Baguet JP, Mach F, Levy P, Dematteis M. The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:724-31.
- <sup>19</sup> Poulain L, Richard V, Lévy P, Dematteis M, Arnaud C. Toll-like receptor-4 mediated inflammation is involved in the cardiometabolic alterations induced by intermittent hypoxia. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:620258.
- <sup>20</sup> Gras E, Belaidi E, Briançon-Marjollet A, Pépin JL, Arnaud C, Godin-Ribuot D. Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *J Appl Physiol (1985).* 2016;120:437-43.
- <sup>21</sup> Troncoso Brindeiro CM, da Silva AQ, Allahdadi KJ, Youngblood V, Kanagy NL. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H2971-6.
- <sup>22</sup> Friedman JK, Nitta CH, Henderson KM, Codianni SJ, Sanchez L, Ramiro-Diaz JM, Howard TA, Giermakowska W, Kanagy NL, Gonzalez Bosc LV. Intermittent hypoxia-induced increases in reactive oxygen species activate NFATc3 increasing endothelin-1 vasoconstrictor reactivity. *Vascul Pharmacol.* 2014;60:17-24.
- <sup>23</sup> Shirinsky VP, Biryukov KG, Hettasch JM, Sellers JR. Inhibition of the relative movement of actin and myosin by caldesmon and calponin. *J Biol Chem.* 1992;267:15886-92.
- <sup>24</sup> Brozovich FV, Nicholson CJ, Degen CV, Gao YZ, Aggarwal M, Morgan KG. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacol Rev.* 2016;68:476-532.
- <sup>25</sup> Liu R, Jin JP. Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: Regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. *Gene.* 2016;585:143-53.

- 
- <sup>26</sup> Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Isolation and characterization of a 34,000-dalton calmodulin- and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;141:20-6.
- <sup>27</sup> Allen BG, Walsh MP. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *Trends Biochem Sci.* 1994;19:362-8.
- <sup>28</sup> Takahashi K, Abe M, Hiwada K, Kokubu T. A novel troponin T-like protein (calponin) in vascular smooth muscle: interaction with tropomyosin paracrystals. *J Hypertens Suppl.* 1988;6:S40-3.
- <sup>29</sup> Hai CM, Gu Z. Hai CM, Gu Z. Caldesmon phosphorylation in actin cytoskeletal remodeling. *Eur J Cell Biol.* 2006;85:305-9.
- <sup>30</sup> Wang CL. Caldesmon and the regulation of cytoskeletal functions. *Adv Exp Med Biol.* 2008;644:250-72.
- <sup>31</sup> Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Obstructive Sleep Apnea and Inflammation: Proof of Concept Based on Two Illustrative Cytokines. *Int J Mol Sci.* 2019;20.
- <sup>32</sup> Jang CH, Choi JH, Byun MS, Jue DM. Chloroquine inhibits production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:703-10.
- <sup>33</sup> Weber SM, Levitz SM. Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomotropic mechanism. *J Immunol.* 2000;165:1534-40.
- <sup>34</sup> Liu L, Ren J, He Z, Men K, Mao Y, Ye T, Chen H, Li L, Xu B, Wei Y, Wei X. Cholesterol-modified Hydroxychloroquine-loaded Nanocarriers in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. *Sci Rep.* 2017;7:10737.
- <sup>35</sup> Capel RA, Herring N, Kalla M, Yavari A, Mirams GR, Douglas G, Bub G, Channon K, Paterson DJ, Terrar DA, Burton RA. Hydroxychloroquine reduces heart rate by modulating the



---

hyperpolarization-activated current If: Novel electrophysiological insights and therapeutic potential. *Heart Rhythm*. 2015;12:2186-94.

<sup>36</sup> Sharma TS, Wasko MC, Tang X, Vedamurthy D, Yan X, Cote J, Bili A. Hydroxychloroquine Use Is Associated With Decreased Incident Cardiovascular Events in Rheumatoid Arthritis Patients. *J Am Heart Assoc*. 2016;5.

<sup>37</sup> Tahawi Z, Orolinova N, Joshua IG, Bader M, Fletcher EC. Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats. *J Appl Physiol*. 2001;90:2007-13.

<sup>38</sup> Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39:175-91.

<sup>39</sup> Del Rio R, Andrade DC, Lucero C, Arias P, Iturriaga R. Carotid Body Ablation Abrogates Hypertension and Autonomic Alterations Induced by Intermittent Hypoxia in Rats. *Hypertension*. 2016;68:436-45.

<sup>40</sup> Long L, Yang X, Southwood M, Lu J, Marciniak SJ, Dunmore BJ, Morrell NW. Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation. *Circ Res*. 2013;112:1159-70.

<sup>41</sup> Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:671-5.

<sup>42</sup> de Frutos S, Duling L, Alò D, Berry T, Jackson-Weaver O, Walker M, Kanagy N, González Bosc L. NFATc3 is required for intermittent hypoxia-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H2382-90.

<sup>43</sup> Graef IA, Chen F, Crabtree GR. NFAT signaling in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11:505-12.

- 
- <sup>44</sup> Gonzalez Bosc LV, Layne JJ, Nelson MT, Hill-Eubanks DC. Nuclear factor of activated T cells and serum response factor cooperatively regulate the activity of an alpha-actin intronic enhancer. *J Biol Chem*. 2005;280:26113-20.
- <sup>45</sup> Amberg GC, Rossow CF, Navedo MF, Santana LF. NFATc3 regulates Kv2.1 expression in arterial smooth muscle. *J Biol Chem*. 2004;279:47326-34.
- <sup>46</sup> Lai CJ, Yang CC, Hsu YY, Lin YN, Kuo TB. Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats. *J Appl Physiol (1985)*. 2006;100:1974-82.
- <sup>47</sup> Diogo LN, Monteiro EC. The efficacy of antihypertensive drugs in chronic intermittent hypoxia conditions. *Front Physiol*. 2014;5:361.
- <sup>48</sup> Morales-Loredo H, Jones D, Barrera A, Mendiola PJ, Garcia J, Pace C, Murphy M, Kanagy NL, Gonzalez Bosc LV. A dual blocker of endothelin A/B receptors mitigates hypertension but not renal dysfunction in a rat model of chronic kidney disease and sleep apnea. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019;316:F1041-52.
- <sup>49</sup> Diogo LN, Pereira SA, Nunes AR, Afonso RA, Santos AI, Monteiro EC. Efficacy of carvedilol in reversing hypertension induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *Eur J Pharmacol*. 2015;765:58-67.
- <sup>50</sup> Del Rio R, Moya EA, Parga MJ, Madrid C, Iturriaga R. Carotid body inflammation and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia. *Eur Respir J*. 2012;39:1492-500.
- <sup>51</sup> Kanagy NL. Vascular effects of intermittent hypoxia. *ILAR J*. 2009;50:282-8.
- <sup>52</sup> Badran M, Abuyassin B, Golbidi S, Ayas N, Laher I. Alpha Lipoic Acid Improves Endothelial Function and Oxidative Stress in Mice Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:4093018.

- 
- <sup>53</sup> Dematteis M, Julien C, Guillermet C, Sturm N, Lantuejoul S, Mallaret M, Lévy P, Gozal E. Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:227-35.
- <sup>54</sup> Aziz F, Chaudhary K. The Triad of Sleep Apnea, Hypertension, and Chronic Kidney Disease: A Spectrum of Common Pathology. *Cardiorenal Med.* 2016;7:74-82.
- <sup>55</sup> Rodríguez-Iturbe B, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286:F606-16.
- <sup>56</sup> Heijnen BF, Van Essen H, Schalkwijk CG, Janssen BJ, Struijker-Boudier HA. Renal inflammatory markers during the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2014;37:100-9.
- <sup>57</sup> Bendich A, Belisle EH, Strausser HR. Immune system modulation and its effect on the BP of the spontaneously hypertensive male and female rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;99:600-7.
- <sup>58</sup> Rodriguez-Iturbe B, Zhan CD, Quiroz Y, Sindhu RK, Vaziri ND. Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2003;41:341-6.
- <sup>59</sup> Luo WM, Kong J, Gong Y, Liu XQ, Yang RX, Zhao YX. Tongxinluo Protects against Hypertensive Kidney Injury in Spontaneously-Hypertensive Rats by Inhibiting Oxidative Stress and Activating Forkhead Box O1 Signaling. *PLoS One.* 2015;10:e0145130.
- <sup>60</sup> Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, Rincon J, Chavez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gómez-Garre D, Largo R, Egido J, Johnson RJ, Rodríguez-Iturbe B. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;281:F38-47.
- <sup>61</sup> Tinsley JH, South S, Chiasson VL, Mitchell BM. Interleukin-10 reduces inflammation,

---

endothelial dysfunction, and BP in hypertensive pregnant rats. *Am J Physiol Regulat Integr Compar Physiol.* 2010;298:R713-9.

<sup>62</sup> Reese T, Dickson AL, Shuey MM, Gandelman JS, Barnado A, Barker KA, Neal JE, Khan OA, Dupont WD, Stein CM, Chung CP. Increased BP visit-to-visit variability in patients with systemic lupus erythematosus: association with inflammation and comorbidity burden. *Lupus.* 2019;28:954-60.

<sup>63</sup> Viridis A, Tani C, Duranti E, Vagnani S, Carli L, Kühl AA, Solini A, Baldini C, Talarico R, Bombardieri S, Taddei S, Mosca M. Early treatment with hydroxychloroquine prevents the development of endothelial dysfunction in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:277.

<sup>64</sup> Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Romero M, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Gómez-Morales M, O'Valle F, López-Farré AJ, Algieri F, Gálvez J, Pérez-Vizcaino F, Sabio JM, Duarte J. Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension.* 2014;64:330-7.

<sup>65</sup> Braga VA, Prabhakar NR. Refinement of telemetry for measuring BP in conscious rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2009;48:268-71.

<sup>66</sup> McCarthy CG, Wenceslau CF, Goulopoulou S, Baban B, Matsumoto T, Webb RC. Chloroquine Suppresses the Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens.* 2017;30:173-81.

<sup>67</sup> Kyotani Y, Takasawa S, Yoshizumi M. Proliferative Pathways of Vascular Smooth Muscle Cells in Response to Intermittent Hypoxia. *Int J Mol Sci.* 2019;20:2706.

<sup>68</sup> Kyotani Y, Ota H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Zhao J, Ozawa K, Nagayama K, Ito S, Takasawa S, Kimura H, Uno M, Yoshizumi M. Intermittent hypoxia induces the proliferation of rat vascular smooth muscle cell with the increases in epidermal growth factor family and erbB2 receptor. *Exp Cell Res.* 2013;319:3042-50.

---

<sup>69</sup> Liu Z, Khalil RA. Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2018;153:91-122.

<sup>70</sup> Sobieszek A, Sarg B, Lindner H, Seow CY. Phosphorylation of caldesmon by myosin light chain kinase increases its binding affinity for phosphorylated myosin filaments. *Biol Chem.* 2010;391:1091-104.

<sup>71</sup> Je HD, Gangopadhyay SS, Ashworth TD, Morgan KG. Calponin is required for agonist-induced signal transduction--evidence from an antisense approach in ferret smooth muscle. *J Physiol.* 2001;537:567-77.

<sup>72</sup> Matthew JD, Khromov AS, McDuffie MJ, Somlyo AV, Somlyo AP, Taniguchi S, Takahashi K. Contractile properties and proteins of smooth muscles of a calponin knockout mouse. *J Physiol.* 2000;529:811-24.

## **9. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

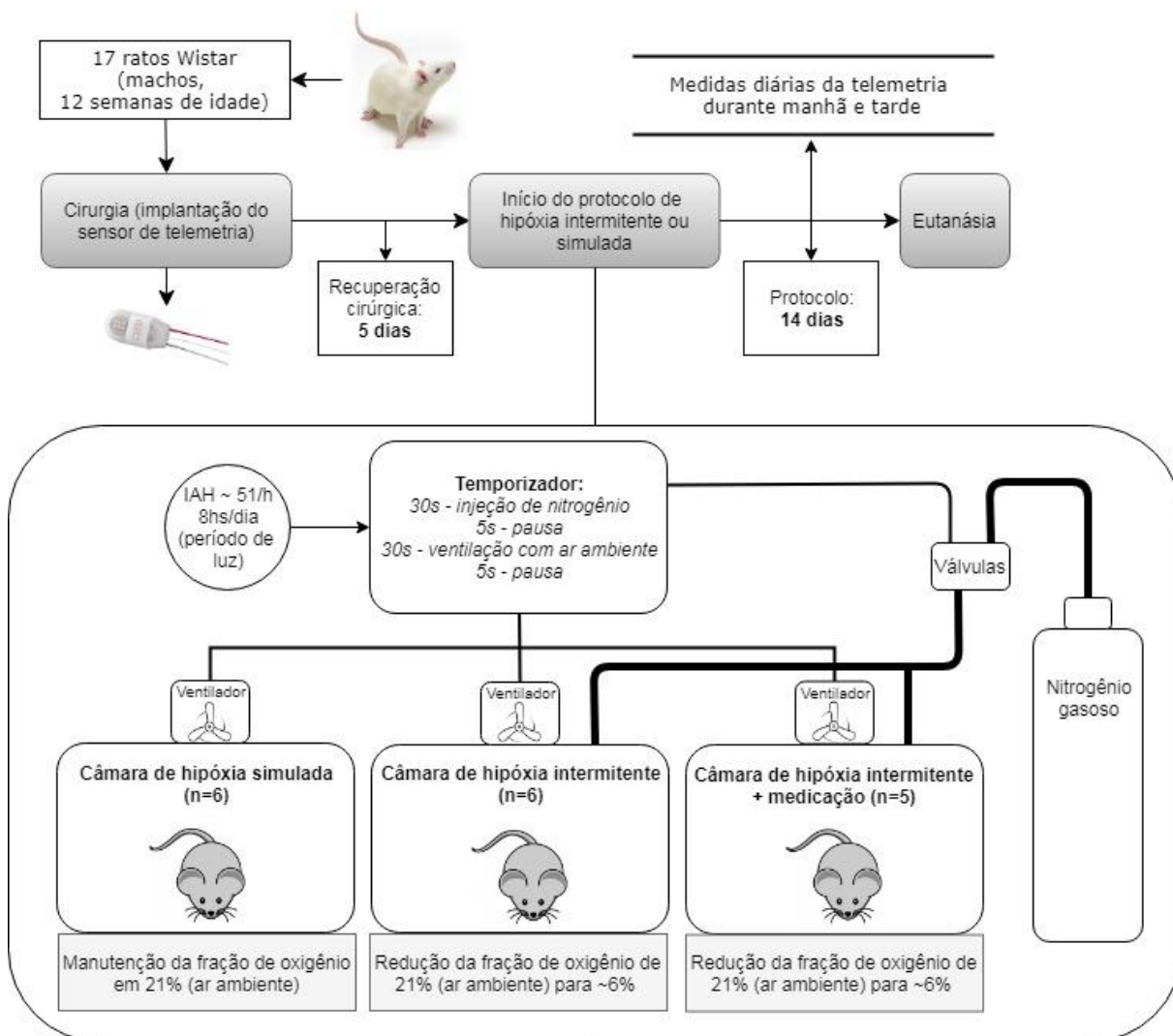
O modelo de HIC é capaz de aumentar a PA, confirmando achados prévios do papel da HIC na patogênese da HAS. Nossos dados sugerem que a HCQ controlou o aumento da PA de animais submetidos a 14 dias de HIC e aumentou a expressão de calponina na artéria aorta. Esse é o primeiro estudo realizado para verificar os efeitos da HCQ no controle da PA em modelo de AOS.

## **10. APOIO FINANCEIRO**

O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

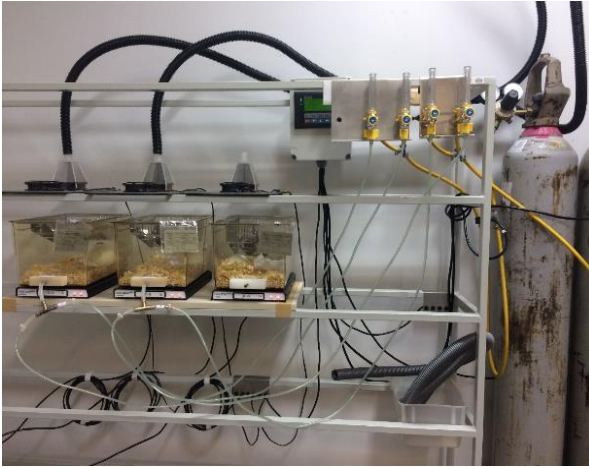
Chaiane Facco Piccin recebeu bolsa de doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **APÊNDICES**



**Apêndice 1.** Fluxograma de procedimentos. Dezesete ratos Wistar machos, com 12 semanas de idade, foram submetidos à cirurgia de implante do sensor de telemetria (*DSI*<sup>®</sup>, *USA*) para verificação contínua da pressão arterial e frequência cardíaca. Após 5 dias de recuperação cirúrgica, foram randomizados e submetidos ao protocolo de hipóxia intermitente crônica (HIC) ou hipóxia intermitente simulada (grupo Sham). O protocolo de hipóxia foi realizado diariamente durante 8 horas durante 14 dias, através da injeção de nitrogênio gasoso nas gaiolas, reduzindo a fração de oxigênio de 21% para ~6%. O índice de apneia/hipopneia simulado foi de ~50/h. No grupo Sham, nenhuma mistura gasosa foi injetada nas gaiolas a fim de controlar o efeito do estresse produzido pelo sistema de hipóxia. Os animais foram submetidos a HIC e receberam injeção intraperitoneal de 35mg/kg/dia de HCQ (*Sigma-Aldrich, USA*) diluído em solução salina (grupo HIC+HCQ, n=5) ou submetidos a HIC com injeção de veículo salino (grupo CIH, n=6) ou submetidos à hipóxia simulada com injeção de veículo salino (Sham, n=6), constituindo os três grupos do estudo.





**Apêndice 2.** Imagens do sistema de hipóxia intermitente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa juntamente com o sistema de telemetria.