

**ELIZABETH BARBOSA DE OLIVEIRA SALES**

**MECANISMOS GERADORES DA ATIVIDADE  
VASOMOTORA SIMPÁTICA NA HIPERTENSÃO  
ARTERIAL RENOVASCULAR EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências.

**SÃO PAULO**

**2009**

**ELIZABETH BARBOSA DE OLIVEIRA SALES**

**MECANISMOS GERADORES DA ATIVIDADE  
VASOMOTORA SIMPÁTICA NA HIPERTENSÃO  
ARTERIAL RENOVASCULAR EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Doutor em Ciências pelo programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Área de Concentração Fisiofarmacologia – Departamento de Fisiologia, Disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória.

**Orientador**

Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Júnior

Disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória da Universidade Federal de São Paulo

**Co-orientadora**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cássia M. Toledo Bergamaschi

Disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória da Universidade Federal de São Paulo

**Supervisor do Estágio no Exterior (PDEE)**

Prof. Dr. Julian F.R. Paton

Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade de Bristol - Reino Unido

**SÃO PAULO**

**2009**

**OLIVEIRA-SALES, ELIZABETH BARBOSA DE**  
**MECANISMOS GERADORES DA ATIVIDADE VASOMOTORA**  
**SIMPÁTICA NA HIPERTENSÃO ARTERIAL RENOVASCULAR EM RATOS**  
**WISTAR./Elizabeth Barbosa de Oliveira Sales --São Paulo, 2009**  
**xxv, 219f**

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

Título em inglês: Mechanisms of vasomotor sympathetic activity generation in the renovascular hypertension in Wistar rats.

1. Estresse oxidativo; 2. Região Rostroventrolateral do Bulbo; 3. Núcleo Paraventricular do hipotálamo; 4. Hipertensão renovascular; 5. Antioxidante.

**ELIZABETH BARBOSA DE OLIVEIRA SALES**

**MECANISMOS GERADORES DA ATIVIDADE  
VASOMOTORA SIMPÁTICA NA HIPERTENSÃO  
ARTERIAL RENOVASCULAR EM RATOS WISTAR**

**PRESIDENTE DA BANCA**

**Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Júnior**

Professor Associado do Depto. de Fisiologia na disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória da Universidade Federal de São Paulo.

**BANCA EXAMINADORA**

**Titulares**

**Prof. Dr. Benedito Honório Machado**

Prof. Titular do Depto. de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

**Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes**

Prof. Associado do Depto. de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lisete Compagno Michelini**

Prof<sup>a</sup>. Titular do Depto. de Fisiologia e Biofísica da Universidade de São Paulo

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miriam Aparecida Boim**

Prof<sup>a</sup>. Associada do Departamento de Medicina, Disciplina de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo.

**Suplentes**

**Prof. Dr. Eduardo Colombari**

Professor Adjunto do Departamento de Fisiologia, Disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória da Universidade Federal de São Paulo.

**Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes**

Prof<sup>a</sup>. Titular do Depto. de Fisiologia e Biofísica da Universidade de São Paulo

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/ Processo: 05/60151-6) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/BEX 3496/07-4).

**Aos Meus Pais,**

**Laurita Libardi de Oliveira**

**Irineo Barbosa de Oliveira**

*Responsáveis por me trazer à vida.*

*Responsáveis por minha manutenção.*

*Responsáveis por me ensinar a andar, e se cair, levantar e seguir.*

*Responsáveis por me mostrar que existe um Deus, em quem posso confiar.*

*Responsáveis por me educar em princípios cristãos, morais e éticos.*

*Responsáveis legais por meus atos durante 18 anos.*

*Responsáveis mais legais ainda, e durante toda a vida pelo ser humano que  
formaram.*

*Responsáveis por me mostrar diversos caminhos, e deixar que eu escolhesse qual  
seguir.*

*Responsáveis ainda, pela idéia confortante, de que aonde quer que eu fosse,  
estariam sempre ao meu lado.*

*E se por qualquer motivo eu me perdesse em meio a tantas encruzilhadas, saberia  
que o caminho de volta era um só.*

*Responsáveis por me fazer entender, que se um dia é da caça, o outro será do  
caçador. Que tudo é aprendizado na matéria de vencer.*

*Responsáveis por mostrar que não existem barreiras intransponíveis e  
principalmente, que não há vitória sem luta!*

*À vocês dedico mais esta etapa da minha vida!*

*Amo vocês!*

***Em especial,***

***Ao meu marido Fábio Raphael Sobiecki de Sales***

*“Por ter sido meu parceiro, incentivador, paciente e conselheiro durante mais esta etapa da minha vida. Tenho certeza que você foi fundamental para que ela fosse alcançada. Muito obrigada pelo seu apoio!*

*Te amo!”*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Júnior pela disponibilidade, paciência, dedicação e competência na orientação desta Tese. Obrigada por ter sido um grande exemplo de pesquisador e pelos conceitos de ética transmitidos nestes seis anos de convivência. Muito obrigada.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cássia M. T. Bergamaschi pela colaboração, motivação e incentivo para execução deste trabalho, e principalmente pela amizade, confiança e carinho a mim dedicado.

Ao Prof. Dr. Julian F. R. Paton pela atenção dedicada e os ensinamentos transmitidos durante meu estágio de doutoramento sanduíche. Obrigada por esta experiência única e inesquecível.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian S. Dolnikoff pelo apoio direto e indireto e por poder absorver um pouco da sua experiência e conhecimento. Além de poder compartilhar de sua amizade e de seus conselhos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Colombari e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora S. A. Colombari pela amizade, disposição e colaboração fundamentais no desenvolvimento deste trabalho durante meu estágio de doutoramento sanduíche. Além de terem tornado o clima britânico mais agradável quando se tem amigos!



A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Boim por disponibilizar seu laboratório para realizarmos os experimentos de Biologia Molecular desta Tese.

Aos professores e funcionários da disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória (Centro de Pesquisas Prof. Pedro G. Guertzenstein) da Universidade Federal de São Paulo, pela valiosa contribuição no dia a dia.

A todos meus amigos do laboratório, Adriana, Bruno, Erika, Thais, Adilson, Fofi's, Ana Paula, Nayda, Neuli, Juliana Perry, Núbia, Gisele, Ju, Glaucia, Héder, que me viram rir e chorar e aqueles que com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho e participaram comigo me fazendo crescer e amadurecer não só como pesquisadora, mas como pessoa.

A toda minha família, meus irmãos, Vitório e Rui, minhas cunhadas, Sandra e Cleide, meus sobrinhos, Guilherme, Vitório, Lucas, Ana Carolina, Maria Fernanda e Giovana, minha avó Ana (*in memoriam*), meus tios, em especial Tia Marta e Tio Toninho, minha sogra, D. Nair e Tia Célia que mesmo distantes sempre me apoiaram e incentivaram.

A instituição de fomento FAPESP e CAPES.

E a Deus por ter me dado os dons necessários para realização de mais uma etapa de minha vida.

*“O experimento nunca falha, apenas nossas opiniões falham,  
ao esperar do experimento aquilo que ele não é capaz de oferecer.”*

(Leonardo da Vinci)

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	xiv
LISTA DE TABELAS .....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xix
RESUMO .....	xxii
ABSTRACT .....	xxiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	23
2.1. Objetivo geral .....	23
2.2. Objetivos específicos .....	23
3. METODOLOGIA.....	25
3.1. Animais .....	25
3.2. Indução de Hipertensão arterial .....	26
3.3. <b>1ª SÉRIE DE EXPERIMENTOS: Estudo das variações cardiovasculares e autonômicas no modelo 2R-1C</b> .....	26
3.3.1. <i>Implante dos radiotransmissores de telemetria</i> .....	27
3.3.2. <i>Análise espectral da pressão arterial</i> .....	28
3.3.3. <i>Análise estatística</i> .....	30
3.4. <b>2ª SÉRIE DE EXPERIMENTOS: Avaliação molecular e funcional de receptores AT-1 e de iNOS na região RVL em animais 2R-1C e sham</b> .....	30
3.4.1. <i>Extração de RNA (Punches)</i> .....	33
3.4.2. <i>Comprovação histológica da região RVL após a retirada do punches</i> .....	34
3.4.3. <i>RT – PCR</i> .....	34
3.4.4. <i>Obtenção dos Primers</i> .....	35
3.4.5. <i>RT- PCR em Tempo Real</i> .....	37
3.4.6. <i>Avaliação da expressão protéica por Western Blotting</i> .....	38
3.4.7. <i>Instrumentação cirúrgica para aquisição dos parâmetros cardiovasculares</i> .....	38
3.4.8. <i>Registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC)</i> .....	39
3.4.9. <i>Nanoinjeções na região RVL</i> .....	39
3.4.10. <i>Aquisição e análise da atividade nervosa simpática renal (ANSR)</i> .....	41
3.4.11. <i>Análise histológica da região RVL</i> .....	43
3.4.12. <i>Análise de resultados</i> .....	44
3.5. <b>3ª SÉRIE DE EXPERIMENTOS: Estudo do estresse oxidativo na região RVL e PVN em ratos 2R-1C e sham</b> .....	44
3.5.1. <i>Extração de RNA (Punches)</i> .....	48

3.5.2. Obtenção dos Primers.....	49
3.5.3. Nanoinjeções no PVN .....	50
3.5.4. Determinação Bioquímica do TBARS .....	50
3.5.5. Administração endovenosa de Tempol .....	51
3.5.6. Análise de resultados .....	51
<b>3.6. 4ª SÉRIE DE EXPERIMENTOS: Estudo do estresse oxidativo na região RVL na terceira semana após a cirurgia de indução da hipertensão 2R-1C .....</b>	<b>51</b>
3.6.1. Implante dos radiotransmissores de telemetria e cálculo da análise espectral..	53
3.6.2. Transfecção viral In Vivo na região RVL .....	53
3.6.3. Validação da Expressão Gênica In Vivo .....	54
3.6.4. Medida dos níveis de superóxidos na região RVL .....	56
3.6.5. Análise estatística.....	57
<b>3.7. 5ª SÉRIE DE EXPERIMENTOS: Estudo da expressão gênica relacionada ao estresse oxidativo na região RVL e das respostas cardiovasculares após o tratamento crônico com Vit C em animais 2R-1C.....</b>	<b>57</b>
3.7.1. Tratamento crônico com Vit C .....	59
3.7.2. Extração de RNA (Punches) .....	60
3.7.3. Obtenção dos Primers.....	60
3.7.4. Análise de resultados .....	61
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1. Resultados da 1ª Série de Experimentos .....</b>	<b>62</b>
4.1.1. Geração da hipertensão no modelo 2R-1C.....	62
4.1.2. Análise espectral do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica em ratos 2R-1C e sham .....	65
4.1.3. Mudanças na frequência cardíaca e no ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco nos animais 2R-1C e sham.....	70
<b>4.2. Resultados da 2ª Série de Experimentos .....</b>	<b>73</b>
4.2.1. Expressão gênica e protéica do receptor AT-1 e de iNOS na região RVL de ratos 2R-1C e sham .....	73
4.2.2. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Losartan na região RVL nos animais 2R-1C e sham .....	75
4.2.3. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina na região RVL nos animais 2R-1C e sham .....	80
4.2.4. Comprovação histológica da nanoinjeção de Azul de Evans e dos punches realizados na região RVL .....	84
<b>4.3. Resultados da 3ª Série de Experimentos .....</b>	<b>85</b>
4.3.1. Análise da expressão gênica das subunidades da NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD e receptor AT-1 nas regiões RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e sham.....	85
4.3.2. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Tempol na RVL nos animais 2R-1C e sham .....	88

4.3.3. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção unilateral de Tempol na PVN em animais 2R-1C e sham .....	91
4.3.4. Comprovação histológica dos sítios de injeção e do punche bilateral realizados nas regiões RVL e PVN.....	93
4.3.5. Resultados da avaliação de TBARS plasmático – indicativo indireto do estresse oxidativo .....	95
4.3.6. Respostas cardiovasculares à administração endovenosa de Tempol nos animais 2R-1C e sham .....	96
<b>4.4. Resultados da 4ª Série de Experimentos: .....</b>	<b>100</b>
4.4.1. Efeitos da super expressão de Ad-CMV-CuZnSOD e de Ad-CMV-eGFP na região RVL na pressão arterial nos animais 2R-1C e sham .....	100
4.4.2. Efeitos da super expressão de Ad-CMV-CuZnSOD e de Ad-CMV- eGFP na região RVL na variabilidade da pressão arterial sistólica nos animais 2R-1C e sham .....	104
4.4.3. Efeitos da super expressão de Ad-CMV-CuZnSOD e de Ad-CMV-eGFP na região RVL na frequência cardíaca e no ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco nos animais 2R-1C e sham .....	108
4.4.4. Confirmação da transfecção do vírus Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL nos animais 2R-1C e sham .....	112
4.4.5. Níveis de superóxidos na região RVL dos animais 2R-1C transfectados com o vírus Ad-CMV-CuZnSOD e Ad-CMV-eGFP .....	114
<b>4.5. Resultados da 5ª Série de Experimentos: .....</b>	<b>115</b>
4.5.1. Respostas cardiovasculares ao tratamento crônico com Vit C nos animais 2R-1C e sham .....	115
4.5.2. Análise da expressão gênica das subunidades de NAD(P)H oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD e receptor AT-1 nas regiões RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e sham tratados com Vit C .....	117
4.5.3. Análise da expressão gênica de nNO, iNOS, IL-1 $\beta$ e Glut-1 nas regiões RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e sham tratados com Vit C .....	120
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>123</b>
5.1. Estudo das variações cardiovasculares autonômicas na evolução da hipertensão 2R-1C em ratos acordados .....	125
5.2. Participação angiotensinérgica e do NO na região RVL nos animais com hipertensão 2R-1C já estabelecida (após 6 semanas) .....	132
5.3. Participação do estresse oxidativo nas regiões RVL e PVN nos animais com hipertensão 2R-1C já estabelecida (após 6 semanas) .....	137
5.4. Participação do estresse oxidativo na região RVL durante a evolução da hipertensão 2R-1C (após 3 semanas).....	145
5.5. Participação do estresse oxidativo sistêmico nos mecanismos centrais nos animais com hipertensão 2R-1C já estabelecida (após 6 semanas).....	148
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>156</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>158</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>193</b>

<b>1. Artigos publicados .....</b>	<b>193</b>
1.1. Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, Abreu NP, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR (2008). Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. <i>Am J Hypertens</i> 21(1), 98-104.....	193
1.2. Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Carillo BA, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR (2009). Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. <i>Am J Hypertens</i> . 22(5), 484-92. ....	193
1.3. Campos RR, Carillo BA, Oliveira-Sales EB, Silva AM, Silva NF, Bergamaschi CT (2008). Brainstem mechanisms regulating the sympathetic vasomotor tone. <i>Braz J Med Biol Res</i> . 41(7), 557-62.....	193
<b>2. Artigos submetidos para publicação.....</b>	<b>193</b>
2.1. Oliveira-Sales EB, Colombari DSA, Davisson RL, Kasparov S, Campos RR, Paton JFR (2009). Chronic superoxide signaling in the rostral ventrolateral medulla is essential for Goldblatt hypertension. <i>Circulation Research</i> .....	193
2.2. Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR (2009). Over expression of AT-1 receptor and iNOS in the RVLM is essential to sympathetic hyperactivity and hypertension in the 2K-1C Wistar rats model. <i>Hypertension</i> .....	194
<b>3. Artigos sendo preparados para publicação.....</b>	<b>194</b>
3.1. Oliveira-Sales EB, Toward MT, Campos RR, Paton JFR (2009). Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in conscious rats. <i>Neurosci Methods</i> . ....	194
3.2. Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR (2009). Effects of vitamin C chronic treatment on blood pressure, sympathetic activity and gene expression into RVLM and PVN in renovascular hypertension. <i>Autonomic neuroscience</i> .....	194
<b>4. Capítulo de livro publicado.....</b>	<b>194</b>
4.1. Campos RR, Oliveira-Sales EB, Bergamaschi CT. Regulação Neuro-humoral do Sistema Cardiovascular. In: Serrano Jr CV Jr, Timerman A, Stefanini E, ed. <i>Tratado de Cardiologia SOCESP</i> . 2 <sup>a</sup> ed. São Paulo, SP: Editora Manole. 2009:113-124. ....	194

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das vias aferentes, integração central, vias eferentes e eferoras do reflexo barorreceptor. ....	5
Figura 2. Representação esquemática do sistema renina-angiotensina clássico e tecidual. ....	9
Figura 3. Produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). ....	14
Figura 4. Produção de ânion superóxido pela NAD(P)H oxidase. ....	15
Figura 5. Hipótese de como o estresse oxidativo modula as regiões RVL e PVN. ...	18
Figura 6. Hipóteses testadas nesta Tese. ....	22
Figura 7. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação das variações cardiovasculares e autonômicas no modelo 2R-1C. ....	27
Figura 8. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação da expressão gênica e proteica do receptor AT-1 e de iNOS na região RVL de ratos 2R-1C e sham. ....	31
Figura 9. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação das respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Losartan na região RVL nos animais 2R-1C e sham anestesiados. ....	31
Figura 10. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação das respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina na região RVL nos animais 2R-1C e sham anestesiados. ....	32
Figura 11. Traçado representativo das respostas de pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade simpática renal (∫ANSR) à administração endovenosa de Fenilefrina (10 µg/kg) na sexta semana após a colocação do clipe em um animal 2R-1C e após a cirurgia fictícia nos animais sham anestesiados. ....	42
Figura 12. Traçado típico das respostas de pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade simpática renal (∫ANSR) à administração endovenosa de Hexametônio (20 mg/ kg) em um animal 2R-1C e sham anestesiados. ....	43
Figura 13. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação da expressão gênica de NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD e do receptor AT-1 na região RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e Sham. ....	45
Figura 14. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação das respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Tempol na região RVL nos animais 2R-1C e sham anestesiados. ....	45

Figura 15. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação das respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Tempol no PVN nos animais 2R-1C e sham anestesiados. ....	46
Figura 16. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação das respostas cardiovasculares à administração endovenosa de Tempol nos animais 2R-1C e sham anestesiados. ....	47
Figura 17. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliar se a inibição de ânions superóxidos na região RVL no modelo 2R-1C previne a hipertensão arterial. ....	52
Figura 18. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliar se o tratamento crônico com Vit C produz modificações nas ações cardiovasculares, como PAM, FC e na ANSR nos animais hipertensos 2R-1C e Sham. ....	58
Figura 19. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação da expressão gênica de NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD, do receptor AT-1, nNOS, iNOS, IL-1 $\beta$ e Glut-1 nas regiões RVL, PVN e CN, após o tratamento crônico com Vit C durante 7 dias a partir da quinta semana (Dia 35) da colocação do clipe ou da realização da cirurgia fictícia nos animais Sham. ....	59
Figura 20. Evolução da pressão arterial no modelo 2R-1C. ....	64
Figura 21. Análise espectral dos animais 2R-1C e sham (1). ....	67
Figura 22. Análise espectral dos animais 2R-1C e sham (2). ....	69
Figura 23. Respostas de frequência cardíaca e do ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco de animais 2R-1C e sham. ....	72
Figura 24. Expressão gênica e protéica do receptor AT-1 e de iNOS na região RVL de ratos 2R-1C e sham. ....	74
Figura 25. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Glutamato na região RVL nos animais 2R-1C e sham. ....	76
Figura 26. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Losartan na região RVL nos animais 2R-1C e sham. ....	79
Figura 27. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina na região RVL nos animais 2R-1C e sham. ....	82
Figura 28. Traçado representativo das respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina na região RVL em um animal 2R-1C e um sham. ....	83
Figura 29. Comprovação histológica dos sítios de injeção e dos <i>punches</i> realizados na região RVL. ....	84
Figura 30. Expressão gênica das subunidades de NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD e receptor AT-1 nas regiões RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e sham. ....	87
Figura 31. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Tempol na região RVL nos animais 2R-1C e sham. ....	90



Figura 32. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção unilateral de Tempol no PVN nos animais 2R-1C e sham. ....	92
Figura 33. Comprovação histológica dos sítios de injeção e dos <i>punches</i> realizados na região RVL.....	93
Figura 34. Comprovação histológica dos sítios de injeção e dos <i>punches</i> realizados no PVN. ....	94
Figura 35. Lipoperoxidação plasmática indicada pelos níveis de TBARS no grupo 2R-1C (n=9) e sham (n=8). ....	95
Figura 36. Respostas cardiovasculares à administração endovenosa de Tempol nos animais 2R-1C e sham. ....	98
Figura 37. Traçado representativo das respostas cardiovasculares à administração endovenosa de Tempol (10 e 30 mg/kg) de um animal 2R-1C e um sham. ....	99
Figura 38. Efeitos da super expressão de Ad-CMV-CuZnSOD e de Ad-CMV-eGFP na região RVL na pressão arterial nos animais 2R-1C e sham. ....	103
Figura 39. Efeitos da super expressão de Ad-CMV-CuZnSOD e de Ad-CMV-eGFP na região RVL na variabilidade da pressão arterial sistólica nos animais 2R-1C e sham. ....	107
Figura 40. Efeitos da super expressão de Ad-CMV-CuZnSOD e de Ad-CMV-eGFP na região RVL na frequência cardíaca e no ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco nos animais 2R-1C e sham.....	111
Figura 41. Confirmação da transfecção do vírus Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL nos animais 2R-1C. ....	113
Figura 42. Fluorescência de DHE dos animais 2R-1C transfectados com os vírus Ad-CMV-eGFP e Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL.....	114
Figura 43. Respostas cardiovasculares ao tratamento crônico com Vit C nos animais 2R-1C e sham. ....	116
Figura 44. Análise da expressão gênica das subunidades de NAD(P)H oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD e receptor AT-1 nas regiões RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e sham tratados com Vit C. ....	119
Figura 45. Análise da expressão gênica das subunidades de nNOS, iNOS, IL-1 $\beta$ e de Glut-1 nas regiões RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e sham tratados com Vit C. ....	122
Figura 46. Resumo esquemático do mecanismo gerador da HA via ROS.....	151
Figura 47. Esquema representativo das principais observações deste estudo mostrando que alterações em vários fatores, como AT-1, iNOS, nNOS, subunidades da NAD(P)H oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD, IL-1 $\beta$ e Glut-1 nas regiões pré-motoras do simpático, RVL e PVN, podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão 2R-1C.....	157

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de <i>primers</i> do receptor AT-1, iNOS e $\beta$ -actina para PCR quantitativo em Tempo Real.....	36
Tabela 2. Sequências de <i>primers</i> das subunidades de NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox) e CuZnSOD para PCR quantitativo em Tempo Real .....	49
Tabela 3. Sequências de <i>primers</i> nNOS, IL-1 $\beta$ e Glut-1 para PCR quantitativo em Tempo Real .....	61
Tabela 4. Evolução da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM) durante 6 semanas nos animais hipertensos 2R-1C e Sham. ....	63
Tabela 5. Análise espectral dos valores de intervalo de pulso (IP), de baixa frequência de intervalo de pulso (LF (IP)) e alta frequência de intervalo de pulso (HF (IP)) de animais hipertensos 2R-1C e sham durante 6 semanas.....	66
Tabela 6. Análise espectral dos valores de muito baixa frequência de pressão arterial sistólica (VLF (PAS)) e baixa frequência de pressão arterial sistólica (LF (PAS)) de animais 2R-1C e sham durante 6 semanas. ....	68
Tabela 7. Mudanças na frequência cardíaca (FC), no ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco em relação ao componente parassimpático (GRBe (FC)) e em relação ao intervalo de pulso (GRBe (IP)) de animais 2R-1C e sham durante 6 semanas. ....	71
Tabela 8. Valores de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e de atividade nervosa simpática renal (ANSR) analisados em resposta à nanoinjeção bilateral de Losartan (10 nmol/ 100 nL) na região RVL nos animais 2R-1C e Sham. ....	78
Tabela 9. Valores de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e de atividade nervosa simpática renal (ANSR) analisados em resposta à nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina (250 pmol/ 100 nL) na região RVL nos animais 2R-1C e Sham. ....	81
Tabela 10. Evolução da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM) antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL de animais 2R-1C e sham. ....	101
Tabela 11. Evolução da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM) antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-eGFP na região RVL de animais 2R-1C e sham.....	102
Tabela 12. Análise espectral dos valores de muito baixa frequência de pressão arterial sistólica (VLF (PAS)) e baixa frequência de pressão arterial sistólica (LF (PAS)) antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL dos animais 2R-1C e sham. ....	105
Tabela 13. Análise espectral dos valores de muito baixa frequência de pressão arterial sistólica (VLF (PAS)) e baixa frequência de pressão arterial sistólica (LF	

(PAS)) antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-eGFP na região RVL dos animais 2R-1C e sham. ....	106
Tabela 14. Mudanças na frequência cardíaca (FC) e no ganho espontâneo do reflexo do barorreceptor cardíaco em relação componente parassimpático (GRBe (FC)) antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL dos animais 2R-1C e sham. ....	109
Tabela 15. Mudanças na frequência cardíaca (FC) e no ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco em relação componente parassimpático (GRBe (FC)) antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-eGFP na região RVL dos animais 2R-1C e sham. ....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>Ad-CMV-CuZnSOD</b>	Adenovírus expressando superóxido dismutase cobre zinco direcionado por promotores de citomegalovirus humano
<b>Ad-CMV-eGFP</b>	Adenovírus expressando proteína verde fluorescente direcionado por promotores de citomegalovirus humano
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>ANSR</b>	Atividade nervosa simpática renal
<b>∫ANSR</b>	Integral da atividade nervosa simpática renal
<b>AT-1</b>	Receptor angiotensinérgico do subtipo I
<b>AV3V</b>	Região Antero-ventral do terceiro ventrículo
<b>bpm</b>	Batimentos por minuto
<b>CuZnSOD</b>	Superóxido dismutase cobre zinco
<b>DHE</b>	Dihidroetídio
<b>ECA</b>	Enzima conversora de Angiotensina
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>EV</b>	Endovenosa
<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>FFT</b>	Transformada rápida de Fourier
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ aminobutírico
<b>Glut-1</b>	Transportador de membrana de glicose do tipo 1
<b>GRBe (FC)</b>	Ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco em relação à frequência cardíaca
<b>GRBe (IP)</b>	Ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco em relação ao intervalo de pulso
<b>HA</b>	Hipertensão arterial
<b>HF (IP)</b>	Alta frequência de análise espectral em relação ao intervalo de pulso
<b>Hz</b>	Hertz (Potenciais por segundo)
<b>ICV</b>	Intracerebroventricular

<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 Beta
<b>IML</b>	Coluna intermédio-lateral
<b>iNOS</b>	Isoforma induzida do óxido nítrico
<b>IP</b>	Intervalo de pulso
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>LF (IP)</b>	Baixa frequência de análise espectral em relação ao intervalo de pulso
<b>LF (PAS)</b>	Baixa frequência de análise espectral em relação a pressão arterial sistólica
<b>mg</b>	Miligrama
<b>ms</b>	Milisegundos
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercúrio
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>NAD(P)H oxidase</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>nL</b>	Nanolitros
<b>nNOS</b>	Isoforma neuronal do óxido nítrico
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NTS</b>	Núcleo do trato solitário
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ânion superóxido
<b>OCV</b>	Órgãos circunventriculares
<b>PA</b>	Pressão arterial
<b>PAD</b>	Pressão arterial diastólica
<b>PAM</b>	Pressão arterial média
<b>PAP</b>	Pressão arterial pulsátil
<b>PAS</b>	Pressão arterial sistólica
<b>p47phox</b>	Subunidade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>gp91phox</b>	Subunidade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>PVN</b>	Núcleo paraventricular do hipotálamo
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>RT-PCR</b>	Transcriptase reversa – reação da polimerase em cadeia
<b>RVL</b>	Região rostroventrolateral do bulbo
<b>SFO</b>	Órgão sub-fornical
<b>SHR</b>	Ratos espontaneamente hipertensos

<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNS</b>	Sistema nervoso simpático
<b>SOD</b>	Enzima superóxido dismutase
<b>SRAA</b>	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
<b>TBARS</b>	Técnica de reação entre espécies reativas de oxigênio e o ácido tiobarbitúrico
<b>TGR(ASrAOGEN)</b>	Rato transgênico com baixo angiotensinogênio cerebral
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilase
<b>UA</b>	Unidades Arbitrárias
<b>Vit C</b>	Vitamina C
<b>VLF (PAS)</b>	Muito baixa frequência de análise espectral em relação a pressão arterial sistólica
<b>XO</b>	Xantina Oxidase
<b>µm</b>	Micrômetros
<b>2R-1C</b>	2 Rins- 1Clipe

## RESUMO

A Hipertensão arterial (HA) renovascular está associada com uma hiperatividade simpática e prejuízo na sensibilidade reflexa do barorreceptor determinadas por aumento na Angiotensina II (Ang II) circulante. O objetivo da presente Tese foi avaliar o papel do estresse oxidativo na geração e manutenção da HA 2 Rins-1Clipe. Ratos Machos Wistar foram utilizados em cinco séries de experimentos. Os resultados demonstraram uma alteração no controle autonômico cardíaco caracterizado por maior modulação simpática nos vasos, um prejuízo da sensibilidade reflexa do barorreceptor e taquicardia a partir da quarta semana. Além disso, observou-se que Ang II (via receptor AT-1) e o NO (produzido pela iNOS) na região rostro ventrolateral do bulbo (RVL), participam mantendo a HA e a atividade nervosa simpática renal em ratos 2R-1C. Evidenciou-se um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, caracterizando um estado de estresse oxidativo nas regiões RVL e no núcleo paraventricular (PVN) dos animais 2R-1C, visto que o aumento de pressão arterial (PA) e a hiperatividade simpática são revertidos com a administração do antioxidante (Tempol) nessas regiões. A super expressão crônica de CuZnSOD na região RVL preveniu a HA e reduziu a produção de superóxidos nessa região em ratos 2R-1C. Além disso, melhorou a sensibilidade reflexa do barorreceptor e inibiu a taquicardia observada a partir da quarta semana de HA. O tratamento crônico com Vitamina C promoveu queda da PA e simpato-inibição nos animais hipertensos. Além disso, reduziu a expressão gênica das subunidades de NAD(P)H oxidase nas regiões RVL e PVN, mas não interferiu na expressão de CuZnSOD. O estresse oxidativo também parece influenciar na expressão gênica do

receptor AT-1, iNOS, nNOS, IL-1  $\beta$  e Glut-1 nas regiões RVL e PVN, visto que o tratamento reduziu a expressão desses componentes. Baseado em nossos resultados, podemos sugerir que o sistema angiotensinérgico, nitrérgico e o estresse oxidativo nas regiões RVL e PVN estão envolvidos na manutenção do tônus simpático e da HA 2R-1C. O estresse oxidativo em neurônios pré-motores do simpático é um mecanismo essencial para o estabelecimento e manutenção da HA Ang II - dependente.

**Palavras-chaves:** estresse oxidativo, hipertensão arterial renovascular, região rostro ventrolateral do bulbo, núcleo paraventricular do hipotálamo, sistema nervoso simpático.



## ABSTRACT

The renovascular arterial hypertension (AH) is associated with sympathetic hyperactivity and impaired baroreflex sensitivity determined by increase in circulating angiotensin II (Ang II). The aim of this thesis was to evaluate the role of oxidative stress in the generation and maintenance of the AH (2 Kidney – 1 Clip). Five series of experiments were performed in male Wistar. The results showed autonomic cardiovascular control changes characterized by increased sympathetic modulation in blood vessels, impaired baroreflex sensitivity and tachycardia from the fourth week. Furthermore, we observed that Ang II (via AT-1 receptor) and NO (produced by iNOS) in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) are involved in the maintenance of AH and renal sympathetic nerve activity in the 2K-1C. Indeed, there is an imbalance between pro-oxidants and antioxidants in the RVL and hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of animals 2K-1C, because the increase in blood pressure (BP) and sympathetic hyperactivity was reversed in response to administration of the antioxidant (Tempol) into the RVLM and PVN. The over expression of CuZnSOD in the RVLM prevented the AH and reduced the production of superoxide in this region in 2K-1C. Furthermore, improved the impaired baroreflex sensitivity and inhibited the tachycardia observed from the fourth week of AH. Chronic Vitamin C treatment decreased BP and sympathetic activation in hypertensive animals. In addition, reduced gene expression of subunits of NAD (P) H oxidase in the PVN and RVLM, but unchanged the expression of CuZnSOD. Oxidative stress also seems to influence the gene expression of AT-1 receptor, iNOS, nNOS, IL-1  $\beta$  and Glut-1 in the PVN and RVL regions, because the treatment reduced the expression of these components. Based on our results, we suggest that

the angiotensin system, NO and oxidative stress in the PVN and RVLM are involved in the maintenance of sympathetic tone and the AH 2K-1C. Oxidative stress in sympathetic premotor neurons is a major mechanism for the establishment and maintenance of Ang II – dependent hypertension.

**Keywords:** oxidative stress, renovascular hypertension, the rostral ventrolateral medulla, hypothalamus paraventricular nucleus, sympathetic nervous system.

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são responsáveis por 16,7 milhões de mortes ao ano. Dentre as doenças cardiovasculares relacionadas, a hipertensão arterial (HA) é encontrada em uma porcentagem significativa da população. Mundialmente a HA é responsável por aproximadamente 7,1 milhões de mortes prematuras por ano, o que representa 13% do total geral de óbitos (WHO & ISH, 2003). Na população brasileira adulta, de acordo com o Ministério da Saúde (1991) e o IBGE (Censo Populacional de 1991), a estimativa da HA é de 15%. Entretanto, taxas mais elevadas foram encontradas na cidade do Rio de Janeiro em 1990 (32%) e no Estado de São Paulo (25%) (V DBHA, 2006).

Existem diversas causas envolvidas na fisiopatogenia da HA, no entanto, a maioria dos pacientes são ainda considerados hipertensos sem causa definida, ou seja, hipertensos primários ou essenciais. A patogênese da hipertensão essencial é, em grande parte, indefinida, multifatorial, e altamente complexa (Ye *et al.*, 2000). Por outro lado, quando a etiologia da doença é conhecida, define-se a hipertensão como secundária, o que pode, portanto, direcionar o tratamento de acordo com a etiologia.

A hipertensão renovascular é considerada uma das causas mais freqüentes de HA secundária. Sua prevalência é estimada entre 1 a 5% da população geral de hipertensos. Um dos modelos mais utilizados para o estudo da HA experimental foi proposto por Goldblatt (1934), no qual a hipertensão renovascular é induzida por

meio da estenose parcial da artéria renal de um dos rins, em geral do rim esquerdo, por implantação de um clipe de prata; diante disso, o modelo é também denominado de 2 Rins – 1 Clipe (2R-1C) (Goldblatt *et al.*, 1934; Edmunds *et al.*, 1991, Melaragno e Fink, 1996). Diante disso, este foi o modelo escolhido para ser investigado na presente Tese. Estudos têm demonstrado que diversos fatores estão envolvidos na fisiopatogenia desse modelo de hipertensão – entre eles, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), no qual a cascata de eventos inicia-se com o aumento da secreção de renina no rim clipado levando ao aumento na Angiotensina II (Ang II) circulante. Além disso, há retenção de sódio, expansão do volume circulante, aumento na produção de aldosterona e na resistência periférica, e finalmente ativação do sistema nervoso simpático (SNS) e aumento da pressão arterial (PA) (Ploth, 1983; Mitchell & Navar, 1995; Navar *et al.*, 1998; Lerman *et al.*, 2005).

No desenvolvimento e manutenção da HA humana e experimental, muitos mecanismos vasoconstritores estão envolvidos e com maior tonicidade, como o SNS, SRAA, além da participação das endotelinas e do hormônio antidiurético. Além desses mecanismos clássicos, as espécies reativas de oxigênio (ROS) recentemente também têm se destacado na gênese da HA. Além disso, uma possível atenuação dos mecanismos vasodilatadores como o óxido nítrico (NO), o fator natriurético atrial, bradicinina e prostaglandinas também podem estar envolvidos nesta patologia, ou seja, há em geral um desequilíbrio entre influências vasoconstritoras e vasodilatadoras levando a um novo patamar tensional (de Champlain *et al.*, 2004).

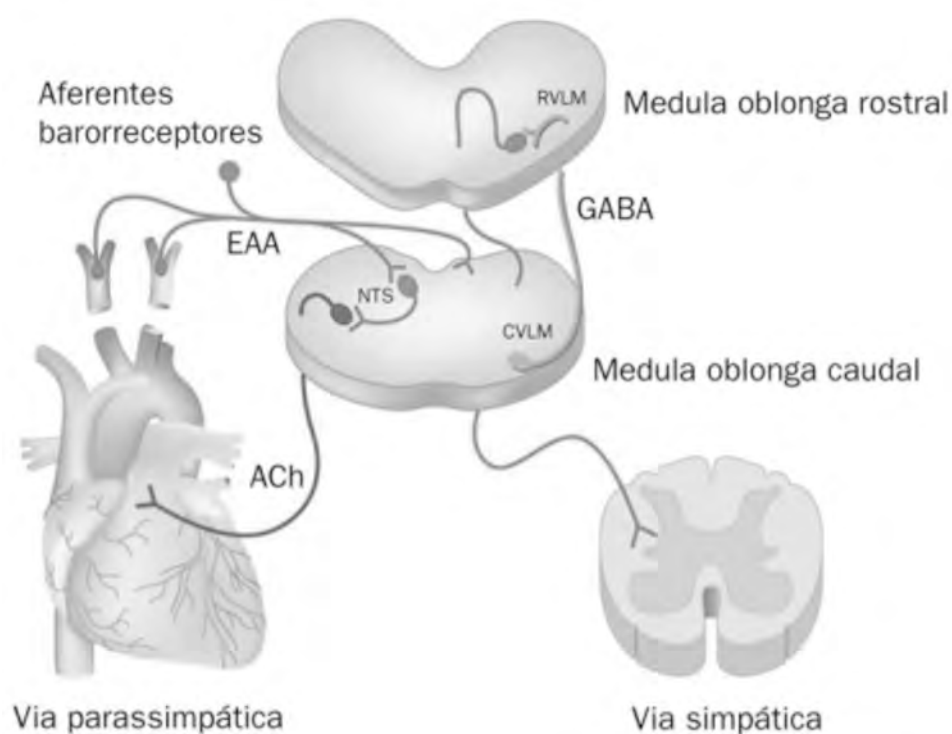
O sistema nervoso central (SNC) tem um importante papel no controle da PA. O SNC pode, por exemplo, atuar por meio do sistema nervoso autônomo, e modificar os dois principais determinantes da PA, ou seja, o débito cardíaco (DC) e a resistência periférica total (RPT), uma vez que  $PA = DC \times RPT$ . Contudo, os mecanismos pelos quais o SNC participa na evolução da HA ainda são motivos de discussão e dependem da origem específica do estado hipertensivo. Entretanto, um grande número de evidências experimentais e clínicas mostram que a elevação da atividade nervosa simpática e alterações na sensibilidade do reflexo barorreceptor participam tanto no desenvolvimento como na manutenção da HA (Bergamaschi *et al.*, 1995; Bergamaschi *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2001, Colombari *et al.*, 2001, Ito *et al.*, 2001; Allen, 2002; Dampney *et al.*, 2003; Guyenet, 2006; Campos & Bergamaschi, 2006).

A importância do SNS na HA passou a ser melhor avaliada com o aparecimento de técnicas mais refinadas para medição de sua atividade, como a liberação local (*spillover*) de noradrenalina, microneurografia, técnicas de eletrofisiologia (registro direto de nervos simpáticos e atividade neuronal) e técnicas de imunohistoquímica (Esler *et al.*, 1989; Mancia *et al.*, 1999; Grassi *et al.*, 2004). Tais técnicas permitem quantificar o tônus simpático de forma relativamente seletiva a diferentes territórios e em diferentes fases da evolução do estado hipertensivo. Esta Tese pretendeu realizar o registro eletrofisiológico pós-ganglionar do nervo simpático renal em ratos submetidos ao modelo de HA renovascular.

Grassi e cols, em 1998, demonstraram que na HA essencial em humanos, o aumento da PA e da atividade vasomotora simpática também são acompanhados

de um prejuízo no reflexo barorreceptor. Adicionalmente, outros autores observaram respostas autonômicas atenuadas durante alteração postural na hipertensão essencial, com redução na variabilidade da frequência cardíaca indicando uma redução no tônus parassimpático (Huikuri *et al.*, 1996; Virtanen *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2005).

O reflexo barorreceptor é reconhecido como um dos mecanismos mais importantes para o controle fino da atividade autonômica sobre o sistema cardiovascular. Os barorreceptores localizados, sobretudo na artéria aorta e na bifurcação das carótidas enviam suas informações para o SNC através do nervo vago e glossofaríngeo, respectivamente. Essas informações convergem para o NTS (núcleo do trato solitário) e fazem sinapses em neurônios localizados neste núcleo, com funções específicas de intermediar este reflexo. Do NTS partem projeções que atuam simultaneamente sobre neurônios bulbares de controle simpático (região rostro ventrolateral da medula - RVL) e parassimpático (sobretudo núcleo ambíguo) **(Figura 1)**. Assim, sempre que houver aumento na atividade barorreceptora, ocorrerá de forma reflexa uma redução do tônus simpático e aumento do tônus vagal. Como esse reflexo se processa com muita rapidez e os neurotransmissores utilizados são, sobretudo, o glutamato (aminoácido excitatório) e o GABA (ácido gama aminobutírico) esse mecanismo é capaz de controlar o sistema cardiovascular batimento a batimento (Machado, 2001; Colombari *et al.*, 1994; Sved & Gordon, 1994; Pilowsky & Goodchild, 2002; Campos *et al.*, 2009).



**Figura 1. Representação esquemática das vias aferentes, integração central, vias eferentes e eferoras do reflexo barorreceptor.**

Ach: acetilcolina; GABA: Ácido gama —aminobutírico; EAA: aminoácido excitatório; CVLM: medula ventrolateral caudal; RVLM: região rostro ventrolateral da medula (*Figura adaptada de Sved AF & Gordon FJ. Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. NIPS 1994; 9: 243-5).*

Dessa forma, um dos objetivos da presente Tese foi avaliar parâmetros cardiovasculares e relacionados à função autonômica cardiovascular, como PA, frequência cardíaca (FC), modulação da atividade vasomotora simpática e o ganho espontâneo do reflexo do barorreceptor cardíaco durante a evolução da HA 2R-1C.

Evidências funcionais demonstraram que a região RVL é uma região de fundamental importância no controle das fibras simpáticas barossensíveis. Há aproximadamente 35 anos os estudos pioneiros de Pedro Guertzenstein e William Feldberg (Feldberg & Guertzenstein, 1972; Guertzenstein, 1973; Guertzenstein &

Silver, 1974) demonstraram que a inativação química por meio da aplicação tópica de glicina ou lesão bilateral desta região promovia redução mantida da PA em gatos anestesiados, nessa época os autores definiram essa região como área glicino-sensitiva. Estudos posteriores demonstraram que a inativação ou a lesão bilateral de áreas equivalentes à descrita por Feldberg & Guertzenstein, promovia reduções marcantes da atividade simpática e da PA em animais normotensos anestesiados (Dampney & Moon, 1980; Stein *et al.*, 1989; Beluli & Weaver, 1991) ou acordados (Sakima *et al.*, 2000).

Hoje, sabe-se que a atividade vasomotora simpática é determinada pela ação específica e tônica de núcleos do SNC denominados de núcleos pré-motores do simpático, particularmente, neurônios pré-motores do simpático localizados na região RVL e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Esses neurônios projetam-se monossinapticamente para a coluna intermédio-lateral (IML) onde se localizam as células pré-ganglionares do simpático (Strack *et al.*, 1989). Entretanto, ainda se discute os mecanismos pelos quais esses núcleos geram a tonicidade simpática de importância no controle cardiovascular, ou seja, ainda desconhece-se exatamente como o SNC gera a atividade vasomotora simpática (Dampney *et al.*, 2005). Outras regiões do SNC também são pré-motoras do simpático, porém, aparentemente com pouca influência sobre a geração da tonicidade simpática (Loewy, 1990). Dessa forma, investigar o papel dos principais núcleos pré-motores do simpático (RVL e PVN) na geração da atividade vasomotora simpática torna-se relevante, tanto na condição de normalidade como em situações patofisiológicas, como, por exemplo, na HA. Na presente Tese, o papel desses dois núcleos no que diz respeito ao controle cardiovascular foi investigado no modelo 2R-1C.



No modelo renovascular, existem evidências da participação de diferentes estruturas centrais no desenvolvimento da hipertonia simpática e HA. Na fase estável de hipertensão, há um aumento na atividade colinérgica da RVL, sem nenhuma alteração na atividade de outros núcleos do bulbo, isto sugere, portanto, uma possível especificidade no aumento da atividade simpática e manutenção da HA (Kubo *et al.*, 1996).

Como a atividade dos neurônios localizados na RVL mantém o tônus vasomotor simpático nos animais normotensos, Bergamaschi e cols., em 1995, investigaram a participação dessa região na manutenção da HA renovascular. Verificaram que a hipertensão renovascular dependia da atividade de células da RVL. Mais importante foi o achado inédito de que a administração do bloqueador de amplo espectro de receptores glutamatérgicos – ácido quinurênico - produziu queda da PA somente nos animais do grupo hipertenso, sem alterações importantes nos animais normotensos, demonstrando uma ativação tônica destes receptores neste modelo de hipertensão. Posteriormente, esse achado foi confirmado em outros modelos experimentais de HA (Campos & Bergamaschi, 2006).

Além da participação da RVL na geração do tônus simpático no modelo renovascular, o PVN também pode estar envolvido. A hipótese de que o aumento nas influências excitatórias para os neurônios pré-motores da RVL na HA seja proveniente, em parte, direta ou indiretamente do PVN não pode ser descartada. Pois o PVN é capaz de alterar a atividade vasomotora simpática e parâmetros cardiovasculares via ativação de neurônios pré-ganglionares simpáticos na medula

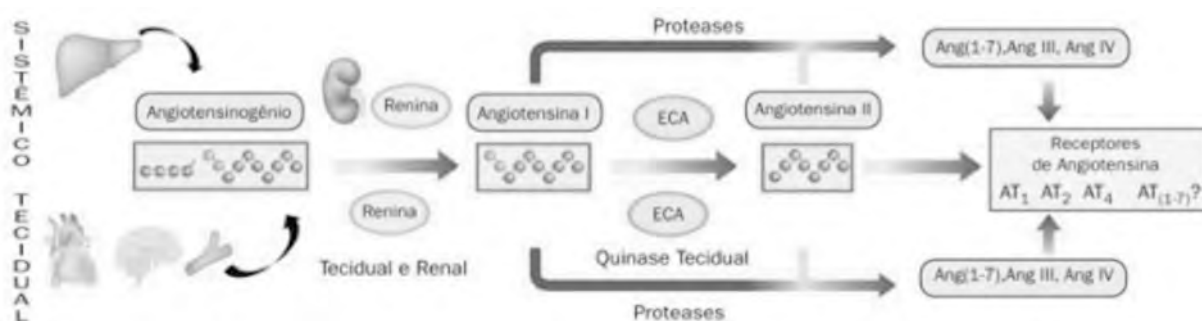
espinhal e via conexão direta com a RVL (Stocker *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 1990; Wible *et al.*, 1989). Tagawa & Dampney, em 1999, demonstraram, por exemplo, que a estimulação do PVN produz aumento da PA e atividade simpática dependentes da integridade de receptores AT-1 de angiotensina na região RVL.

A excitação do PVN pelo glutamato ou a sua desinibição através da injeção de bicuculina, antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>, induz um significativo aumento na descarga nervosa simpática, na PA e na FC (Martin *et al.*, 1991; Kannan *et al.*, 1989). Além disso, a inibição dos neurônios do PVN com um agonista do receptor GABA<sub>A</sub>, mucimol, causou uma redução da atividade simpática e da PA (Yang & Coote, 1998). Silva *et al.*, em 2005, bloquearam a angiotensina (1-7) endógena no PVN e verificaram redução do tônus simpático renal. Estes resultados indicam que o PVN tonicamente influencia a pressão arterial e a atividade simpática através, sobretudo, de mecanismos GABAérgicos.

Além do SNS, vários trabalhos têm demonstrado a importância do SRAA para o desenvolvimento e manutenção de HA humana e experimental (Fink, 1997; Esler, 2002). A visão clássica do SRAA consiste em uma cascata de reações que têm início quando o angiotensinogênio, secretado pelo fígado, e liberado continuamente na circulação sanguínea. Este, por sua vez, é clivado na circulação pela ação da enzima renina, liberada pelo aparelho justaglomerular dos rins. A renina transforma o angiotensinogênio em um decapeptídeo chamado Angiotensina (Ang I). Sob a ação de uma metaloproteinase, a enzima conversora de angiotensina (ECA), que é predominantemente expressa em alta concentração na superfície das

células endoteliais na circulação pulmonar, a Ang I é transformada no octapeptídeo Ang II (Peach, 1977; Atlas, 1998; Santos & Sampaio, 2002).

A Ang II foi por muito tempo considerada como o único peptídeo biologicamente ativo deste sistema, entretanto recentemente este conceito foi ampliado e vários fragmentos desse sistema foram identificados como biologicamente ativos. Foram descritas ações biológicas para vários outros peptídeos formados a partir da Ang I ou Ang II, como Angiotensina III, Angiotensina IV e a Angiotensina 1-7 (**Figura 2**) (Ardailou, 1997).



**Figura 2. Representação esquemática do sistema renina-angiotensina clássico e tecidual.**

(Figura de Campos RR, Oliveira-Sales EB, Bergamaschi CT. *Regulação Neuro-humoral do Sistema Cardiovascular*. In: Serrano Jr CV Jr, Timerman A, Stefanini E, ed. *Tratado de Cardiologia SOCESP*. 2ª ed. São Paulo, SP: Editora Manole. 2009:113-124).

Contudo, a Ang II é considerada o principal agente efetor deste sistema e vai atuar sobre receptores muito específicos localizados na membrana celular (AT-1 e AT-2). Dentre as principais Ações da Ang II mediadas pelo receptor AT-1 estão as ações cardiovasculares (vasoconstrição, aumento da pressão arterial, aumento da contratilidade miocárdica, hipertrofia cardíaca e vascular), ações renais (reabsorção tubular de sódio, inibição da liberação de renina), ações no SNC (estimulação do

SNS, liberação de vasopressina, aumento da sede e apetite ao sódio) e ações sobre o córtex da adrenal, produzindo síntese de aldosterona. Os receptores AT-1 também medeiam os efeitos da Ang II no crescimento e proliferação celular (Allen *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999; Santos & Sampaio, 2002).

Diversos fatores como mencionado acima, estão envolvidos no modelo de HA renovascular 2R-1C, entre eles, o SRAA, no qual o aumento da Ang II circulante produz retenção de sódio, expansão do volume, aumento na produção de aldosterona e na resistência periférica, e finalmente ativação do SNS e aumento da PA (Mitchell & Navar, 1995; Navar *et al.*, 1998).

Uma das possíveis explicações para a ativação simpática é a ação central da Ang II circulante nos tecidos periventriculares da região ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V), região destituída da barreira hemato-encefálica (Faber & Brody, 1983). Brody (1988) demonstrou que a lesão eletrolítica da AV3V reduz ou reverte os níveis tensionais em vários modelos experimentais de HA. Além disso, como a Ang II não atravessa a barreira hemato-encefálica, é possível que Ang II plasmática possam interagir com seus receptores localizados nos Órgãos circunventriculares (OCV) incluindo Órgão Subfornical (OSF), Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal (OVLT) e Área Postrema (AP), além da hipófise anterior e posterior e eminência mediana (Wright & Harding, 1994, Ferguson & Bains, 1997; Fink, 1997; Phillips & Summers, 1998). Essas regiões são constituídas de grande número de capilares fenestrados, os OCV estão localizados ao redor do terceiro e quarto ventrículos e são conhecidos como fundamentais no mecanismo de regulação da PA. Desta forma, a simpato-excitação e conseqüente aumento da PA decorrente da ação da

Ang II sobre os neurônios localizados no OSF e OVLT, seriam devidos a conexões excitatórias destas regiões com o PVN. Uma vez ativado, o PVN promoveria aumentos da atividade vasomotora simpática através de suas projeções sobre os neurônios localizados na RVL e na coluna IML (Ku *et al.*, 1999; Potts *et al.*, 1999). Adicionalmente, a possibilidade de que a Ang II atue na área postrema e produza ações excitatórias em neurônios pré-motores do simpático também é plausível (Campos & Bergamaschi, 2006).

Vários estudos evidenciam a importância funcional do receptor AT-1 na região RVL. Dampney e cols, em 2002 demonstraram que o receptor AT-1 não parece contribuir significativamente para a geração da atividade tônica dos neurônios simpato-excitatórios da região RVL em ratos anestesiados normotensos. Por outro lado, Allen e cols., em 2006, demonstraram um aumento exacerbado da PA sustentado por três a quatro dias após a transfecção de um adenovírus que super expressa o receptor AT-1A na região RVL em ratos.

Diante disso, percebemos a necessidade de estudar o papel dos neurônios da região RVL sobre condições fisiopatológicas, como a HA renovascular na qual os níveis endógenos de Ang II estão elevados. Dessa forma, o segundo objetivo dessa Tese foi estudar o efeito do bloqueio do receptor angiotensinérgico AT-1 na região RVL nos parâmetros como PA, FC e atividade nervosa simpática (ANS) no período de estabilidade da hipertensão 2R-1C. Como mencionado acima, considerando que o desequilíbrio entre influências excitatórias e inibitórias pode ser fundamental para o estabelecimento de novos patamares de atividade vasomotora

simpática e de níveis tensionais. Desta forma, na presente Tese, o papel do NO também foi avaliado.

Além dos mecanismos vasoconstritores envolvidos no desenvolvimento e manutenção da HA tanto humana como experimental, o NO também exerce um importante papel central na regulação da PA (Tseng *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997; Krukoff, 1999; Zanzinger, 1999; Lawrence, 1997). Muitos estudos demonstram, por exemplo, que a ação simpato-inibitória do NO no SNC resulta na redução da PA (Persson, 1996; Patel *et al.*, 2001).

Há três décadas o NO era conhecido apenas como um componente gasoso nocivo do ar atmosférico. Posteriormente, foi identificado como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (Furchgott & Zawadzki, 1980). Atualmente muitas investigações têm revelado que o NO é produzido por uma variedade de tecidos humanos e está envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos (Moncada & Higgs; 1993; Mizutani & Layon; 1996).

O NO é uma molécula extremamente lipofílica que atravessa facilmente as membranas, por processo de difusão. Possui em sua estrutura um elétron não pareado, que o torna altamente reativo (Hart,1999). A síntese de NO é catalizada pela enzima NO sintase (NOS). Esta enzima faz a captação do nitrogênio da arginina, liga-o ao oxigênio molecular, produzindo a citrulina e liberando o gás NO. A NOS é uma enzima presente em uma grande variedade de células. Três isoformas de NOS foram identificadas: duas constitutivas e uma induzida. A NOS

neuronal (nNOS): presente principalmente no SNC e periférico, é a forma constitutiva e é regulada pelo aumento de cálcio intracelular. A NOS endotelial (eNOS): detectada inicialmente em células endoteliais vasculares, também é constitutiva e sua atividade é amplamente estimulada pelo aumento de concentração de cálcio intracelular. A NOS induzida (iNOS): pode ser induzida por uma variedade de fatores envolvidos com a inflamação como LPS e citocinas em macrófagos, células endoteliais, hepatócitos, neutrófilos e célula muscular lisa. Portanto, iNOS somente é expressada em situações patofisiológicas como, por exemplo, na HA, infarto do miocárdio, choque endotóxico e envelhecimento. Por essa via, a produção de NO independe da concentração intracelular de cálcio (Chou *et al.*, 1998; Hart, 1999; Hampl & Herget, 2000; Yang *et al.*, 2004). Diante disso, examinar se o bloqueio de iNOS na região RVL promove alterações na PA, FC e ANS no período de estabilidade da hipertensão 2R-1C foi também um dos objetivos desta Tese.

Portanto, o controle homeostático da PA depende do balanço harmonioso entre vários mecanismos vasoconstritores e vasodilatadores. Existem evidências na literatura de que os mecanismos vasoconstritores estão associados também com a indução das ROS, e estas por sua vez, atenuam os mecanismos vasodilatadores, constituindo dessa forma, um importante mecanismo na evolução da HA (Dhalla *et al.*, 2000).

As ROS são compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) ou derivados dos produtos da redução. Quando o excesso de ROS oprime os sistemas endógenos antioxidantes caracteriza-se um estado de

estresse oxidativo. Uma das mais importantes ROS da vasculatura é o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o qual é formado pela redução univalente do oxigênio, que pode sofrer dismutação pela superóxido dismutase (SOD) produzindo mais ROS estáveis, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Essa, por sua vez, pode ser convertida enzimaticamente em  $H_2O$  pela catalase ou glutatona peroxidase. Além disso, o  $H_2O_2$  pode reagir com metais de transição e ser convertido em uma espécie altamente reativa, o radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ), ou ainda pode ser metabolizado por mieloperoxidase para formar o ácido hipoclorito (HOCl). Os ânions superóxidos também reagem com NO e produzem peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), outra importante ROS (Figura 3) (Griendling *et al.*, 2000).

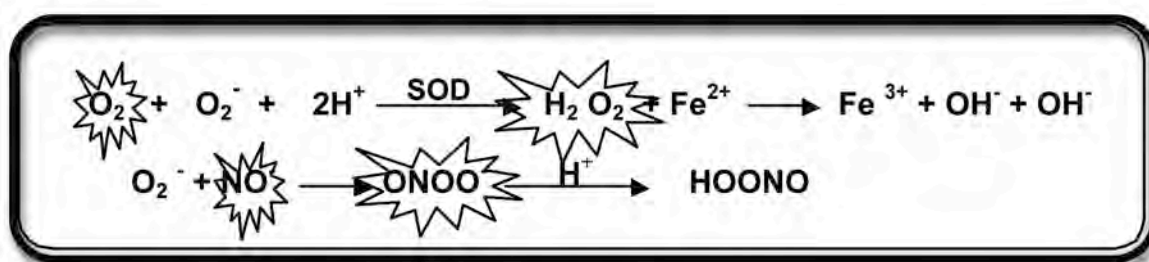
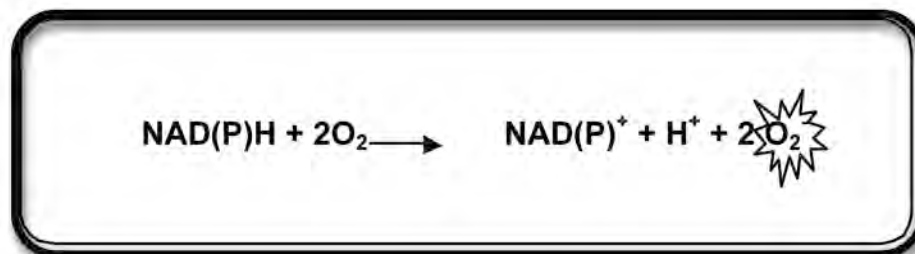


Figura 3. Produção das espécies reativas de oxigênio (ROS).

Griendling e cols, em 1994, foram os primeiros a descobrir que a Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) oxidase são as maiores fontes de ânions superóxidos nas células vasculares e miócitos. As NAD(P)H oxidases no sistema cardiovascular são enzimas associadas à membrana celular que catalizam a redução de um elétron no oxigênio usando um elétron doador de NAD(P)H. Sobre os estímulos de vários agentes, o ânion superóxido é produzido de minutos a horas por células endoteliais e do músculo liso vascular, em contraste com a quase instantânea liberação vista nos neutrófilos (Figura 4). A ativação das oxidases pode se processar através da ação de certos hormônios e de substâncias



vasoativas como Ang II, a trombina e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e ainda mediada por segundos mensageiros, incluindo o cálcio, proteína quinase C (PKC) e metabólitos lipoxigenases do ácido araquidônico (Griendling *et al.*, 2000).



**Figura 4. Produção de ânion superóxido pela NAD(P)H oxidase.**

As principais e mais conhecidas fontes de superóxidos no organismo são a NAD(H)P oxidases presentes tanto nas células endoteliais como no músculo liso vascular. Entretanto, acredita-se hoje que a xantina oxidase (XO) e a óxido nítrico sintase (NOS) também estejam envolvidas no processo de formação de superóxidos (Droge, 2002).

Além disso, os sistemas endógenos antioxidantes são constituídos pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase. Contudo, sabe-se que as moléculas antioxidantes são distribuídas seletivamente dentro de compartimentos subcelulares. Por exemplo, existem três tipos de SOD, as quais podem estar localizadas na mitocôndria (MnSOD), no citoplasma (CuZnSOD) ou no espaço extracelular (ECSOD) (Beyer *et al.*, 1991).

Diferentes modelos experimentais de HA apresentam aumento no estresse oxidativo, incluindo o modelo 2R-1C (Heitzer *et al.*, 1999), 1R-1C (Prewitt *et*

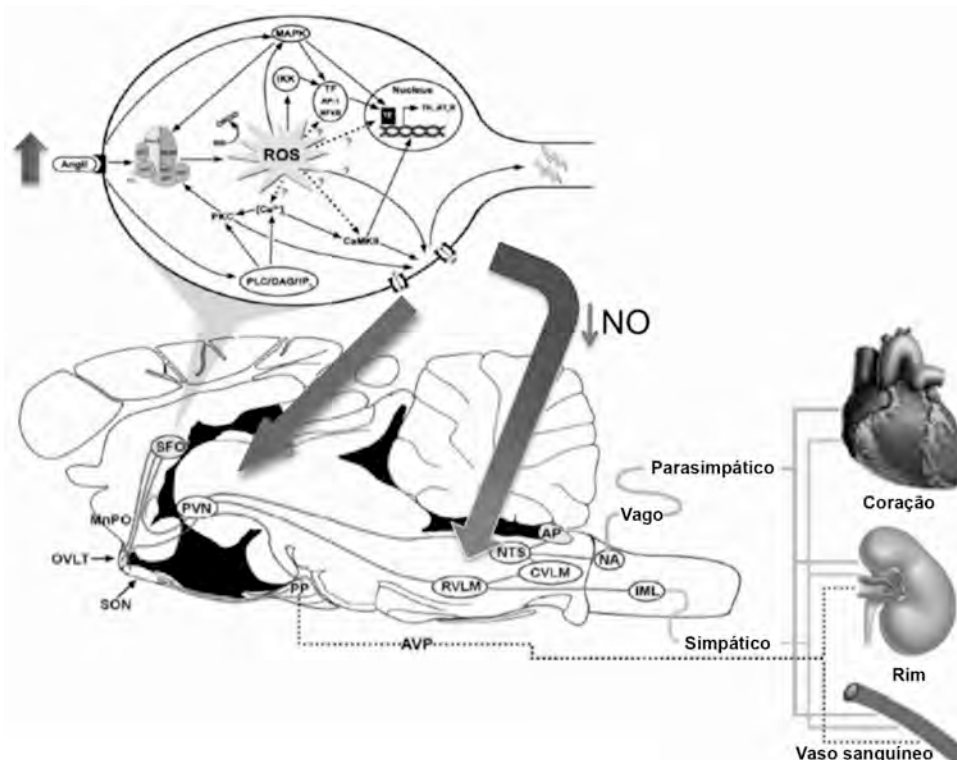
*al.*, 2001), ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Nishikawa *et al.*, 2003; de Champlain *et al.*, 2004), stroke-prone SHR (SHRSP) (Kerr *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001), DOCA-salt (Wu *et al.*, 2001) e hipertensão induzida por infusão de Ang II (Zimmerman *et al.*, 2002; Laplante *et al.*, 2003). Adicionalmente, em seres humanos também foi observada a presença de estresse oxidativo na hipertensão renovascular em adultos (Higashi *et al.*, 2002) e na hipertensão essencial (Duffy *et al.*, 1999).

Lerman e cols., em 2001, demonstraram que no modelo 2R-1C em porcos há um aumento da atividade plasmática de renina e da PA, e esses resultados foram associados ao aumento do estresse oxidativo sistêmico. Além disso, a peroxidação lipídica é marcadamente aumentada em pacientes hipertensos com doença renovascular e isso é em parte devido à ativação do SRAA, e o grande estresse oxidativo envolvido deve-se ao prejuízo da vasodilatação dependente do endotélio nestes pacientes (Higashi *et al.*, 2002). Welch *et al.*, em 2003, verificaram que o estresse oxidativo estava aumentado tanto sistemicamente, como nos rins de ratos 2R-1C, contribuindo como um fator de distúrbio da função renal no rim clipado.

Sabe-se que o estresse oxidativo no modelo renovascular caracteriza-se como um evento chave na HA, uma vez que o mesmo ocorre tanto no coração, como vasos sanguíneos e SNC. Em neurônios, por exemplo, o estresse oxidativo pode ter efeitos excitatórios e/ou nocivos (Dawson e Dawson, 1996). Desta forma, os mecanismos geradores da ANS podem ser desinibidos ou ainda estimulados pela ação dos ânions superóxidos constituindo, portanto, um possível mecanismo para o aumento do tônus vasomotor simpático que acompanha a HA renovascular, outros

mediadores também podem participar da hipertonia simpática. Algumas evidências sugerem, por exemplo, que ao aumentar a formação de Ang II centralmente, um “feedback” positivo pode se estabelecer no qual a Ang II potencializa a sua própria formação, que por sua vez, aumenta a produção de superóxidos, sendo que ambos os fatores podem contribuir para a hipertonia simpática e perpetuação do estado hipertensivo (Zanzinger & Czachurski, 2000).

Entretanto, o exato mecanismo pelo qual o estresse oxidativo modula a atividade de neurônios das regiões RVL e PVN no modelo de HA renovascular é desconhecido. Nossa hipótese é de que no modelo de hipertensão renovascular 2R-1C, o aumento na Ang II, via receptor AT-1, tanto na região RVL como no PVN, pode aumentar a atividade de NAD(P)H oxidase, gerando um aumento na produção de superóxido intracelular o qual resulta numa diminuição na biodisponibilidade de NO com conseqüente aumento da descarga de neurônios pré-motores do simpático levando à hiperatividade simpática com conseqüente aumento dos níveis tensionais **(Figura 5)**.



**Figura 5. Hipótese de como o estresse oxidativo modula as regiões RVL e PVN.**

(Figura adaptada de Infanger DW, Sharma RV, Davisson RL. *NADPH Oxidases of the Brain: Distribution, Regulation, and Function. Antioxi Redox Signal.* 2006, 8(9-10): 1583-1596).

Sabe-se que a NAD(P)H oxidase é composta por duas subunidades de membrana (gp91phox e p22phox) e muitas subunidades citoplasmáticas (p47phox, p40phox e p67phox). Após a estimulação de receptor AT-1 pela Ang II, as subunidades citoplasmáticas se ligam as subunidades da membrana e ativam a enzima, resultando na produção do ânion superóxido (Lassegue & Clempus, 2003).

Diante disso, outro objetivo da presente Tese foi investigar se há um desequilíbrio entre a produção de superóxidos e o sistema antioxidante endógeno caracterizando um estado de estresse oxidativo, nas regiões RVL e PVN no período de estabilidade da hipertensão 2R-1C. Para isto, analisamos a expressão gênica das

subunidades da NAD(P)H oxidase (p47phox e gp91phox) e CuZnSOD nas regiões pré-motoras do simpático – RVL e PVN.

Evidências recentes de nosso laboratório mostraram que a microinjeção de um antioxidante, Vitamina C (Vit C), na região RVL resultou numa hipotensão e simpato-inibição nos animais hipertensos (2R-1C) (Oliveira- Sales *et al.*, 2008). Além disso, outros estudos demonstraram que a administração oral de 4-hidroxi-2, 2, 6, 6-tetrametilpiperidina 1 – oxil - (Tempol), uma molécula permeável à membrana superóxido dismutase (SOD) mimético, reduziu a PA, a resistência da insuficiência renal vascular e a excreção urinária de 8-isoprostaglandina F<sub>2</sub>α (um marcador de estresse oxidativo) em ratos SHR (Schnackenberg *et al.*, 1998; Schnackenberg & Wilcox, 1999). Portanto, na presente Tese avaliamos se o estresse oxidativo está envolvido na manutenção da atividade vasomotora simpática e da hipertensão no período de estabilidade de pressão no modelo 2R-1C, utilizando o agente antioxidante Tempol administrado de maneira direta nas regiões RVL e PVN, e sistemicamente.

Além de investigar o papel agudo do estresse oxidativo na manutenção da hipertensão 2R-1C, também foi analisado se a inibição crônica de superóxidos na região RVL previne o desenvolvimento da hipertensão 2R-1C. Para isto, foi utilizado um adenovírus para super expressão CuZnSOD (Cobre-Zinco superóxido dismutase citoplasmática) administrado na região RVL.

Zimmerman e cols., em 2002, utilizando administração intracerebroventricular tanto de Ad-MnSOD (Adenovírus que super expressa a manganês superóxido dismutase na mitocôndria) or Ad-CuZnSOD (Adenovírus que

super expressa a cobre-zinco superóxido dismutase no citoplasma) preveniram a resposta pressora induzida pela Ang II. Além disso, estudos demonstraram que a transfecção de adenovirus MnSOD na região RVL promove hipotensão e bradicardia em ratos SHRSP. Adicionalmente, não foram observadas alterações nos parâmetros cardiovasculares nos animais Wistar-Kyoto (Kishi *et al.*, 2004).

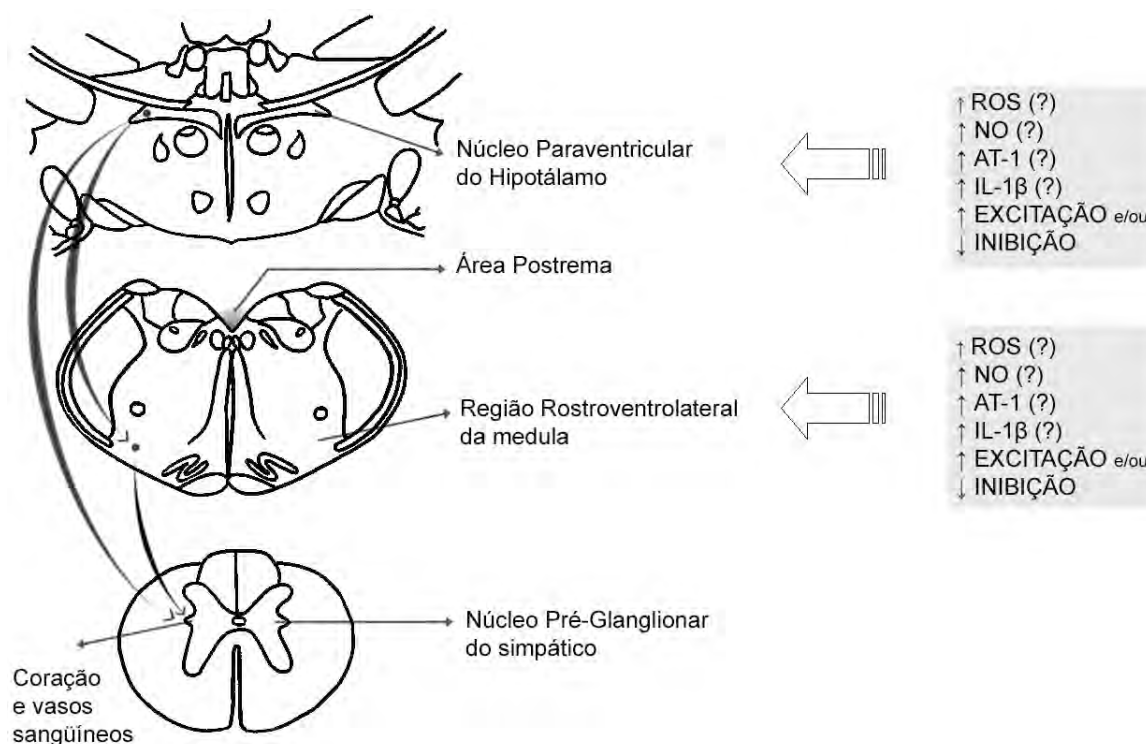
Muitos agentes antioxidantes têm sido usados para combater o estresse oxidativo, entre eles, o ácido ascórbico (Vit C). A Vit C é hidrossolúvel e proveniente da dieta. Ela possui um elétron doador, o qual é doado em situações de potencial redox baixo. Seu efeito protetor é de amplo espectro e atinge radicais superóxido, peróxil, hidroxil, oxigênio singlete e peroxinitrito (Rice, 2000). Taddei e cols, em 1998, avaliaram os efeitos da administração crônica da Vit C em pacientes hipertensos essenciais e concluíram que essa terapia melhora a função endotelial, provavelmente por destruir os radicais livres nos vasos sanguíneos.

Contudo, uma das dificuldades para se utilizar a Vit C como antioxidante em patologias que envolvem disfunções do SNC é a quase total incapacidade da Vit C de atravessar a barreira hemato-encefálica. Já a sua forma oxidada, o ácido dehidroascórbico (DHA) atravessa rapidamente a barreira por transporte facilitado (Huang *et al.*, 2001). Segundo Agus (1997), a Vit C é a forma predominante no sangue, a qual é oxidada em DHA no tecido intersticial. A oxidação é a principal etapa no processo de transporte da Vit C. O DHA é transportado através de transportadores de glicose (Glut-1) nas células endoteliais da barreira hemato-encefálica e no cérebro ele é então reduzido a Vit C, ficando retido neste local por não poder ser transportado através do Glut-1.

Recentemente, estudos em nosso laboratório demonstraram que a Vit C administrada endovenosamente provoca uma significativa hipotensão e simpato-inibição nos animais hipertensos (2R-1C) (Oliveira-Sales *et al.*, 2008). Entretanto, os efeitos do tratamento crônico de Vit C nestes parâmetros ainda não são conhecidos. Nesse sentido, a presente Tese destinou-se também à esclarecer esta questão. Além disso, também foi investigado se o tratamento crônico com Vit C interfere nos mecanismos centrais no período de estabilidade da hipertensão 2R-1C. Para isso, a expressão gênica das subunidades da NAD(P)H oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD, AT-1 e transportador Glut-1 nas regiões pré-motores do simpático – RVL e PVN foram analisadas após o tratamento.

Sabe-se que há uma complexa relação entre citocinas, NO e ANS. Um possível mediador para o aumento da expressão de NO é a IL-1 $\beta$  (Pollock, 2005). As citocinas inflamatórias aumentam a expressão da iNOS nas células da microvasculatura cerebral de ratos, como nas células das vias respiratórias, do músculo esquelético, células mesangiais e células endoteliais. Estudos em cérebros de ratos com insuficiência renal crônica (CRF) evidenciaram que a IL-1 $\beta$  pode ativar NO no cérebro e modular a atividade SNS via regulação da expressão local de nNOS (Ye *et al.*, 2000). Em 2004, Campese e cols. sugeriu que a ação estimulatória da Ang II sobre o SNS pode ser mediada pela inibição da expressão de IL-1 $\beta$  e nNOS em regiões do SNC. Diante disso, foi investigada a expressão gênica de IL- $\beta$ , iNOS e nNOS nas regiões RVL e PVN no período de estabilidade da hipertensão 2R-1C e posteriormente foi verificado se o tratamento crônico com Vit C interfere nesses resultados.

Em suma, como descrito anteriormente, considerando que a HA renovascular 2R-1C é um modelo Renina-Angiotensina dependente, nossa hipótese é que a Ang II ao atuar na tanto na região RVL como no PVN, pode aumentar a atividade de NAD(P)H oxidase, gerando um aumento na produção de superóxido intracelular o qual resulta numa diminuição na biodisponibilidade de NO com conseqüente hiperatividade simpática e aumento da PA no modelo em questão. Adicionalmente, as possíveis contribuições do receptor AT-1 e do NO nas regiões RVL e PVN no modelo 2R-1C foram avaliadas (**Figura 6**).



**Figura 6. Hipóteses testadas nesta Tese.**

(Adaptado de Dampney RAL. *Fuctional Organization of Central Pathways Regulation the Cardiovascular System. Physiological Reviews. 74(2): 323-364, 1994*).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

A presente Tese teve como objetivo avaliar os mecanismos geradores da atividade vasomotora simpática na hipertensão arterial renovascular. Principalmente, o papel do estresse oxidativo nos núcleos geradores da atividade vasomotora simpática, ou seja, região RVL e PVN. Como há interação entre estresse oxidativo, sistema angiotensinérgico e óxido nítrico, o papel desses dois mediadores também foi avaliado.

### **2.2. Objetivos específicos**

1- Caracterizar a função autonômica cardiovascular por meio de análise espectral de medidas de pressão arterial e de intervalo de pulso obtidos por um sistema de rádio telemetria durante seis semanas de evolução da hipertensão renovascular nos ratos acordados;

2- Avaliar se a Ang II (via receptor AT-1) e o NO (produzido pela iNOS) na região RVL, participam na manutenção da pressão arterial e da atividade simpática nos animais com hipertensão renovascular (2R-1C) já estabelecida (após 6 semanas);

3- Determinar se há um desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, ou seja, um estado de estresse oxidativo nas regiões RVL e PVN dos

animais 2R-1C por meio de técnicas de biologia molecular e investigar funcionalmente se o Tempol administrado diretamente nestas regiões ou sistemicamente reverte a hipertensão e a hiperatividade simpática nos animais com hipertensão renovascular (2R-1C) já estabelecida (após 6 semanas);

4- Avaliar se a inibição de ânions superóxidos (pela transfecção do adenovírus que super expressa a CuZnSOD) na região RVL previne o aumento da pressão arterial no início do desenvolvimento da hipertensão renovascular (2R-1C) (após 3 semanas);

5- Investigar se o tratamento crônico com Vit C reverte a hipertensão e a hiperatividade simpática nos animais com hipertensão renovascular (2R-1C) já estabelecida e se esse tratamento produz modificações na expressão de RNA mensageiro das subunidades da NAD(P)H oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD, receptor AT-1, nNOS, iNOS, IL1 $\beta$  e Glut-1 nas regiões específicas RVL e PVN.

### 3. METODOLOGIA

Esta Tese foi realizada na disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Escola Paulista de Medicina e também, como parte do programa Sanduíche, na Universidade de Bristol, Inglaterra.

Como já citado na introdução com a finalidade de respondermos a questões específicas, os experimentos foram divididos em séries e a metodologia utilizada para cada série será descrita a partir do item **3.3**.

#### 3.1. Animais

Para o estudo de biologia molecular e o estudo funcional em ratos anestesiados realizados na UNIFESP foram utilizados ratos Wistar (250 a 300g) provenientes do Biotério Central da UNIFESP (CEDEME) e o protocolo experimental foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética da UNIFESP (Processo: CEP 0962/06). Os animais foram mantidos em salas especiais com ciclo claro/escuro controlado (12/12 hs), ração padrão (Nuvital<sup>®</sup>) e água *ad libitum*.

Para a realização dos experimentos com rádio telemetria foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 150 a 180 g, provenientes da B & K, Bristol, Reino Unido sendo que o protocolo experimental foi aprovado pelo United Kingdom Home Office Guidelines on Animals (Scientific Procedures) Act of 1986 (Project Licence: 30/2152).

### 3.2. Indução de Hipertensão arterial

Neste trabalho foi utilizado o modelo de hipertensão renovascular proposto por Goldblatt – 2 Rins, 1 Clipe (2R-1C) (Goldblatt *et al.*, 1934). Ratos Wistar (150 a 180 g) foram anestesiados com Xilazina (Sedafarm, Farmabase Saúde Animal Lta, Brasil - 20 mg/ kg) e Ketamina (Agener, União, Brasil - 40 mg/ Kg), intraperitonealmente (IP). A seguir uma incisão cirúrgica foi realizada para localização e isolamento da artéria renal esquerda, a qual foi cuidadosamente separada do tecido conectivo e respectiva inervação. Uma vez isolada esta artéria foi parcialmente ocluída pela colocação de um clipe de prata (0,2 mm de abertura). Esta oclusão reduziu o fluxo renal em cerca de 50% (Lupu *et al.*, 1972) e promoveu uma condição necessária para que se desenvolvesse a hipertensão. Ratos submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém, sem oclusão parcial da artéria renal (cirurgia fictícia) foram considerados como animais controles (Sham).

### 3.3. 1ª SÉRIE DE EXPERIMENTOS: Estudo das variações cardiovasculares e autonômicas no modelo 2R-1C

Esta série de experimentos teve por objetivo analisar a evolução temporal das variáveis cardiovasculares bem como, a função autonômica cardiovascular por meio de análise da densidade espectral de medidas de pressão arterial (PA) e intervalo de pulso (IP) obtidos por um sistema de rádio telemetria. Esta determinação foi realizada durante as seis semanas subsequentes à oclusão da artéria renal como mostrado na **Figura 7**.



**Figura 7. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação das variações cardiovasculares e autonômicas no modelo 2R-1C.**

Os grupos experimentais realizados foram:

I – Grupo Sham: animais controles (n = 6), os quais foram submetidos à cirurgia fictícia;

II – Grupo 2R-1C: animais hipertensos (n = 6), aos quais se implantou o clipe na artéria renal.

### **3.3.1. Implante dos radiotransmissores de telemetria**

Os radiotransmissores (TA11PAC40; Data Sciences Intl., St. Paul, MN, EUA) foram implantados no mesmo dia em que foi realizada a cirurgia para indução da hipertensão arterial. A temperatura corporal foi mantida em 37° C por meio de um sistema servo-controlado (Letica Scientific Instruments). O abdômen foi tricotomizado e a assepsia realizada com aplicação de etanol 70%. Os animais foram submetidos à laparotomia ventral mediana e após o afastamento das alças intestinais, a aorta abdominal foi visualizada e cuidadosamente isolada. Posteriormente, uma tensão foi realizada na artéria através de uma linha colocada na parte superior da aorta

abdominal e rapidamente colocado um pequeno oclisor próximo a linha para obstrução do fluxo sanguíneo. Com uma agulha (21 gauge) foi realizada uma abertura na artéria aorta e rapidamente a cânula do transmissor foi inserida e mantida com auxílio de uma bandagem de celulose (Cellulose Patch, Data Sciences Intl., St. Paul, MN, EUA) e uma cola tecidual de secagem rápida (Vetbond™, 3M Animal Care Products, St. Paul, MN, EUA). A linha e o oclisor foram removidos. As alças intestinais foram recolocadas na cavidade abdominal e o transmissor foi suturado na musculatura da parede ventral abdominal. As incisões cirúrgicas também foram suturadas e doses profiláticas de antibiótico (penicilina G, 150.000 UI kg<sup>-1</sup>, IM; AgriLabs, St. Joseph, MO, EUA) foram administradas após a cirurgia e a anestesia foi revertida com Atipamezole (1 mg/ kg). Os animais foram colocados nas suas respectivas gaiolas para se recuperarem (Waki *et al.*, 2003).

### **3.3.2. Análise espectral da pressão arterial**

A PA foi registrada pelo sistema de telemetria (Data Sciences Intl., St. Paul, MN, EUA). O sistema - *Hey Presto* software (Mizuno software, Miyagi, Japan), descrito anteriormente por Waki e cols, em 2006, foi utilizado para adquirir, armazenar e analisar os dados.

Basicamente, o *Hey Presto* software utilizou os valores de IP e de pressão arterial sistólica (PAS) para determinar a variabilidade de frequência cardíaca (FC) e de PA, respectivamente. As variabilidades foram analisadas por meio de uma frequência de amostragem de 5 minutos a cada hora durante as 24 horas do dia, durante seis semanas. Os IP e PAS foram determinados numa frequência de 10 Hz a cada 100 ms e o tempo das séries geradas (ex. IP vs tempo) foram adquiridos de dados de 512 pontos sobrepostos pela metade de um sobre

outro, a aquisição foi feita em 4 KHz . Cada um desses valores foi convertido em frequência de distribuição (por meio da janela de Hanning) para, posteriormente, as variações espectrais da PA e de IP por meio do método de transformada rápida de Forrier (Fast Fourier transform, FFT) serem calculadas. Foram utilizadas 3 faixas de frequência de aquisição: alta frequência (HF): 0,75 – 3,0 Hz, baixa frequência (LF): 0,25 – 0,75 Hz e muito baixa frequência (VLF): 0,01 – 0,25 Hz.

O aumento na atividade simpática parece estar associado com o aumento do componente LF em relação ao IP (LF(IP)), assim como o HF (IP) representa sobretudo, um índice da modulação parassimpática cardíaca (Pagani *et al.*, 1986; Montano *et al.*, 1992; 1998 e 2001; Malliani *et al.*, 1997 e 2006). Além disso, a LF em relação à variabilidade da PAS (LF(PAS)) indica uma modulação da atividade vasomotora simpática (deBoer *et al.*, 1987) e mudanças na VLF (PAS) representam a modulação gerada por diversos mecanismos, como pelo sistema simpático, termorregulação, atividade hormonal ou mudanças no fluxo sanguíneo para o local de maior demanda metabólica (Cerutti *et al.*, 1991).

O ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco (GRBe) foi medido através da sensibilidade reflexa do IP em responder às mudanças de PAS (Oosting *et al.*, 1997). A unidade utilizada para GRBe foi ms/ mmHg, uma vez que são necessários muitos milissegundos de mudanças de IP para haver mudança de um 1 mmHg. O GRBe foi calculado, tanto de IP quanto de FC, para demonstrar as diferenças entre eles e comparar com os estudos os quais utilizam apenas um ou outro parâmetro. Como a FC é derivada do IP, eles compartilham uma relação hiperbólica, ao serem plotados um contra o outro. Essa relação tem gerado um debate na literatura a respeito da validação de se usar, tanto um quanto outro parâmetro, na interpretação da função reflexa do barorreceptor (De Burgh Daly,

1997; Lee *et al.*, 2003). Em particular, a avaliação do reflexo barorreceptor depende de qual parâmetro foi utilizado (IP ou FC) (Crandall, 2000; Iwasaki *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003). Contudo, estudos *in vivo* têm confirmado que IP varia de maneira diretamente proporcional à estimulação vagal (Katona *et al.*, 1970; Parker *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 2003). Nesse sentido, parece que a variabilidade do IP é uma boa indicação da atividade vagal sobre o coração e possibilita uma interpretação mais adequada da sensibilidade reflexa do barorreceptor.

### **3.3.3. Análise estatística**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  Erro Padrão e analisados usando ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Tukey's por meio do software Graphpad Prism 4.0 (San Diego, CA, EUA). Apenas foram considerados estatisticamente significantes valores de  $P < 0,05$ .

## **3.4. 2ª SÉRIE DE EXPERIMENTOS: Avaliação molecular e funcional de receptores AT-1 e de iNOS na região RVL em animais 2R-1C e sham**

Nesta série de experimentos foram realizados dois protocolos distintos. Primeiro, um estudo molecular foi realizado para avaliar a expressão gênica e protéica do receptor AT-1 e iNOS na região RVL. Em todos os protocolos desta série, os experimentos foram realizados na sexta semana após a colocação do clipe no grupo 2R-1C ou cirurgia fictícia no grupo sham (**Figura 8**).



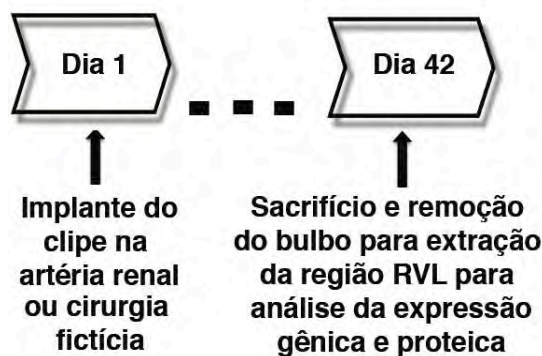


Figura 8. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação da expressão gênica e proteica do receptor AT-1 e de iNOS na região RVL de ratos 2R-1C e sham.

Os grupos experimentais do estudo molecular realizados foram:

I – Grupo Sham: animais controles (n = 5);

II – Grupo 2R-1C: animais hipertensos (n = 5).

Posteriormente, em outro grupo de animais, um estudo funcional analisou as possíveis variações cardiovasculares e de atividade nervosa simpática renal (ANSR) em animais anestesiados durante nanoinjeções bilaterais de Losartan (10 nmol/ 100 nL, Fluka Analytical, China) (Dampney *et al.*, 2002), antagonista de receptor angiotensinérgico subtipo AT-1, na região RVL (**Figura 9**).

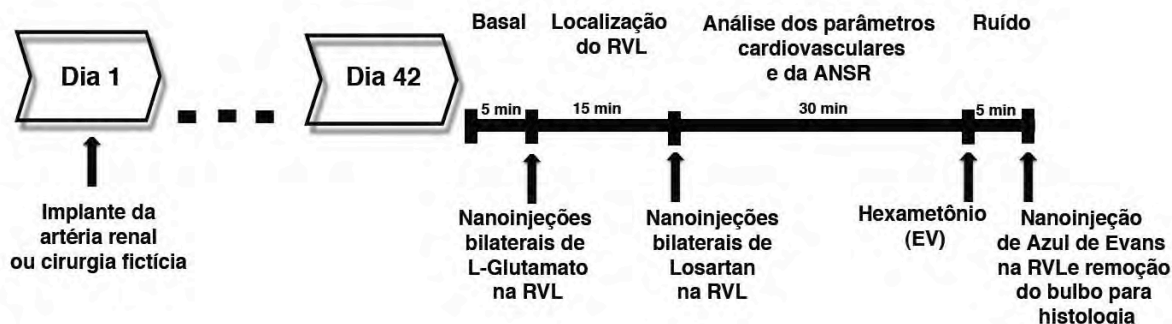


Figura 9. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação das respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Losartan na região RVL nos animais 2R-1C e sham anestesiados.

Os grupos do estudo funcional com Losartan foram:

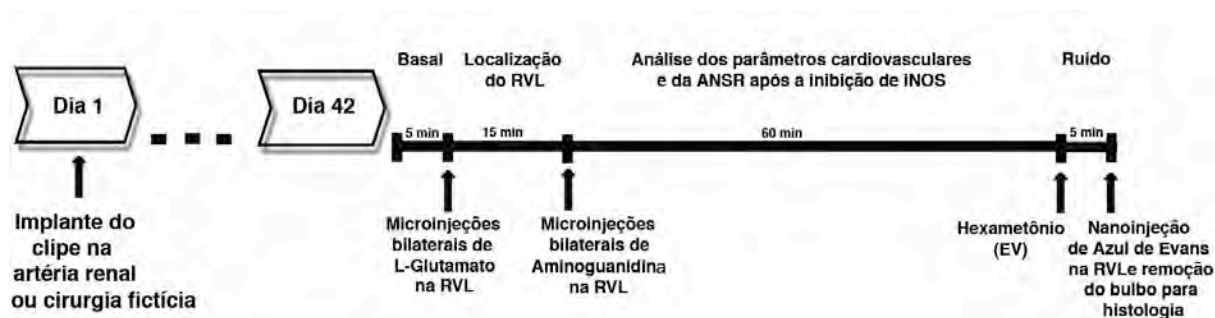
I - Grupo Sham + Losartan (10 nmol/ 100 nL) nanoinjetado bilateralmente na RVL nos animais sham (n = 4);

II - Grupo 2R-1C + Losartan (10 nmol/ 100 nL) nanoinjetado bilateralmente na RVL nos animais hipertensos (n = 5);

III - Grupo Sham + Salina nanoinjetado bilateralmente na RVL nos animais sham (n = 5);

IV - Grupo 2R-1C + Salina nanoinjetado bilateralmente na RVL nos animais hipertensos (n = 5);

Além disso, em outro grupo de animais, nanoinjeções bilaterais de Amoniguanidina (250 pmol/ 100 nL, Sigma, EUA) (Kimura *et al.*, 2005), inibidor específico da iNOS, também foram realizadas na região RVL em animais anestesiados (**Figura 10**).



**Figura 10.** Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação das respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina na região RVL nos animais 2R-1C e sham anestesiados.

Os grupos experimentais realizados foram:

I - Grupo Sham + Aminoguanidina (250 pmol/ 100 nL) nanoinjetado bilateralmente na RVL nos animais sham (n = 4);

II - Grupo 2R-1C + Aminoguanidina (250 pmol/ 100 nL) nanoinjetado bilateralmente na RVL nos animais hipertensos (n = 3);

#### **3.4.1. Extração de RNA (*Punches*)**

Para confirmar o estado hipertensivo dos animais para o estudo molecular, a PA foi medida através da técnica de pletismografia de cauda (BP-98A; Softron, Tokyo, Japan), considerando-se hipertensos os animais com pressão de cauda maior que 140 mmHg. Posteriormente, os ratos foram anestesiados com Xilazina (Sedafarm, Farmabase Saúde Animal Lta, Brasil - 20 mg/ kg) e Ketamina (Agener, União, Brasil - 40 mg/ Kg), IP e rapidamente os cérebros foram removidos. Os bulbos foram dissecados e mantidos em gelo seco. Uma secção foi realizada entre 11,8 – 13,3 mm em relação ao Bregma e a parte contendo a região RVL foi identificada através do microscópio cirúrgico (x 40 magnitude) segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1986). *Punches* bilaterais da região RVL foram retirados com um instrumental apropriado de 0,5 mm de diâmetro e adicionados a uma solução de TRITON 10X e RNAsin e acondicionados em freezer -80° C. Em cada amostra foi inserido material da região RVL de três animais. A confirmação do local dos tecidos extraídos foi realizada posteriormente com a análise histológica do bulbo.

### **3.4.2. Comprovação histológica da região RVL após a retirada do punches**

Após a retirada dos *punches* da região RVL, o material foi seccionado coronalmente (40  $\mu\text{m}$ ) em um criostato e montado em lâminas para posterior coloração com vermelho neutro. Quando o tecido retirado estava localizado ventralmente ao núcleo ambíguo e lateralmente ao núcleo olivar inferior, a histologia foi considerada positiva para a região RVL.

### **3.4.3. RT – PCR**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que permite que o ácido nucléico-alvo seja especificamente selecionado e amplificado por milhares de vezes. Para tal, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através do RNA total, utilizando a enzima transcriptase reversa (TR). O cDNA foi preparado a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total com o uso de kit apropriado (RT Superscript II, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e tratado com DNase para eliminação de contaminação com DNA genômico contaminante (kit RQ1 RNase-Free DNase, Promega, Madison, Wi, EUA). Uma alíquota de cDNA foi combinada a *primers* específicos para as moléculas de interesse, além do kit PCR Master Mix, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As moléculas de interesse neste protocolo foram as do receptor AT-1 e iNOS. O PCR semiquantitativo foi realizado em um termociclador (MJ Research Inc. Watertown, Massachusetts, EUA), disponível na Disciplina de Nefrologia/ (UNIFESP). A especificidade do produto gerado foi confirmada por eletroforese em gel de agarose convencional. O cDNA obtido foi então utilizado na reação de PCR em tempo real para amplificar fragmentos específicos de cada gene de interesse. Para tanto, foram sintetizados *primers* específicos para cada molécula. Em cada

reação de PCR foram amplificados, além do cDNA das amostras, uma amostra contendo água em substituição ao cDNA, servindo como controle negativo para exclusão de contaminação exógena. Para controle da presença e qualidade do cDNA, 2  $\mu$ L de todas as amostras eram previamente submetidas à amplificação utilizando-se *primers* específicos para  $\beta$ -actina, resultando em um produto de 191 pares de bases (pb). Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 2% (Sigma Aldrich – EUA) e visualizados em luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio. Apenas foram consideradas as amostras que apresentaram bandas visíveis no gel.

#### **3.4.4. Obtenção dos Primers**

Os *primers* utilizados na reação de PCR foram construídos com base nas seqüências de cDNA de receptor AT-1, iNOS e  $\beta$ -actina de rato, obtidas através do banco de dados Genbank. Os *primers* foram desenhados utilizando *software* (PCR-designer, Research Genetics, EUA) e adquiridos da WMED- World Medical Representation SC Ltda (SP-Brasil). As seqüências para cada molécula foram:

**Tabela 1. Sequências de *primers* do receptor AT-1, iNOS e  $\beta$ -actina para PCR quantitativo em Tempo Real**

Gene	Primer	Sequência (5' to 3')	Produto (bp)	Temp. de Anelamento
AT-1	5'	ATG-CCA-GTG-TGT-TTC-TGC-TC	244	58°C
		CCA-ATG-GGG-AGT-GTT-GAG-TT		
iNOS	5'	AGG-TGT-TCA-GCG-TGC-TCC-AC	114	57,9°C
		AGT-TCA-GCT-TGG-CGG-CCA-CC		
$\beta$ -actina	5'	CCT-CTA-TGC-CAA-CAC-AGT-GC	191	56,9°C
		ACA-TCT-GCT-GGA-AGG-TGG-AC		

### **3.4.5. RT- PCR em Tempo Real**

Após a detecção das moléculas de interesse pela técnica de RT-PCR convencional, o nível de expressão dos RNAs mensageiros de cada grupo foi estimado pelo PCR quantitativo em tempo real utilizando o aparelho Rotor Gene 600 (Uniscience, Austrália), que foi desenvolvido para detectar a expressão gênica com alta especificidade e sensibilidade. O cDNA foi sintetizado à partir de 2 µg do RNA total extraído de cada grupo. O produto obtido pelo PCR em tempo real foi monitorado usando um corante fluorescente SYBR Green I (Molecular Probes Inc, EUA), o qual exibe uma alta fluorescência quando está ligado à dupla fita de DNA. A expressão relativa do gene foi calculada usando os estágios iniciais do PCR, durante a fase logarítmica de amplificação, podendo ser correlacionado ao número de cópias iniciais da transcrição do gene. Foram utilizados em média 40 ciclos, dependendo do *primer*, onde o platô de amplificação pode ser observado em todas as amostras. As condições de reação foram previamente estabelecidas pelo PCR convencional. A fluorescência para cada ciclo foi analisada quantitativamente pelo Rotor Gene 600 (Uniscience, Austrália), Ao final de cada corrida a temperatura foi aumentada de 60 a 95°C numa proporção de 2°C/ min, e a fluorescência foi mensurada durante 20 segundos para a construção da curva de desacoplamento. Uma amostra sem cDNA foi adicionada em cada ensaio. A quantidade relativa de RNAm de cada amostra foi estimada usando-se um padrão de referência calculado à partir do grupo controle como a média do número de ciclos determinados pelo “*threshold*” de todas as amostras. Os resultados para os experimentos de cada grupo foram corrigidos pela expressão de β-actina (191 pb), a qual foi utilizada como controle endógeno positivo e expressos em unidades arbitrárias. A análise da expressão gênica dos dados

individuais obtidos pelo PCR em tempo real foi realizada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrito por Livak & Schmittgen, em 2001.

#### **3.4.6. Avaliação da expressão protéica por Western Blotting**

O total de proteína retirado de *punches* da região RVL foi aplicado em um gel 8% de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Bio-Rad). Em seguida foi realizada a transferência para membrana de nitrocelulose 0,20 mm e prosseguiu-se bloqueando com Leite 5% por 6 horas. A incubação com os anti-AT-1 Dy800 (1:100 000), anti-iNOS (1:1200) e anti- $\beta$  actina (1:1000) foram realizada a 4°C por 18h. A revelação das membranas foi realizada utilizando-se de anticorpo secundário marcado com fluorófilo (700 ou 800 nm). A densidade fluorimétrica foi medida utilizando o equipamento e software Odyssey (Li-Cor Biosciences, EUA).

Foram utilizados os anticorpos anti-AT1 (Proteimax Biotecnologia Ltda, Cotia, Brasil), anti-iNOS(GenTex Inc) e anti- $\beta$  actina (Proteimax Biotecnologia Ltda, Cotia - Brasil). E como anticorpo secundário, anti-Igg de coelho marcado com fluorescência (700 nm) na diluição de 1:10.000. O material extraído foi processado utilizando-se a técnica de imunoblotting (IB).

#### **3.4.7. Instrumentação cirúrgica para aquisição dos parâmetros cardiovasculares**

Para realização do estudo funcional, os animais hipertensos e sham foram submetidos à cateterização artério-venosa para registro de PA e infusão de



drogas, respectivamente seis semanas após a cirurgia para indução da hipertensão arterial ou sham. Utilizando cateteres constituídos por tubos de polietileno PE-10 e PE-50 (Clay Adams, Parsipanny, NJ, USA) soldados. A artéria e a veia femorais foram canuladas em animais anestesiados com Xilazina (Sedafarm, Farmabase Saúde Animal Lta, Brasil - 20 mg/ kg) e Ketamina (Agener, União, Brasil - 40 mg/ Kg), IP. Após acordarem da anestesia, os animais foram colocados em gaiolas individuais e vinte quatro horas depois submetidos aos experimentos funcionais sob anestesia com uretana (nanoinjeções centrais).

#### **3.4.8. Registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC)**

A PA foi registrada “on line” através de uma placa analógico-digital PowerLab (PowerLab - ADInstruments, Austrália). A PAM e a FC foram obtidas a partir do sinal de PA. A frequência de aquisição foi de 2 KHz.

#### **3.4.9. Nanoinjeções na região RVL**

Após 24 horas da canulação artério-venosa, os animais foram anestesiados, lentamente, com uretana (etil carbamato, Sigma, EUA) 1,4 g/kg, endovenosamente (EV) para realizar as nanoinjeções bilaterais na região RVL. A traqueostomia foi realizada a fim de reduzir a resistência das vias aéreas superiores, facilitar a remoção de secreções e para que o ar inspirado fosse enriquecido com oxigênio 100%. A temperatura corporal foi mantida em 37° C por meio de um sistema servo-controlado (Letica Scientific Instruments, USA).

Posteriormente, os animais foram posicionados em decúbito ventral em aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA), com barra

nasal 11 mm abaixo da linha interaural. A musculatura da nuca foi rebatida, expondo-se o osso occipital e a membrana atlanto-occipital. Com auxílio de um osteomo o osso occipital foi removido e a dura-máter rebatida, sendo exposto assim o *calamus scriptorius*, o qual foi utilizado como ponto de referência para as coordenadas estereotáxicas. As coordenadas para a região RVL utilizadas foram obtidas e modificadas a partir do Atlas de Paxinos & Watson (1998):

**Antero - Posterior** = 3 mm rostro-caudal ao *calamus scriptorius*

**Lateral** = 1,8 mm lateral ao *calamus scriptorius*

**Ventral** = 3 mm ventral ao *calamus scriptorius*

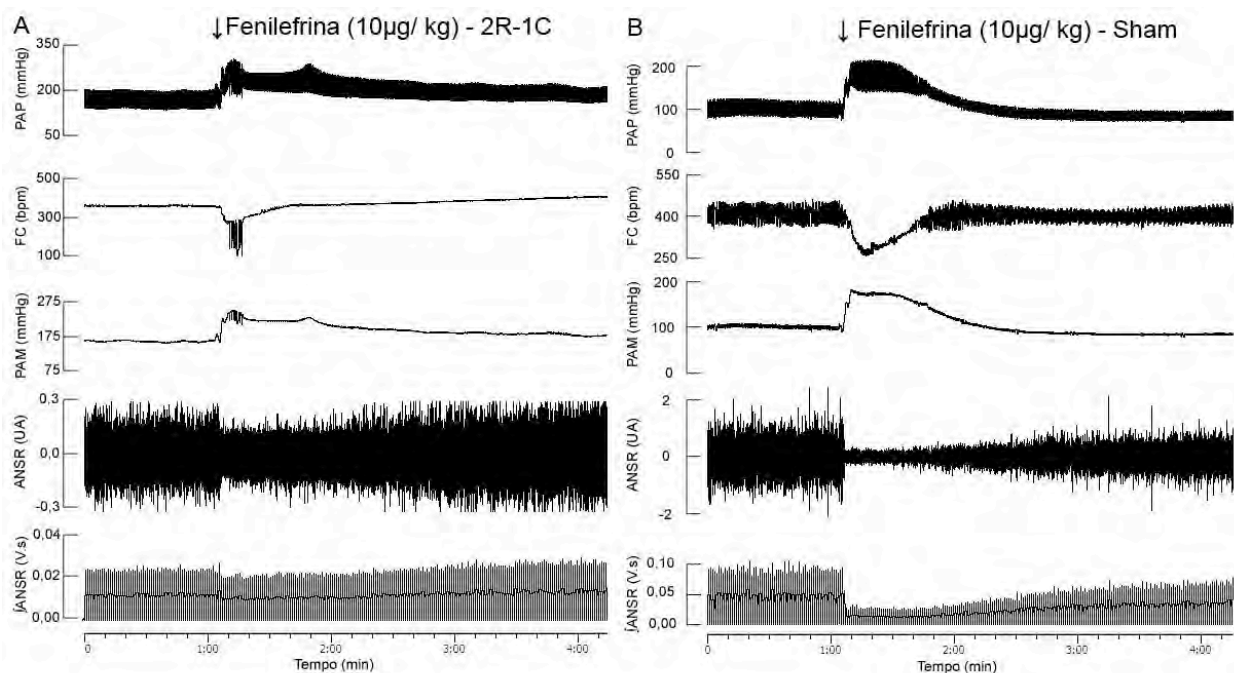
As nanoinjeções foram realizadas por meio de micropipetas de vidro com pontas de 10 a 20  $\mu\text{m}$ , obtidas a partir de estiramento por aquecimento (David Kopf Instruments, UK). As drogas foram nanoinjetadas por pressão com nitrogênio 20 PSI (Channel pressure injector – Micro Data Instruments – EUA). As nanoinjeções de glutamato (10 nmol) (Horiuchi *et al.*, 2004), de Losartan (10 nmol) (Dampney *et al.*, 2002) e de Aminoguanidina (250 pmol) (Kimura *et al.*, 2005) na região RVL foram feitas bilateralmente em um volume de 100 nL e realizadas em aproximadamente 10 segundos. A primeira droga a ser injetada na região RVL sempre foi o Glutamato para localização da área, apenas aumentos superiores a 30 mmHg foram considerados localização positiva.

Ao final dos experimentos foram feitas nanoinjeções de Azul de Evans 2% (100 nL) para localização e validação histológica do sítio de injeção.

#### **3.4.10. Aquisição e análise da atividade nervosa simpática renal (ANSR)**

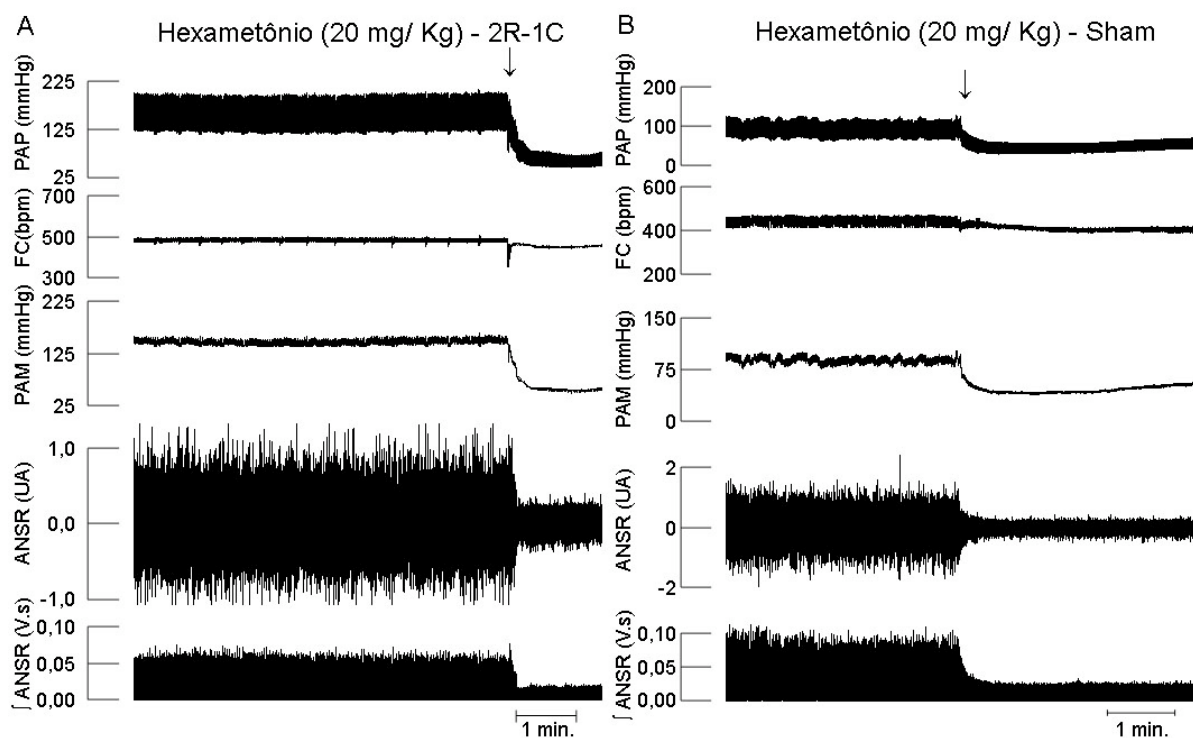
Para o registro da ANSR, uma incisura retroperitoneal esquerda foi realizada para expor o nervo simpático renal. O nervo foi cuidadosamente dissecado e separado da artéria e veia renal e demais tecidos adjacentes. Após dissecação o nervo renal foi posicionado sobre um eletrodo de platina em uma configuração bipolar sendo mantido imerso em óleo mineral durante todo o experimento. O registro foi sempre realizado na junção entre as artérias renal e aorta. O sinal do nervo renal foi visualizado com auxílio do osciloscópio (Tektronix TDS 220) e o ruído da atividade avaliado em um amplificador de áudio. A atividade do nervo foi amplificada 20.000 vezes (Neurolog, UK) usando-se um filtro com faixa de frequência de 50 a 1.000 Hz. Durante os experimentos, a atividade simpática foi retificada e integrada *on line*. Todos os registros foram adquiridos em frequência de amostragem de 2 KHz.

O nervo renal foi caracterizado quanto a sua barossensitividade em resposta a injeções em bôlus de fenilefrina (10 µg/ kg) (**Figura 11**).



**Figura 11.** Traçado representativo das respostas de pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade simpática renal (IANSR) à administração endovenosa de Fenilefrina (10 µg/kg) na sexta semana após a colocação do clipe em um animal 2R-1C e após a cirurgia fictícia nos animais sham anestesiados.

Ao final dos experimentos, o nível de ruído basal do nervo simpático renal foi determinado pela administração do bloqueador ganglionar hexametônio (20 mg/Kg, EV). A ANSR foi analisada posteriormente, por meio de um programa de computador (Spike Histogram – PowerLab – ADInstruments), que permite a discriminação e contagem dos potenciais nervosos renais a partir de um ruído de fundo, previamente determinado por meio da administração hexametônio. Dessa forma, somente foram quantificados os potenciais registrados acima do ruído considerado de fundo (**Figura 12**). A frequência da ANSR foi apresentada em número de disparos por segundo (Hz).



**Figura 12.** Traçado típico das respostas de pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade simpática renal ( $\int$ ANSR) à administração endovenosa de Hexametônio (20 mg/ kg) em um animal 2R-1C e sham anestesiados.

### 3.4.11. Análise histológica da região RVL

Após os experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com uretana (40%) e subsequente administração endovenosa de KCL 0,4 mL (5%). O cérebro foi removido para análise histológica e determinação dos sítios de nanoinjeção. O bulbo foi cuidadosamente separado e fixado em uma solução de formaldeído 10% e depois de 72 horas foram realizados cortes coronais de  $40\mu\text{m}$  em criostato e montados as lâminas para posterior coloração com vermelho neutro. Quando a difusão do azul de Evans foi visualizada ventralmente ao núcleo ambíguo e lateralmente ao núcleo olivar inferior, a histologia foi considerada positiva para a região RVL.

### **3.4.12. Análise de resultados**

Os dados foram expressos em Média  $\pm$  EP tanto nos experimentos moleculares como funcionais. Os parâmetros de PAM, FC e ANSR foram sempre determinados pelos valores médios em um minuto. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste *t* de Student ou ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Bonferroni's ou Dunnet's quando apropriado por meio do software Graphpad Prism 4.0 (San Diego, CA, EUA). Só foram considerados estatisticamente significantes valores de  $P < 0,05$ .

### **3.5. 3ª SÉRIE DE EXPERIMENTOS: Estudo do estresse oxidativo na região RVL e PVN em ratos 2R-1C e sham.**

A terceira série de experimentos foi composta por três protocolos distintos, em todos os protocolos desta série, os experimentos foram realizados na sexta semana após a colocação do clipe no grupo 2R-1C ou cirurgia fictícia no grupo sham. Primeiro, foi realizado um estudo molecular para avaliar a expressão gênica das subunidades de NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD e do receptor AT-1 nas regiões RVL, PVN e no controle negativo (CN), uma região do córtex cerebral frontal. Além disso, também foi coletado sangue para realização do teste de um dos marcadores de estresse oxidativo – TBARS plasmático de ratos 2R-1C ou sham (**Figura 13**).



Figura 13. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação da expressão gênica de NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD e do receptor AT-1 na região RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e Sham.

Os grupos experimentais do estudo molecular e bioquímico foram:

I – Grupo Sham: animais controles (n = 5);

II – Grupo 2R-1C: animais hipertensos (n = 5).

Posteriormente, em outro grupo de ratos, um estudo funcional analisou as possíveis variações cardiovasculares e de ANSR durante nanoinjeções bilaterais do mimético da superóxido dismutase - Tempol (1 e 5 nmol/ 100 nL, (Fluka, Germany) (Kishi *et al.*, 2004) e de salina na região RVL de ratos 2R-1C ou sham (Figura 14).

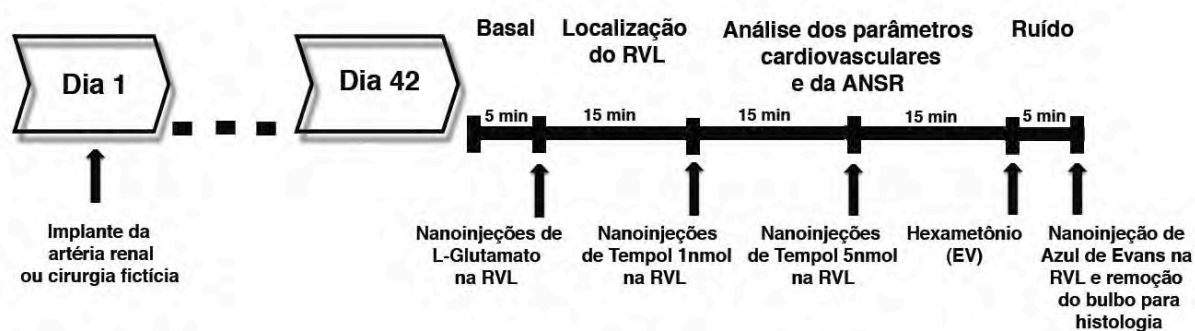


Figura 14. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação das respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Tempol na região RVL nos animais 2R-1C e sham anestesiados.

O desenho experimental esquematizado na **figura 14** foi realizado nos seguintes grupos de animais:

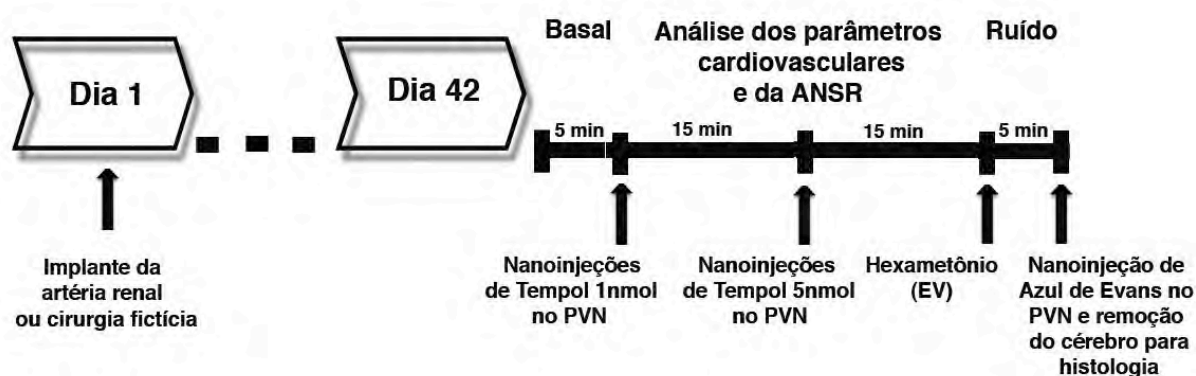
I - Grupo Sham + Tempol (1 e 5 nmol/ 100 nL) nanoinjetado bilateralmente na RVL nos animais sham (n = 5);

II - Grupo 2R-1C + Tempol (1 e 5 nmol/ 100 nL) nanoinjetado bilateralmente na RVL nos animais hipertensos (n = 5);

III - Grupo Sham + Salina nanoinjetado bilateralmente na RVL nos animais sham (n = 5);

IV - Grupo 2R-1C + Salina nanoinjetado bilateralmente na RVL nos animais hipertensos (n = 5);

Além disso, nanoinjeções unilaterais de Tempol (1 e 5 nmol/ 100 nL (Fluka, Germany), e de salina também foram realizadas no PVN de ratos 2R-1C ou sham (**Figura 15**).



**Figura 15.** Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação das respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Tempol no PVN nos animais 2R-1C e sham anestesiados.



Os grupos do estudo funcional com Tempol no PVN foram:

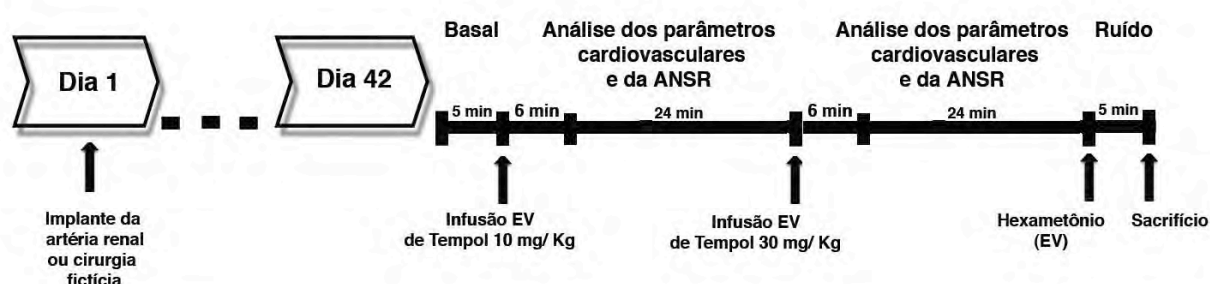
I - Grupo Sham + Tempol (1 e 5 nmol/ 100nL) nanoinjetado unilateralmente no PVN nos animais sham (n = 5);

II - Grupo 2R-1C + Tempol (1 e 5 nmol/ 100nL) nanoinjetado unilateralmente no PVN nos animais hipertensos (n = 5);

III - Grupo Sham + Salina nanoinjetado unilateralmente na PVN nos animais sham (n = 5);

IV - Grupo 2R-1C + Salina nanoinjetado unilateralmente na PVN nos animais hipertensos (n = 5);

Finalizando esta série de experimentos, um estudo funcional para avaliar o estresse oxidativo periférico nos animais hipertensos foi realizado. Tempol (10 e 30 mg/ Kg) (Xu *et al.*, 2004) foi administrado EV nos animais anestesiados (uretana 1,2 g/Kg, EV) 2R-1C ou sham. Foram analisados os parâmetros PAM, FC e ANSR (Figura 16).



**Figura 16.** Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação das respostas cardiovasculares à administração endovenosa de Tempol nos animais 2R-1C e sham anestesiados.

Os grupos analisados foram:

I – Grupo Sham + Salina: animais controles (n = 5);

II – Grupo Sham + T10: animais controles tratados com Tempol 10 mg/kg (n = 5);

III – Grupo Sham + T30: animais controles tratados com Tempol 30 mg/kg (n = 5);

IV - Grupo 2R-1C + Salina: animais hipertensos (n = 5);

V - Grupo 2R-1C + T10: animais hipertensos tratados com Tempol 10 mg/kg (n = 5);

VI - Grupo 2R-1C + T30: animais hipertensos tratados com Tempol 30 mg/kg (n = 5);

### **3.5.1. Extração de RNA (*Punches*)**

O mesmo procedimento descrito no item **3.4.1** foi realizado para extração de *punches* da região RVL. Entretanto, também foram microdissecados o PVN e o CN. Uma secção entre 1,8 – 2,12 mm em relação ao Bregma foi realizada e a parte contendo o PVN foi identificada através do microscópio cirúrgico (x 40 magnitude) segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1986). *Punches* bilaterais do PVN foram retirados com um instrumental apropriado de 0,5 mm de diâmetro. Para o CN foi microdissecado uma região do córtex frontal direito.

### 3.5.2. Obtenção dos Primers

Além do receptor AT-1 e  $\beta$ -actina já descritos anteriormente, os *primers* utilizados na reação de PCR nesta série de experimentos foram construídos com base nas seqüências de cDNA das subunidades de NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox) e de CuZnSOD de rato, obtidas através do banco de dados Genbank. As seqüências para cada molécula estão representadas na **Tabela 2**.

**Tabela 2. Sequências de primers das subunidades de NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox) e CuZnSOD para PCR quantitativo em Tempo Real**

Gene	Primer	Sequência (5' to 3')	Produto (bp)	Temp. de Anelamento
p47phox	5'	GTC-TGA-GGG-TGA-AGC-CAT-CG	211	59,0 °C
		CCG-AGA-ACG-CTG-GTG-GAT-GC		
gp91phox	5'	AGT-GGT-TCG-CAG-ACC-TGC-TG	239	56,4 °C
		TCT-GGT-GTT-GGG-GTG-TTG-AC		
CuZnSOD	5'	TGA-AGG-CGA-GCA-TGG-GTT-CC	165	56,9 °C
		ACA-CCG-TCC-TTT-CCA-GCA-GC		

O RT-PCR e o RT-PCR em Tempo Real foram realizados de acordo com o descrito nos itens **3.4.3** e **3.4.5**.

A instrumentação cirúrgica para aquisição dos parâmetros cardiovasculares foram descritos no item **3.4.7.**, assim como o método de aquisição e análise da ANSR estão no item **3.4.10.**

### **3.5.3. Nanoinjeções no PVN**

As coordenadas estereotáxicas para o PVN utilizadas foram obtidas e modificadas a partir do Atlas de Paxinos & Watson (1998):

**Antero - Posterior** = 1,6 a 2,0 mm rostro-caudal a partir do bregma

**Lateral** = 0,5 a 0,7 mm lateral a partir da linha média

**Ventral** = 7 a 7,5 mm dorso-ventral

A análise histológica foi descrita na secção **3.4.11.** Quando a difusão do azul de Evans foi visualizada imediatamente ao lado do terceiro ventrículo (3V) na região do PVN, foi considerada histologia positiva.

### **3.5.4. Determinação Bioquímica do TBARS**

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da técnica de reação entre ROS e ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas amostras de sangue coletadas dos 2R-1C e Sham (Ohkawa *et al.*, 1979). As amostras plasmáticas foram incubadas em banho-maria tanto na presença como ausência de ácido tiobarbitúrico (TBA) durante 20 min, posteriormente foram colocadas no gelo por mais 20 min para realização da reação colorimétrica. Após a centrifugação, o sobrenadante foi medido no espectrofotômetro na absorvância de 535 nm.

### **3.5.5. Administração endovenosa de Tempol**

A administração aguda de Tempol (10 e 30 mg/ kg) (Xu *et al.*, 2004) foi realizada através de uma bomba de infusão (KdScientific, USA) na ordem de 0,1 mL de solução por 100 g de peso corporal durante 6 minutos.

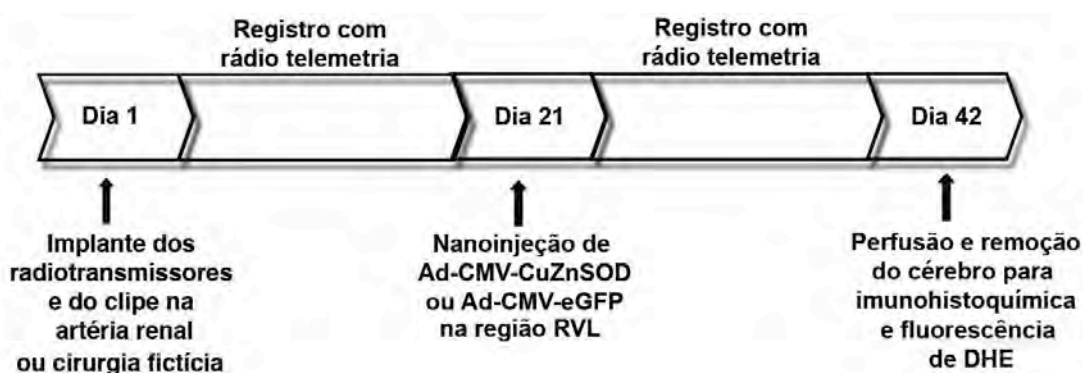
### **3.5.6. Análise de resultados**

Os dados foram expressos em Média  $\pm$  EP tanto nos experimentos moleculares como funcionais. Os parâmetros de PAM, FC e ANSR foram sempre determinados pelos valores médios em um minuto. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste *t* de Student ou ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Newman – Keuls method quando apropriado por meio do software Graphpad Prism 4.0 (San Diego, CA, EUA). Só foram considerados estatisticamente significantes valores de  $P < 0,05$ .

## **3.6. 4ª SÉRIE DE EXPERIMENTOS: Estudo do estresse oxidativo na região RVL na terceira semana após a cirurgia de indução da hipertensão 2R-1C**

Esta série de experimentos teve por objetivo examinar se a inibição crônica de ânions superóxidos na região RVL no modelo 2R-1C previne a hipertensão arterial. Para isso, os animais foram transfectados com adenovírus para super expressar CuZnSOD na região RVL, o vírus foi administrado na região RVL ao final da terceira semana após a colocação do clipe nos animais 2R-1C ou nos

animais submetidos à cirurgia fictícia. A PA e foi monitorada por rádio telemetria durante as três semanas subseqüentes, para posteriormente realizar a análise espectral. A confirmação da transfecção viral foi realizada após o sacrifício dos animais por meio de imunohistoquímica. Além disso, para verificar se a transfecção inibiu o aumento dos níveis intracelulares de superóxidos na região RVL foi realizada a análise de fluorescência de DHE (dihidroetídio) (**Figura 17**).



**Figura 17.** Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliar se a inibição de ânions superóxidos na região RVL no modelo 2R-1C previne a hipertensão arterial.

Os grupos experimentais realizados foram:

I - Grupo Sham + Ad-CMV-CuZnSOD: animais controles transfectados com Ad-CuZnSOD na região RVL (n=6);

II - Grupo 2R-1C+ Ad-CMV-CuZnSOD: animais hipertensos transfectados com Ad-CuZnSOD na região RVL (n=7);

III - Grupo Sham + Ad-CMV-eGFP: animais controles transfectados com Ad-eGFP na região RVL (n=5);

IV - Grupo 2R-1C + Ad-CMV-eGFP: animais hipertensos transfectados com Ad- Ad-eGFP na região RVL (n=5);

### **3.6.1. Implante dos radiotransmissores de telemetria e cálculo da análise espectral**

Os procedimentos cirúrgicos para o implante dos radiotransmissores foram descritos no item 3.3.1., enquanto a descrição sobre a análise espectral da PA está no item 3.3.2.

### **3.6.2. Transfecção viral *In Vivo* na região RVL**

O Adenovírus (Ad) expressando CuZnSOD foi direcionado por promotores de citomegalovirus humano (CMV). Este vírus foi fornecido pela Dra. Robin Davisson da Universidade de Iowa – EUA em estoque viral de  $1,2 \times 10^8$  pfu /  $\mu\text{L}$ . A construção e a caracterização do Ad-CMV-CuZnSOD são descritos detalhadamente por Zwacka 1998 e Chu 2003. Como controle, foi utilizado o Ad-CMV-eGFP ( $1,57 \times 10^9$  pfu /  $\mu\text{L}$ ) o qual expressa uma proteína fluorescente verde ao transfectar a célula. Este vírus foi obtido na Universidade de Bristol, Reino Unido. Três semanas após a implantação do radiotransmissor, os animais foram anestesiados novamente com Ketamina (60 mg/kg) e Medetomidina (250  $\mu\text{g/kg}$ ) (IM) e posicionados em decúbito ventral em aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments Tujunga, CA, EUA). Foram realizadas cinco nanoinjeções bilaterais de suspensão viral (tanto Ad-CMV-CuZnSOD ou Ad-CMV-eGFP) num volume de 100 nL durante um minuto cada, na região do RVL.

As coordenadas estereotáxicas para o RVL utilizadas foram obtidas e modificadas a partir do Atlas de Paxinos & Watson (1986):

**Antero - Posterior** = 3,8 mm rostro-caudal a partir do *lambda*

**Médio - Lateral** = 1,7 a 1,8 mm lateral a partir da linha média

**Ventro - Dorsal** = 8,0 mm dorso-ventral ventral a partir da superfície da dura-máter

**Barra incisora** = - 3,5 mm

Para confirmar a localização da região RVL foram realizadas previamente nanoinjeções bilaterais do aminoácido excitatório L-glutamato (100 mM / 50 nL). Posteriormente, os animais foram monitorados por rádio telemetria por três semanas subsequentes.

### **3.6.3. Validação da Expressão Gênica In Vivo**

No último dia de registro de PA, os animais foram anestesiados com Pentobarbital sódico (100 mg/ kg IP) e perfundidos via intracardiaca. O cérebro foi removido e armazenado por 3 horas na solução fixadora (paraformaldeído a 4 %) e em seguida conservado em solução de sacarose 20 % em paraformaldeído a 4 % durante 24 horas. Após a fixação, o cérebro foi congelado no nitrogênio líquido e em seguida armazenado a -80°C para a realização de imunohistoquímica. Cortes coronais de 30 µm foram feitos com o auxílio de um criostato (-20°C) (CM3050, Leica Microsystems, Milton Keynes, UK) e a parte contendo a região RVL foi recolhida em solução tampão (PBS 0,1M). Em seguida, foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas incubando-se o tecido em soro de coelho 10 % por 15 minutos (Vector, CA, EUA). Após esse processo, os tecidos foram lavados em PBS 0,1M por



três vezes, respeitando-se o intervalo de 5 minutos durante as lavagens e o anticorpo primário foi adicionado. O tempo de incubação do anticorpo primário foi de aproximadamente 48 h. O tecido passou então por outro processo de lavagem com solução tampão (como previamente descrito) e o anticorpo secundário foi adicionado e incubado por 1 h. No final desta reação, o tecido foi novamente lavado, e utilizou-se meio de montagem Vectashield, (Vector, CA, EUA). As lâminas foram mantidas a 4°C até que todas as imagens fossem adquiridas por meio de um sistema de microscopia de fluorescência Leica DM IRB com C-Plan optics (Leica, Germany).

Para confirmar se houve transfecção do vírus nos neurônios da região RVL, foi realizado dupla-marcação fluorescente para CuZnSOD e Tirosina hidroxilase (TH) ou CuZnSOD e NeuN. TH foi utilizado para identificar os neurônios catecolaminérgicos (C1 neurônios) encontrados na região da RVL e NeuN para marcar os demais neurônios centrais.

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados nos ensaios:

- Anticorpo da CuZnSOD: sheep anti-human IgG (The Binding Site Limited) na diluição de 1:100;
- Anticorpo da Tirosina hidroxilase (TH): Mouse anti-Tyrosine Hydroxylase (Zymed Laboratories, Invitrogen) diluição 1:1000.;
- Anticorpo do NeuN: anti-NeuN clone A60, biotina conjugated (Millipore) na diluição de 1:1000.

E os secundários utilizados foram:

- Biotinylated Anti-Sheep made in rabbit (Vector, CA, EUA) – diluição 1:500;

- Streptavidin-conjugated Alexa Fluor 488 (Vector, CA, EUA), diluição 1:500 para anti-CuZnSOD,;
- Rabbit anti-mouse Alexa Fluor 594 (Vector, CA, EUA), diluição 1:500 para TH e NeuN.

#### **3.6.4. Medida dos níveis de superóxidos na região RVL**

Para verificar se a transfecção inibiu o aumento dos níveis intracelulares de superóxidos na região RVL foi realizada a análise de fluorescência de DHE (dihidroetídio) nos cortes transfectados com Ad-CMV-CuZnSOD ou Ad-CMV-eGFP. O DHE (dihidroetídio) é utilizado com um marcador dos níveis de superóxidos, pois quando há a oxidação do dihidroetídio pelo superóxido ocorre a produção de um produto fluorescente.

Portanto, após três semanas da transfecção viral, os animais foram anestesiados com Halotano (Cristália), decaptados e os cérebros foram removidos à fresco. Cortes coronais de 300  $\mu\text{m}$  do bulbo contendo a região RVL foram feitos com auxílio de um vibratomo. Em seguida, os cortes foram incubados durante 30 min no DHE 1 mol/ L (Invitrogen, UK) em ambiente escuro. A fluorescência de DHE foi adquirida por meio de um sistema de microscopia confocal (Leica SP) numa excitação de 420 nm com um filtro de emissão de rodamina. Foi comparado quantitativamente os valores de fluorescência na região RVL sempre no mesmo tempo após a incubação com DHE.

### **3.6.5. Análise estatística**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  Erro Padrão e analisados usando ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Tukey's ou Teste *t* de Student quando apropriado por meio do software Graphpad Prism 4.0 (San Diego, CA, EUA). Apenas foram considerados estatisticamente significantes valores de  $P < 0,05$ .

### **3.7. 5ª SÉRIE DE EXPERIMENTOS: Estudo da expressão gênica relacionada ao estresse oxidativo na região RVL e das respostas cardiovasculares após o tratamento crônico com Vit C em animais 2R-1C**

Nesta série de experimentos foram realizados dois protocolos distintos. Primeiro, um estudo funcional visou investigar se o tratamento crônico com Vit C produz modificações nos parâmetros cardiovasculares, como PAM, FC e na ANSR nos animais hipertensos 2R-1C e nos Sham. O tratamento foi realizado por gavagem durante 7 dias consecutivos (uma vez ao dia) a partir da quinta semana (Dia 35) da colocação do clipe ou da realização da cirurgia fictícia (**Figura 18**).



**Figura 18.** Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliar se o tratamento crônico com Vit C produz modificações nas ações cardiovasculares, como PAM, FC e na ANSR nos animais hipertensos 2R-1C e Sham.

Os grupos experimentais realizados foram:

I – Grupo Sham: animais controles (n = 5);

II - Grupo Sham + Vit C: animais controles tratados cronicamente com Vit C – 150 mg/ Kg (n = 5);

III - Grupo 2R-1C: animais hipertensos (n = 5);

IV - Grupo 2R-1C + Vit C: animais hipertensos tratados cronicamente com Vit C – 150 mg/ Kg (n = 5);

No segundo protocolo, um estudo molecular foi realizado para avaliar a expressão gênica das subunidades de NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD, do receptor AT-1, nNOS, iNOS, IL-1 $\beta$  e Glut-1 nas regiões RVL, PVN e no CN após o tratamento crônico com Vit C durante 7 dias a partir da quinta semana (Dia 35) da colocação do clipe ou da realização da cirurgia fictícia nos animais Sham. Os experimentos foram realizados na sexta semana (Dia 42) (**Figura 19**).



**Figura 19.** Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação da expressão gênica de NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD, do receptor AT-1, nNOS, iNOS, IL-1 $\beta$  e Glut-1 nas regiões RVL, PVN e CN, após o tratamento crônico com Vit C durante 7 dias a partir da quinta semana (Dia 35) da colocação do clipe ou da realização da cirurgia fictícia nos animais Sham.

Os grupos experimentais realizados foram:

I – Grupo Sham: animais controles (n= 15);

II - Grupo Sham + Vit C: animais controles tratados cronicamente com Vit C – 150 mg/ Kg (n=15);

III - Grupo 2R-1C: animais hipertensos (n= 15);

IV - Grupo 2R-1C + Vit C: animais hipertensos tratados cronicamente com Vit C – 150 mg/ Kg (n= 15);

### **3.7.1. Tratamento crônico com Vit C**

Para confirmar o estado hipertensivo dos animais, a PA foi medida através da técnica de pletismografia de cauda (BP-98A; Softron, Tokyo, Japan) posteriormente, iniciou-se o tratamento crônico com Vit C.

A Vit C (150 mg/ kg/ dia) (Huang *et al.*, 2001) foi administrada por meio de gavagem durante sete dias consecutivos.

A instrumentação cirúrgica para aquisição dos parâmetros cardiovasculares após o tratamento foi descrita no item **3.4.7.**, assim como o método de aquisição e análise da ANSR está no item **3.4.10.**

### **3.7.2. Extração de RNA (Punches)**

Foi realizado o mesmo procedimento descrito nos itens **3.4.1.** e **3.5.1.**

### **3.7.3. Obtenção dos Primers**

Além dos *primers* descritos nas Tabelas 1 e 2, também foram utilizados nesta série de experimentos nNOS, IL-1 $\beta$  e Glut-1 obtidos através do banco de dados Genbank. As seqüências para cada molécula estão apresentadas na **Tabela 3.**

**Tabela 3. Sequências de *primers* nNOS, IL-1 $\beta$  e Glut-1 para PCR quantitativo em Tempo Real**

Gene	Primer	Sequência (5' to 3')	Produto (bp)	Temp. de Anelamento
nNOS	5'	TGG-TCC-TCA-GCA-AGG-GGC-TC	97	55,5°C
		ATC-TGG-ATG-GAC-GGG-AAC-TC		
IL-1 $\beta$	5'	TCT-CAA-GCA-GAG-CAC-AGA-CC	177	56,6°C
		GAC-AAA-GGC-TTC-CCC-TGG-AG		
Glut-1	5'	TGG-TCC-TCA-GCA-AGG-GGC-TC	190	57,8 °C
		ATC-TGG-ATG-GAC-GGG-AAC-TC		

O RT-PCR e o RT-PCR em Tempo Real foram realizados de acordo com o descrito nos itens **3.4.3** e **3.4.5**.

A comprovação histológica após a retirada dos *punches* foi descrita no item **3.4.2**.

#### **3.7.4. Análise de resultados**

Os parâmetros basais de PAM, FC e ANSR após o tratamento crônico com Vit C foram determinados pela média de 15 minutos. Os resultados tanto dos experimentos funcionais como moleculares foram expressos em média  $\pm$  Erro Padrão e analisados usando ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Tukey's ou Newman – Keuls method quando apropriado por meio do software Graphpad Prism 4.0 (San Diego, CA, EUA). Só foram considerados estatisticamente significantes valores de  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Resultados da 1ª Série de Experimentos

#### 4.1.1. Geração da hipertensão no modelo 2R-1C

A oclusão parcial da artéria renal esquerda de ratos Wistar, produziu hipertensão arterial ao final da sexta semana em cerca de 100% dos animais operados. A PAS, PAD e a PAM foram registradas durante seis semanas por meio de rádio telemetria (**Tabela 4**). Após as duas primeiras semanas, observou-se um significativo aumento da PAS de  $122 \pm 9$  para  $157 \pm 6$  mmHg, a qual continuou aumentando até a quinta semana. Posteriormente, estabilizou-se no nível mais alto até a sexta semana ( $211 \pm 9$  mmHg), como mostram as **figuras 20A e 20B**.

Após três semanas da colocação do clipe, a PAD e PAM aumentaram de  $97 \pm 6$  e  $106 \pm 8$  mmHg para  $130 \pm 13$  ( $P < 0,05$ ) e  $141 \pm 13$  mmHg ( $P < 0,05$ ), respectivamente. Além disso, os parâmetros de pressão continuaram aumentando até a sexta semana nos animais hipertensos (PAD:  $173 \pm 9$  mmHg e PAM:  $188 \pm 9$  mmHg) (**Figuras 20C, 20D, 20E e 20F**).

Portanto, estes resultados demonstram que a pressão arterial nos animais hipertensos aumenta gradualmente e significativamente após a clipagem durante cinco semanas até atingir o platô na sexta semana. O grupo sham não demonstrou mudanças significativas na PAS, PAD e PAM durante o mesmo período analisado. Os níveis basais deste grupo foram semelhantes ao grupo 2R-1C e continuou estável até ao final ( $122 \pm 8$ ;  $89 \pm 6$  e  $101 \pm 6$  mmHg, respectivamente).



**Tabela 4. Evolução da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM) durante 6 semanas nos animais hipertensos 2R-1C e Sham.**

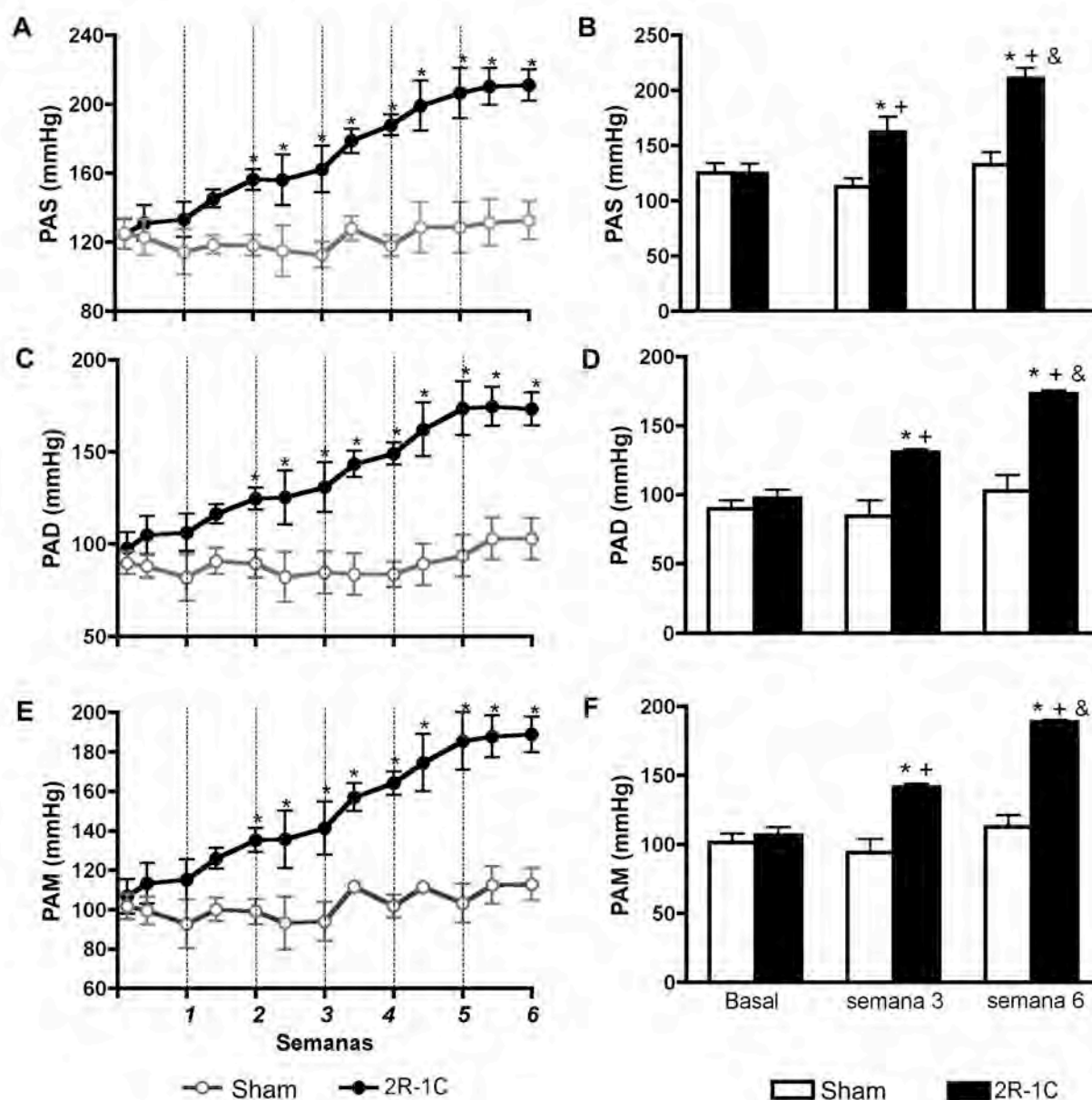
Semanas	PAS (mmHg)		PAD (mmHg)		PAM (mmHg)	
	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C
<b>0</b>	122 ± 8	122 ± 9	89 ± 6	97 ± 6	101 ± 6	106 ± 8
<b>1</b>	125 ± 10	125 ± 4	82 ± 12	106 ± 10	92 ± 12	115 ± 10
<b>2</b>	118 ± 5	157 ± 6*	89 ± 7	124 ± 6	99 ± 6	135 ± 6*
<b>3</b>	113 ± 7	162 ± 9 <sup>+</sup>	85 ± 11	130 ± 13 <sup>+</sup>	94 ± 9	141 ± 13 <sup>+</sup>
<b>4</b>	128 ± 7	188 ± 4 <sup>+</sup>	83 ± 6	149 ± 6 <sup>+</sup>	101 ± 5	164 ± 6 <sup>+</sup>
<b>5</b>	128 ± 14	206 ± 14 <sup>+</sup>	93 ± 11	173 ± 14 <sup>+</sup>	103 ± 9	187 ± 10 <sup>+</sup>
<b>6</b>	133 ± 11	211 ± 9 <sup>++&amp;</sup>	103 ± 11	173 ± 9 <sup>++&amp;</sup>	113 ± 8	188 ± 9 <sup>++&amp;</sup>

Valores de Média ± EPM.

\* $P < 0,05$  em relação Sham – Semana 0 e Sham - semana 3;

<sup>+</sup> $P < 0,05$  em relação 2R-1C – Semana 0;

<sup>&</sup> $P < 0,05$  em relação 2R-1C - semana 3 e Sham - semana 6.



**Figura 20. Evolução da pressão arterial no modelo 2R-1C.**

(A) Valores de pressão arterial sistólica (PAS), (C) de pressão arterial diastólica (PAD) e (E) de pressão arterial média (PAM) registradas por rádio telemetria durante seis semanas nos grupos hipertensos (2R-1C, n = 6) e sham (Sham, n = 6). Valores de PAS basais, da terceira e da sexta semana após a colocação do clipe (B), PAD (D) e PAM (F).

\* $P < 0,05$  em relação ao Sham - Basal e Sham - semana 3; + $P < 0,05$  em relação 2R-1C - Basal; & $P < 0,05$  em relação 2R-1C - semana 3 e Sham - semana 6 (ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Tukey's).

#### **4.1.2. Análise espectral do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica em ratos 2R-1C e sham**

As **figuras 21A e 21B** mostram as mudanças do IP durante as seis semanas de evolução da hipertensão 2R-1C. O IP diminuiu gradualmente a partir da quarta até a sexta semana (de  $154 \pm 3$  para  $128 \pm 2$  ms) apenas nos animais hipertensos. Nenhuma modificação, entretanto, foi observada na LF (IP) nos animais 2R-1C ( $3,1 \pm 0,1$  para  $2,9 \pm 0,6$  ms<sup>2</sup>) e nos animais sham (de  $3,9 \pm 0,2$  para  $3,3 \pm 0,1$  ms<sup>2</sup>) durante as seis semanas de observação (**Figuras 21C e 21D**).

Por outro lado, a HF (IP), um índice do balanço parassimpático cardíaco, diminuiu a partir da terceira semana e continuou significativamente reduzido na sexta semana ( $13,5 \pm 0,9$  para  $8,3 \pm 0,01$  ms<sup>2</sup>) nos animais hipertensos, como mostram as **figuras 21E e 21F**. O grupo sham não apresentou mudanças na HF (IP) ( $10,3 \pm 0,4$  para  $10,1 \pm 1,9$  ms<sup>2</sup>) (**Tabela 5**).

A VLF (PAS) aumentou depois da clipagem e tornou significativamente diferente do grupo sham a partir da quarta semana ( $6,9 \pm 0,2$  vs  $3,9 \pm 0,2$  mmHg<sup>2</sup>) quando atingiu a platô na sexta semana ( $6,6 \pm 0,1$  mmHg<sup>2</sup>). As mudanças na VLF (PAS) são mostradas nas **figuras 22A e 22B e tabela 6**.

Além disso, a LF (PAS), um índice da modulação da atividade vasomotora simpática, apresentou-se aumentada principalmente a partir da quarta semana até quinta (de  $2,8 \pm 0,8$  para  $5,2 \pm 0,3$  mmHg<sup>2</sup>,  $P < 0,05$ ) e depois permaneceu estável na sexta semana ( $5,4 \pm 0,1$  mmHg<sup>2</sup>) nos animais hipertensos. O grupo sham não apresentou alterações significantes na LF (PAS) (de  $2,6 \pm 0,8$  para  $3,0 \pm 0,2$  mmHg<sup>2</sup>), como mostram as **figuras 22C e 22D**.

**Tabela 5. Análise espectral dos valores de intervalo de pulso (IP), de baixa frequência de intervalo de pulso (LF (IP)) e alta frequência de intervalo de pulso (HF (IP)) de animais hipertensos 2R-1C e sham durante 6 semanas.**

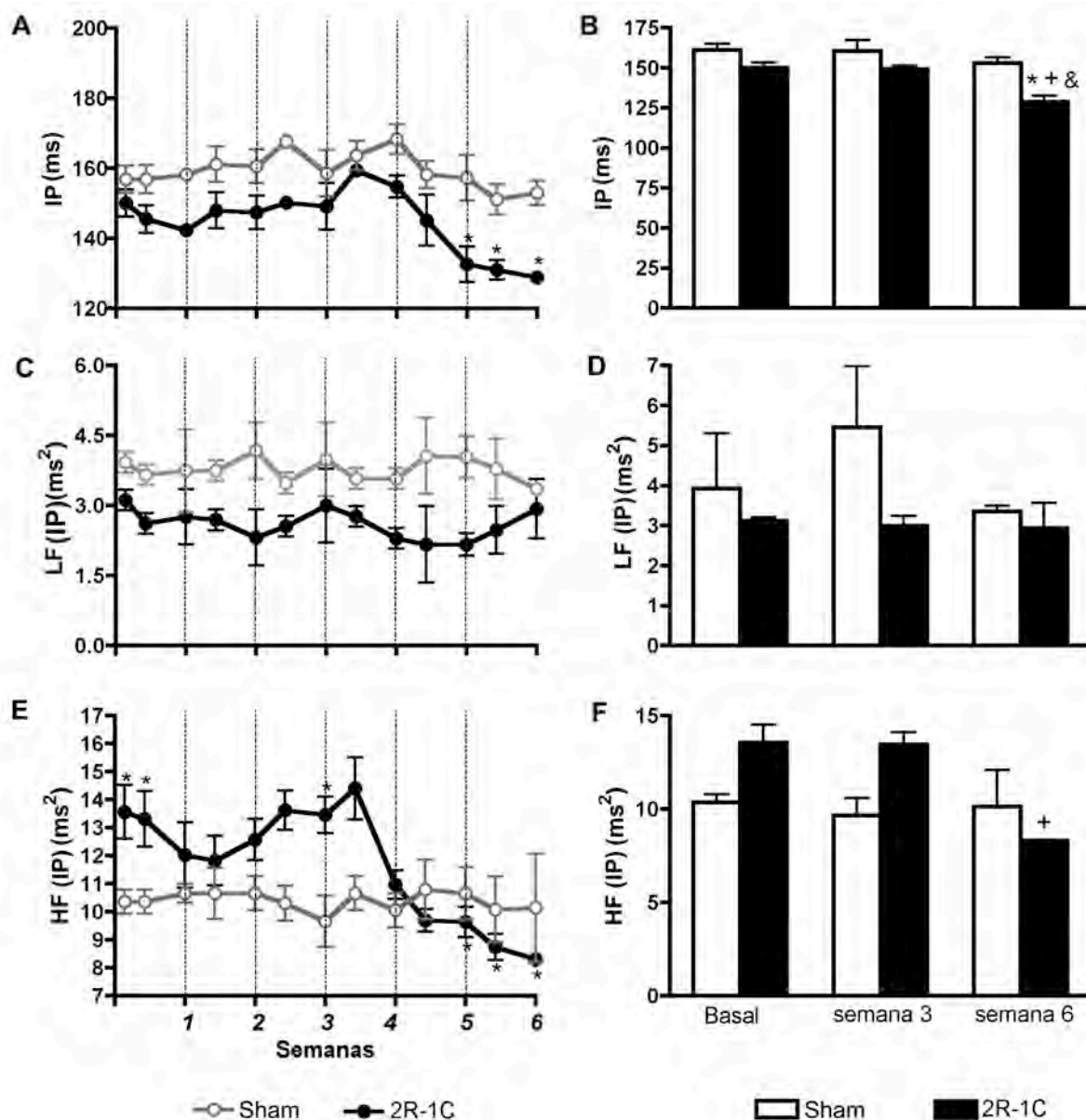
Semanas	IP (ms)		LF (IP) (ms <sup>2</sup> )		HF(IP) (ms <sup>2</sup> )	
	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C
<b>0</b>	161 ± 3	150 ± 3	3,9 ± 0,2	3,1 ± 0,1	10,3 ± 0,4	13,5 ± 0,9
<b>1</b>	158 ± 0,9	142 ± 0,9	3,7 ± 0,8	2,7 ± 0,5	12 ± 1,1	12 ± 1,1
<b>2</b>	160 ± 4	147 ± 4	4,1 ± 0,6	2,3 ± 0,6	12,5 ± 0,7	12,5 ± 0,7
<b>3</b>	160 ± 6	149 ± 2	5,4 ± 0,7	2,9 ± 0,2	9,6 ± 0,9	13,4 ± 0,6
<b>4</b>	168 ± 4	154 ± 3	3,5 ± 0,2	2,2 ± 0,2	10,9 ± 0,5	10,9 ± 0,5
<b>5</b>	157 ± 6	132 ± 5 <sup>+</sup>	4,0 ± 0,4	2,1 ± 0,2	9,6 ± 0,5	9,6 ± 0,5
<b>6</b>	153 ± 3	128 ± 2 <sup>++&amp;</sup>	3,3 ± 0,1	2,9 ± 0,6	10,1 ± 1,9	8,3 ± 0,01 <sup>+</sup>

Valores de Média ± EPM.

\* $P < 0,05$  em relação Sham – Semana 0 e Sham - semana 3;

<sup>+</sup> $P < 0,05$  em relação 2R-1C – Semana 0;

<sup>&</sup> $P < 0,05$  em relação 2R-1C - semana 3 e Sham - semana 6.



**Figura 21. Análise espectral dos animais 2R-1C e sham (1).**

(A) Valores de intervalo de pulso (IP), (C) de baixa frequência em relação ao intervalo de pulso (LF (IP)) e (E) de alta frequência em relação ao intervalo de pulso (HF (IP)) registradas por rádio telemetria durante seis semanas nos grupos hipertensos (2R-1C) e Sham. Valores de IP basais, da terceira e sexta semana após a colocação do clipe (B), LF (IP) (D) e HF (IP) (F).

\* $P < 0.05$  em relação Sham - Basal e Sham - semana 3; + $P < 0.05$  em relação 2R-1C - Basal; & $P < 0.05$  em relação 2R-1C - semana 3 e Sham - semana 6 (ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Tukey's).

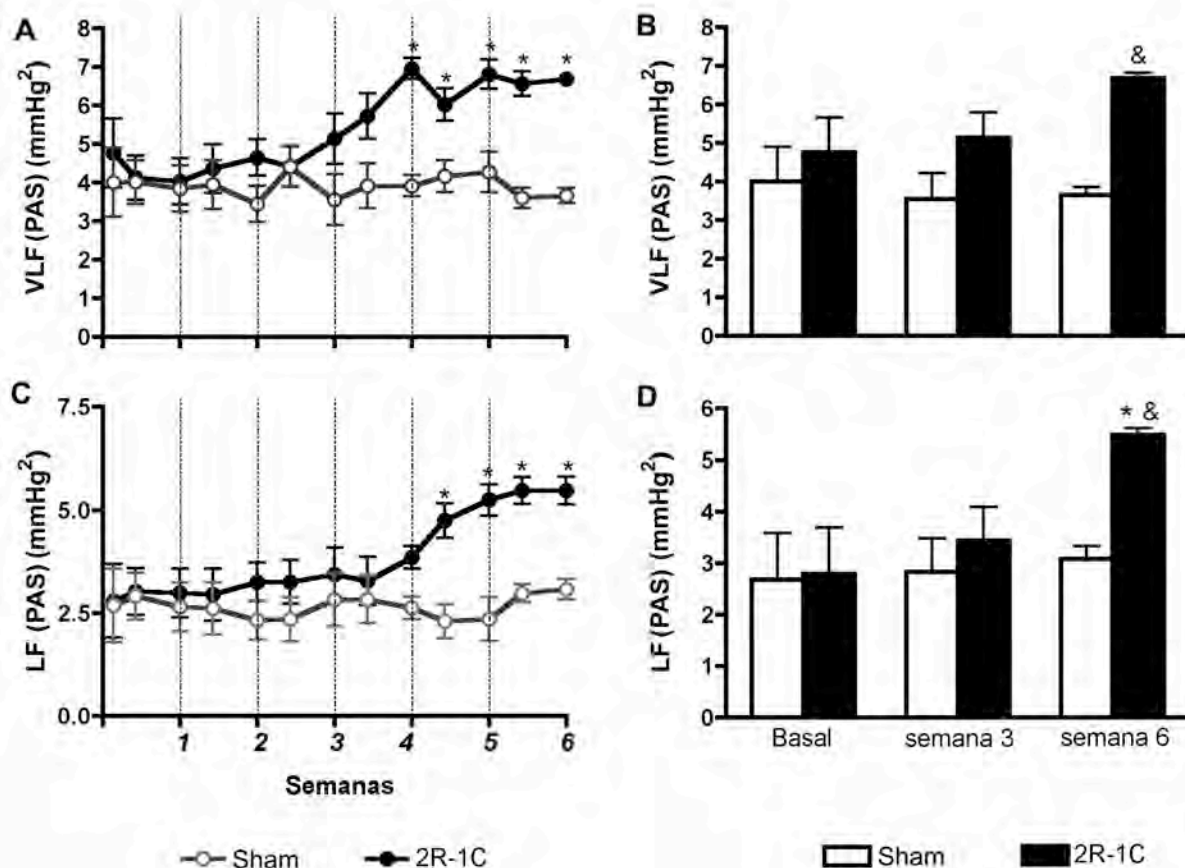
**Tabela 6. Análise espectral dos valores de muito baixa frequência de pressão arterial sistólica (VLF (PAS)) e baixa frequência de pressão arterial sistólica (LF (PAS)) de animais 2R-1C e sham durante 6 semanas.**

Semanas	VLF (PAS) (mmHg <sup>2</sup> )		LF (PAS) (mmHg <sup>2</sup> )	
	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C
<b>0</b>	4,0 ± 0,8	4,7 ± 0,8	2,6 ± 0,8	2,8 ± 0,8
<b>1</b>	3,8 ± 0,5	4,0 ± 0,5	2,6 ± 0,5	2,9 ± 0,6
<b>2</b>	3,4 ± 0,4	4,6 ± 0,4	2,3 ± 0,4	3,6 ± 0,4
<b>3</b>	3,5 ± 0,6	5,1 ± 0,6	2,8 ± 0,6	3,4 ± 0,6
<b>4</b>	3,9 ± 0,2	6,9 ± 0,2*	2,6 ± 0,2	3,8 ± 0,2
<b>5</b>	4,2 ± 0,5	6,8 ± 0,3*	2,3 ± 0,5	5,2 ± 0,3*
<b>6</b>	3,6 ± 0,1	6,6 ± 0,1*&	3,0 ± 0,2	5,4 ± 0,1*&

Valores de Média ± EPM.

\* $P < 0,05$  em relação Sham – Semana 0 e Sham - semana 3;

& $P < 0,05$  em relação 2R-1C - semana 3 e Sham - semana 6.



**Figura 22. Análise espectral dos animais 2R-1C e sham (2).**

(A) Valores de muito baixa frequência em relação à pressão arterial sistólica (VLF (PAS)) e (C) de baixa frequência em relação à pressão arterial sistólica (LF (PAS)) registradas por rádio telemetria durante seis semanas nos grupos hipertensos (2R-1C) e sham. Valores de VLF (PAS) basais, da terceira e sexta semana após a colocação do clipe (B) e LF (PAS) (D) nos grupos hipertensos (2R-1C) e sham (Sham).

\* $P < 0,05$  em relação ao Sham - Basal e Sham - semana 3; & $P < 0,05$  em relação 2R-1C - semana 3 e Sham - semana 6 (ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Tukey's).

#### **4.1.3. Mudanças na frequência cardíaca e no ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco nos animais 2R-1C e sham**

Foi observada nos animais hipertensos uma taquicardia desenvolvida a partir da quarta semana ( $406 \pm 7$  bpm), a qual atingiu o platô na quinta e sexta semana ( $468 \pm 10$  bpm) e diferiu significativamente do grupo sham. Por outro lado, não ocorreram alterações significantes de FC dos animais sham, os quais apresentaram valores de  $376 \pm 9$  na primeira semana e  $398 \pm 12$  bpm na última semana analisada. Estes resultados estão representados nas **figuras 23A e 23B e Tabela 7.**

O GRBe (FC) diminuiu gradualmente até a quinta semana depois da clipagem (de  $-2,4 \pm 0,09$  para  $-0,8 \pm 0,04$  bpm/mmHg) e depois estabilizou-se. Entretanto, os animais sham não apresentaram modificações importantes durante as seis semanas analisadas (de  $-2,4 \pm 0,1$  to  $-2,4 \pm 0,1$  bpm/mmHg), como mostram as **figuras 23C e 23D.**

O GRBe (IP), outro índice da sensibilidade reflexa do barorreceptor, diminuiu significativamente a partir da terceira semana e continuou reduzido até a última semana (de  $0,7 \pm 0,1$  para  $0,2 \pm 0,03$  ms/mmHg) somente nos animais hipertensos. Nenhuma alteração foi observada no grupo sham (**Figuras 23E e 23F**).



**Tabela 7. Mudanças na frequência cardíaca (FC), no ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco em relação ao componente parassimpático (GRBe (FC)) e em relação ao intervalo de pulso (GRBe (IP)) de animais 2R-1C e sham durante 6 semanas.**

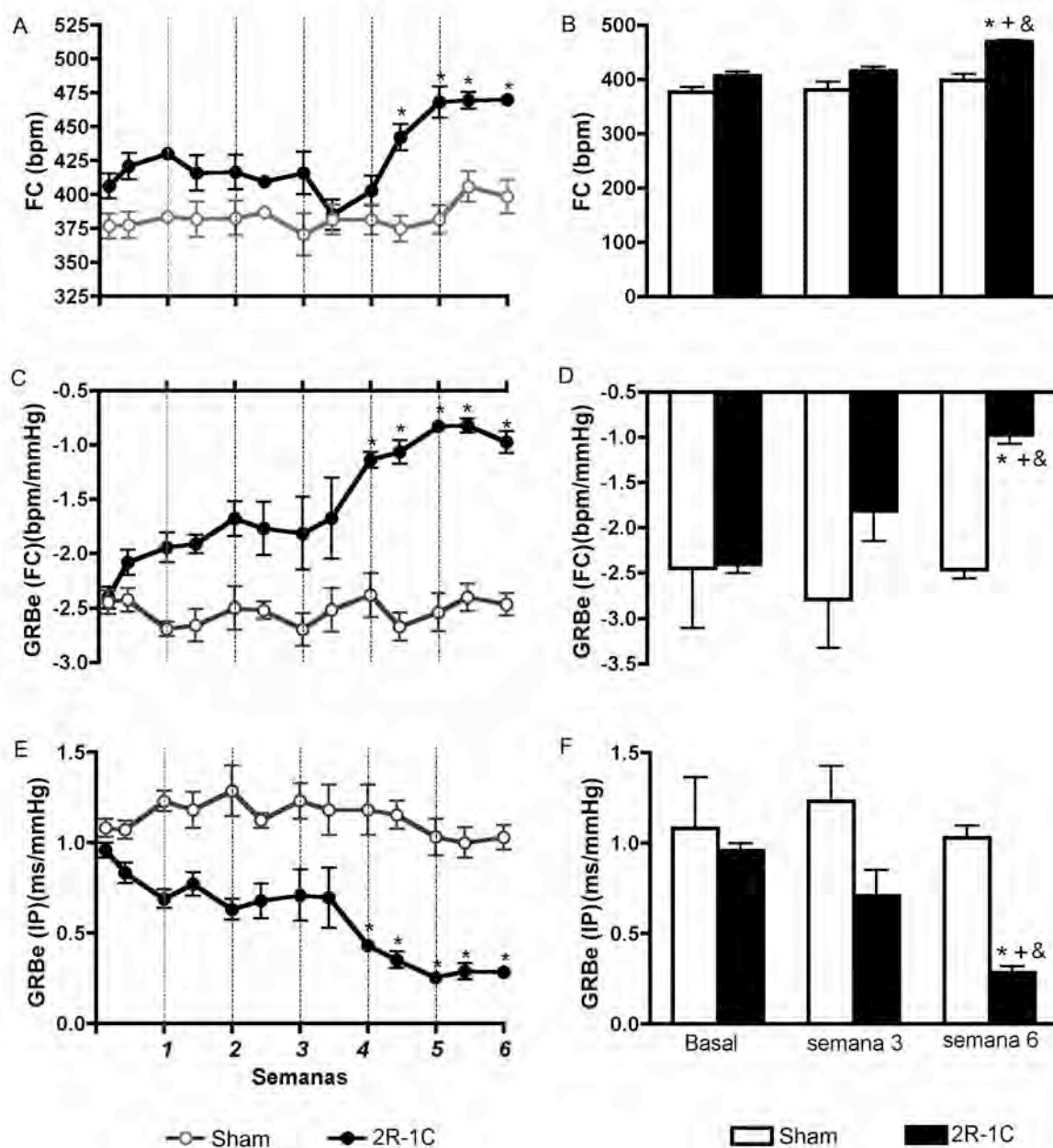
Semanas	FC		GRBe (FC)		GRBe (IP)	
	(bpm)		(bpm/mmHg)		(ms/mmHg)	
	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C
<b>0</b>	376 ± 9	406 ± 7	-2,4 ± 0,6	-2,4 ± 0,09	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,04
<b>1</b>	383 ± 2	430 ± 2	-2,6 ± 0,06	-1,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,7 ± 0,05
<b>2</b>	416 ± 12	416 ± 12	-2,5 ± 0,1	-1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,05
<b>3</b>	380 ± 15	415 ± 7	-2,7 ± 0,5	-1,8 ± 0,3	1,2 ± 0,09	0,7 ± 0,1
<b>4</b>	381 ± 11	402 ± 11	-2,3 ± 0,1	-1,1 ± 0,01 <sup>++</sup>	1,1 ± 0,1	0,4 ± 0,03 <sup>++</sup>
<b>5</b>	380 ± 8	468 ± 11 <sup>++</sup>	-2,5 ± 0,1	-0,8 ± 0,04 <sup>++</sup>	1,0 ± 0,15	0,2 ± 0,02 <sup>++</sup>
<b>6</b>	398 ± 11	469 ± 2 <sup>++&amp;</sup>	-2,4 ± 0,1	-0,9 ± 0,09 <sup>++&amp;</sup>	1,0 ± 0,06	0,2 ± 0,03 <sup>++&amp;</sup>

Valores de Média ± EPM.

\* $P < 0,05$  em relação Sham – Semana 0 e Sham - semana 3;

<sup>+</sup> $P < 0,05$  em relação 2R-1C – Semana 0;

<sup>&</sup> $P < 0,05$  em relação 2R-1C - semana 3 e Sham - semana 6.



**Figura 23. Respostas de frequência cardíaca e do ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco de animais 2R-1C e sham.**

(A) Valores de frequência cardíaca (FC), (C) do ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco em relação ao componente parassimpático (GRBe (FC) e (D) do ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco em relação ao intervalo de pulso (GRBe (IP)) registradas por rádio telemetria durante seis semanas nos grupos hipertensos (2R-1C) e sham (Sham). Valores de FC basais, valores da terceira e sexta semana após a colocação do clipe (B), GRBe (FC) (D) e GRBe (IP) (F).

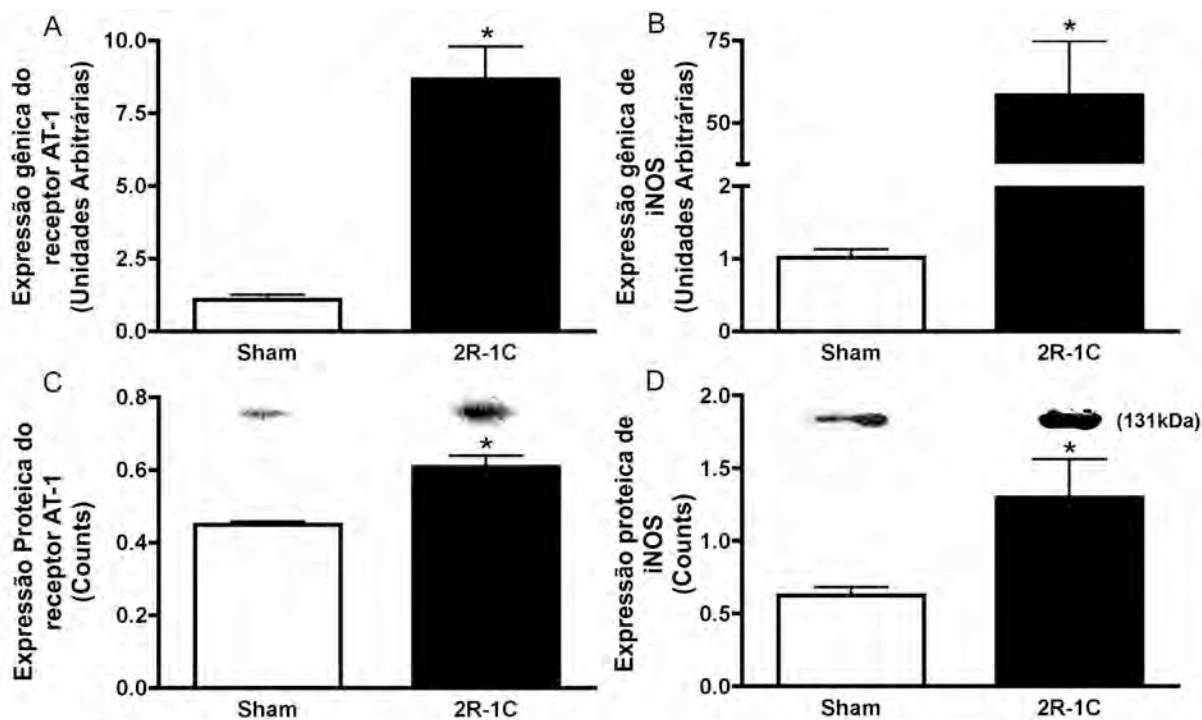
\* $P < 0,05$  em relação ao Sham - Basal e Sham - semana 3; \* $P < 0,05$  em relação 2R-1C - Basal;  $P < 0,05$  em relação 2R-1C - semana 3 e Sham - semana 6 (ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Tukey's).

## 4.2. Resultados da 2ª Série de Experimentos

### 4.2.1. Expressão gênica e protéica do receptor AT-1 e de iNOS na região RVL de ratos 2R-1C e sham

A expressão gênica do receptor AT-1 foi significativamente aumentada na região RVL nos animais hipertensos em relação ao grupo sham. Os valores obtidos para os animais hipertensos foram de  $7,8 \pm 1,0$  unidades arbitrárias (UA) e para os sham de  $0,8 \pm 0,1$  UA ( $P < 0,0005$ ), como demonstra a **figura 24A**. Além disso, a expressão protéica deste receptor também se apresentou significativamente elevada na região estudada nos animais hipertensos comparados com os sham (2R-1C:  $0,6 \pm 0,06$  Counts/ Sham:  $0,4 \pm 0,001$  C) (**Figura 24C**).

Na região RVL, a expressão gênica de iNOS apresentou-se significativamente elevada nos animais hipertensos ( $58,3 \pm 16,5$  UA) em comparação com os animais sham ( $1,0 \pm 0,1$  UA) ( $P < 0,02$ ), como demonstra a **figura 24B**. Este aumento foi evidenciado também na expressão protéica de iNOS na região RVL. Os valores dos animais hipertensos foram  $1,2 \pm 0,5$  C e dos animais sham  $0,6 \pm 0,1$  C ( $P < 0,04$ ) (**Figura 24D**).



**Figura 24. Expressão gênica e protéica do receptor AT-1 e de iNOS na região RVL de ratos 2R-1C e sham.**

(A) Quantidade relativa de mRNA do receptor AT-1 e (B) de iNOS na região RVL de animais sham (n = 5) e hipertensos (n = 5) em unidades arbitrárias avaliados por PCR em tempo real. Valores de Western Blot do receptor AT-1 (C) e de iNOS (D) na região RVL de animais sham (n = 3) e hipertensos (n = 4).

\* $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham (Teste *t* de Student).

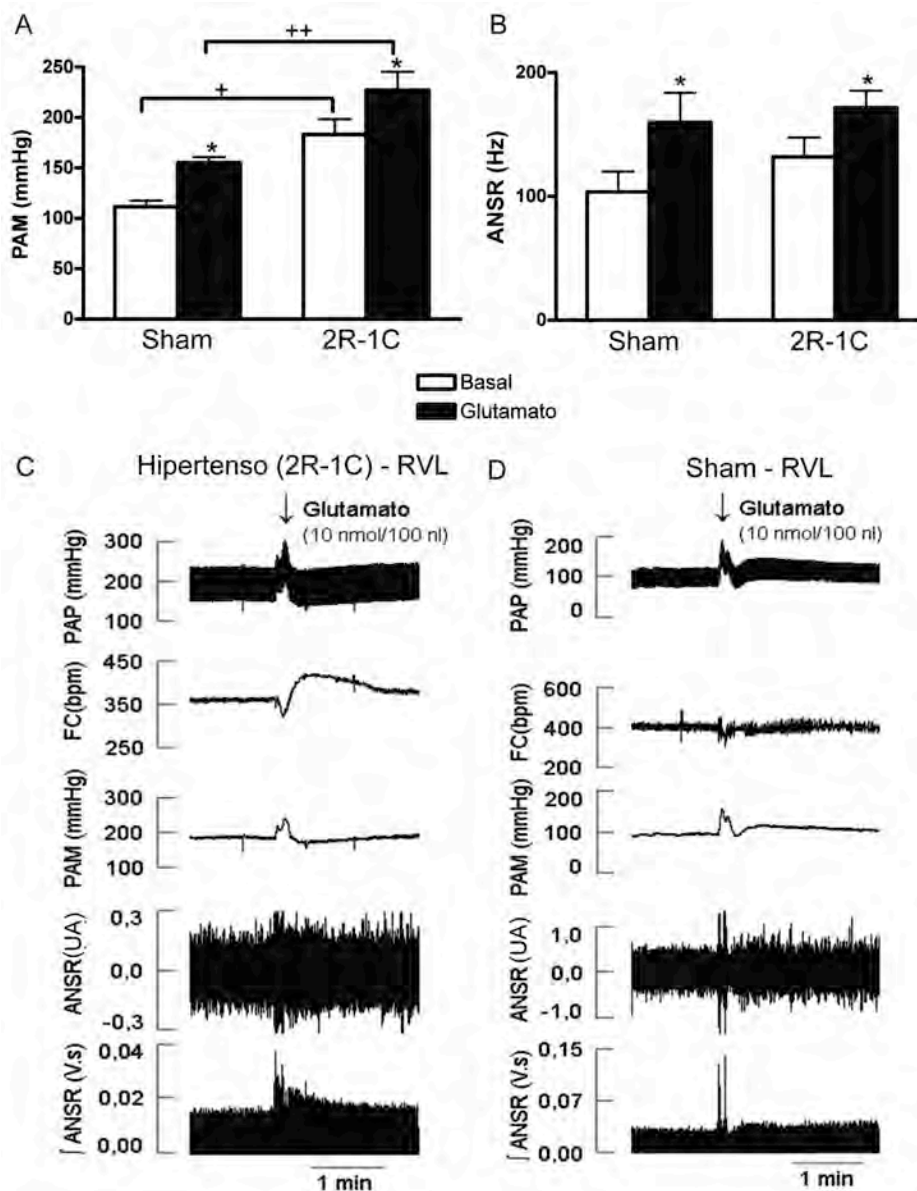
#### **4.2.2. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Losartan na região RVL nos animais 2R-1C e sham**

Para confirmar a localização da região RVL foram realizadas previamente nanoinjeções bilaterais do aminoácido excitatório L-glutamato (10 nmol/100 nL). As nanoinjeções de glutamato nos animais hipertensos produziram aumento significativo da PAM (mínimo de 15 e máximo de 45 mmHg, média de  $44 \pm 4$  mmHg) e discreta bradicardia, porém não significativa (mínimo de 8 e máximo de 24 bpm, média de  $15 \pm 6$  bpm). A resposta pressórica iniciou-se durante a nanoinjeção, teve seu pico em aproximadamente 10 segundos e manteve-se acima dos níveis basais por aproximadamente 30 segundos (**Figura 25A**).

Nos animais sham também se evidenciou aumento da PAM (mínimo de 30 e máximo de 75 mmHg, média de  $38 \pm 6$  mmHg) e queda na FC (mínimo de 5 e máximo de 26 bpm, média de  $17 \pm 6$  bpm). A resposta de PAM foi imediata e permaneceu acima dos valores basais por aproximadamente 60 segundos, e o pico de hipertensão ocorreu em aproximadamente 10 segundos, como mostra o traçado típico da **figura 25D**.

Portanto, nos dois grupos houve aumento significativo da PAM após a nanoinjeção de glutamato, entretanto a resposta pressora entre os grupos não foi estatisticamente diferente.

Quando comparada a ANSR dos grupos hipertensos e sham, observou-se um aumento significativo em ambos os grupos ao glutamato. A ANSR nos animais hipertensos aumentou de  $132 \pm 15$  para  $171 \pm 13$  Hz, enquanto nos sham de  $103 \pm 16$  para  $159 \pm 23$  Hz (**Figura 25B**).



**Figura 25. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Glutamato na região RVL nos animais 2R-1C e sham.**

(A) Comparação de pressão arterial média (PAM) e (B) de atividade nervosa simpática renal (ANSR) antes e após à nanoinjeção de Glutamato (10 nmol/ 100 nL) na região RVL em animais hipertensos (2R-1C n=5) e sham (n =4). Traçados típicos das respostas de pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade simpática renal ( $\int$ ANSR) à nanoinjeção bilateral de Glutamato na região RVL em um animal hipertenso (C) e em um sham (D).

\* $P < 0,05$  dentro do grupo, antes e após Glutamato; \* $P < 0,05$  entre grupos antes da Glutamato. \*\* $P < 0,05$  entre grupos após a Glutamato (ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Bonferroni's).

A nanoinjeção bilateral de Losartan (10 nmol/ 100 nL) na região RVL, causou uma redução lenta e gradativa da PAM nos animais hipertensos com duração de até 30 minutos. Entretanto, o grupo sham não sofreu modificações em resposta ao losartan. Da mesma forma, não houve modificações significantes na FC em ambos os grupos estudados.

A resposta hipotensora só iniciou cerca de 15 minutos após a injeção, com redução da PAM de  $180 \pm 8$  para  $168 \pm 8$  mmHg, equivalente a uma queda de  $6 \pm 4$  % em relação ao basal. Esta queda continuou lenta e gradativa até 30 minutos, chegando a  $11 \pm 6$  % (de  $180 \pm 8$  para  $162 \pm 8$  mmHg,  $P < 0,05$ ), como mostra a **figura 26A**. No grupo sham, como mencionado acima, não houve alterações significantes após a nanoinjeção.

Além disso, a FC não apresentou alterações significantes tanto no grupo hipertenso como no sham. No início do experimento, os hipertensos apresentaram uma FC de  $408 \pm 8$  bpm e no final de  $393 \pm 9$  bpm, já os sham  $386 \pm 11$  bpm no início e  $423 \pm 27$  bpm no final do experimento (**Tabela 8**).

Logo após a nanoinjeção bilateral de Losartan na RVL, observou-se uma queda da ANSR não significante tanto nos animais hipertensos, como nos sham (de  $-5 \pm 2$  %). Entretanto, essa redução continuou lentamente até os 30 minutos observados no grupo 2R-1C. No tempo 15 minutos, houve uma diminuição da ANSR com forte tendência à significância ( $-16 \pm 1$  %,  $P < 0,07$ ) em relação ao grupo sham, sendo que esta diferença se tornou significativa apenas após 30 minutos da nanoinjeção ( $-18 \pm 2$  %,  $P < 0,05$ ), como mostra a **figura 26B**.

Os animais sham não apresentaram grandes variações na ANSR ao longo do experimento. A **figura 26** mostra uma resposta típica à nanoinjeção bilateral de Losartan na RVL de um animal hipertenso (**C**) e um animal sham (**D**).

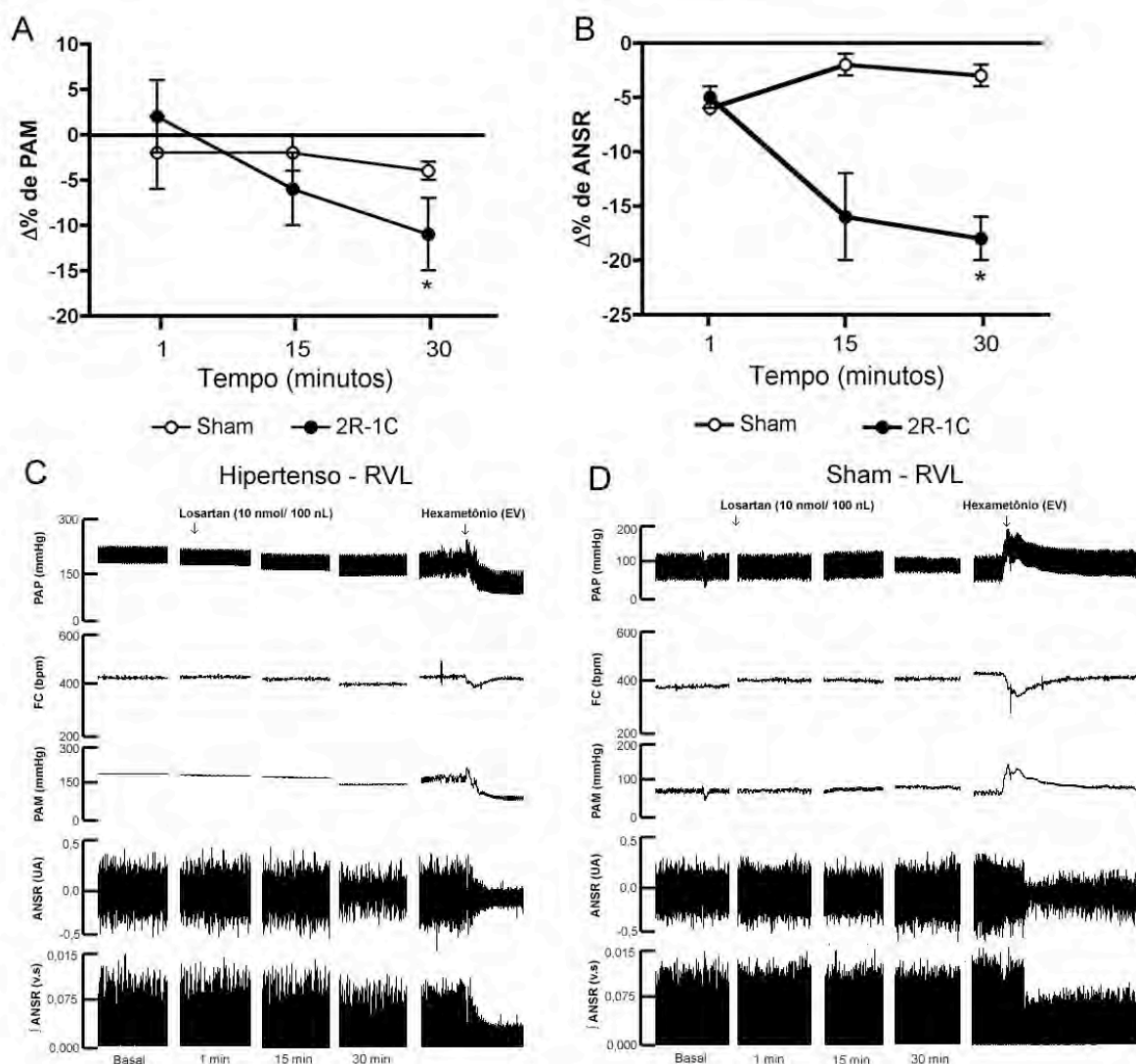
**Tabela 8. Valores de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e de atividade nervosa simpática renal (ANSR) analisados em resposta à nanoinjeção bilateral de Losartan (10 nmol/ 100 nL) na região RVL nos animais 2R-1C e Sham.**

Minutos	PAM (mmHg)		FC (bpm)		ANSR (Hz)	
	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C
<b>0</b>	118 ± 9	180 ± 8	393 ± 9	408 ± 8	103 ± 9	235 ± 3
<b>1</b>	115 ± 13	184 ± 4	404 ± 13	412 ± 7	95 ± 2	232 ± 3
<b>15</b>	115 ± 6	168 ± 8	410 ± 6	415 ± 4	100 ± 6	197 ± 1
<b>30</b>	115 ± 11	162 ± 4 <sup>*</sup>	386 ± 16	413 ± 14	99 ± 2	192 ± 1 <sup>*</sup>

Valores de Média ± EPM.

*\*P<0,05 em relação Sham;*





**Figura 26. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Losartan na região RVL nos animais 2R-1C e sham.**

(A) Valores de delta percentual de pressão arterial média (PAM) e (B) delta percentual de atividade nervosa simpática renal (ANSR) 1, 15 e 30 minutos após a nanoinjeção bilateral na região RVL de Losartan 10 nmol/ 100 nL no grupo hipertenso ( $n = 5$ ) e no grupo sham ( $n = 4$ ). Traçados típicos das respostas de pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade simpática renal ( $\int$ ANSR) à nanoinjeção bilateral de Losartan na região RVL em um animal hipertenso (C) e um sham (D).

\* $P < 0,05$  em relação ao sham (ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Bonferroni's).

#### **4.2.3. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina na região RVL nos animais 2R-1C e sham**

No grupo hipertenso, a maior redução da PAM foi observada após 45 minutos da nanoinjeção de Aminoguanidina (250 pmol/ 100 nL) (de  $188 \pm 8$  para  $128 \pm 15$  mmHg), a qual representou uma queda de  $31 \pm 9\%$ ,  $P < 0,05$ . Entretanto, ao final de 60 minutos de observação, a PAM apresentou tendência a retornar aos seus valores basais ( $146 \pm 9$  mmHg).

Nos animais sham, a concentração de Aminoguanidina utilizada não produziu variações importantes na PAM e FC, como mostram a **tabela 9** e **figura 27A**. Além disso, não ocorreram variações importantes na FC nos dois grupos observados após a nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina na RVL.

Ao administrar-se Aminoguanidina na região RVL foi observada uma diminuição significativa na ANSR nos animais hipertensos de  $34 \pm 8\%$  em relação aos animais sham, somente 45 minutos após a nanoinjeção. Por outro lado, nos animais sham, não foram observadas grandes alterações. Os valores de variação da ANSR estão representados na **tabela 9** e os deltas percentuais na **figura 27B**.

A **figura 28** mostra uma resposta representativa à nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina na região RVL em um animal hipertenso (**28A**) e sham (**28B**).

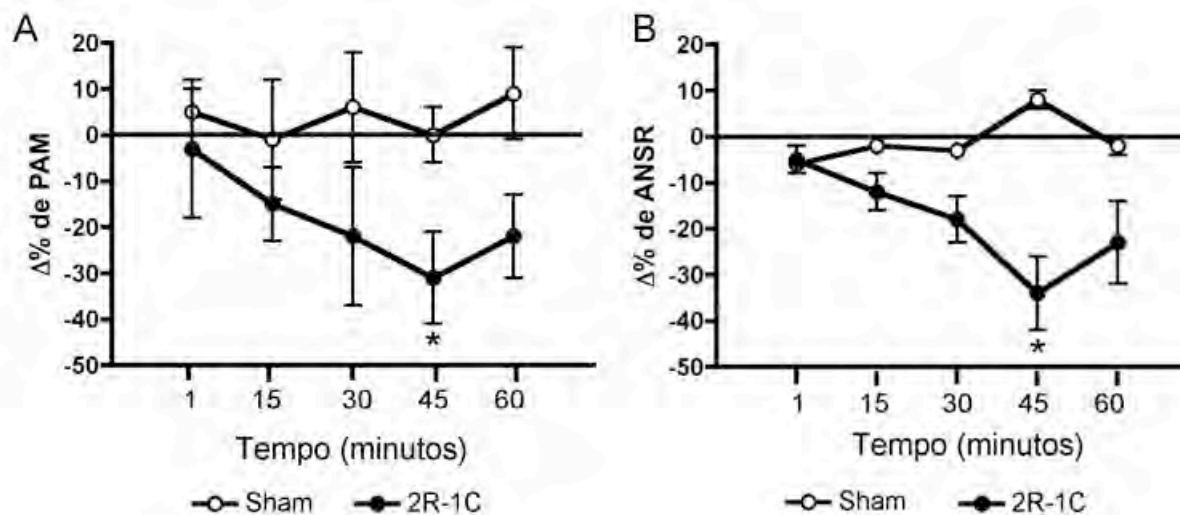
Os grupos 2R-1C e sham nos quais foram nanoinjetados salina na região RVL não apresentaram alterações nos parâmetros analisados.

**Tabela 9. Valores de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e de atividade nervosa simpática renal (ANSR) analisados em resposta à nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina (250 pmol/ 100 nL) na região RVL nos animais 2R-1C e Sham.**

Minutos	PAM (mmHg)		FC (bpm)		ANSR (Hz)	
	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C
<b>0</b>	109 ± 9	188 ± 8	392 ± 9	371 ± 8	103 ± 9	235 ± 3
<b>1</b>	115 ± 13	182 ± 4	396 ± 13	377 ± 7	95 ± 2	232 ± 3
<b>15</b>	107 ± 5	158 ± 9	416 ± 6	402 ± 4	100 ± 6	224 ± 1
<b>30</b>	116 ± 11	146 ± 8	441 ± 11	391 ± 14	99 ± 2	219 ± 1
<b>45</b>	109 ± 12	128 ± 15*	414 ± 9	361 ± 5	102 ± 5	190 ± 5*
<b>60</b>	119 ± 11	146 ± 9	419 ± 6	363 ± 3	100 ± 6	189 ± 4

Valores de Média ± EPM.

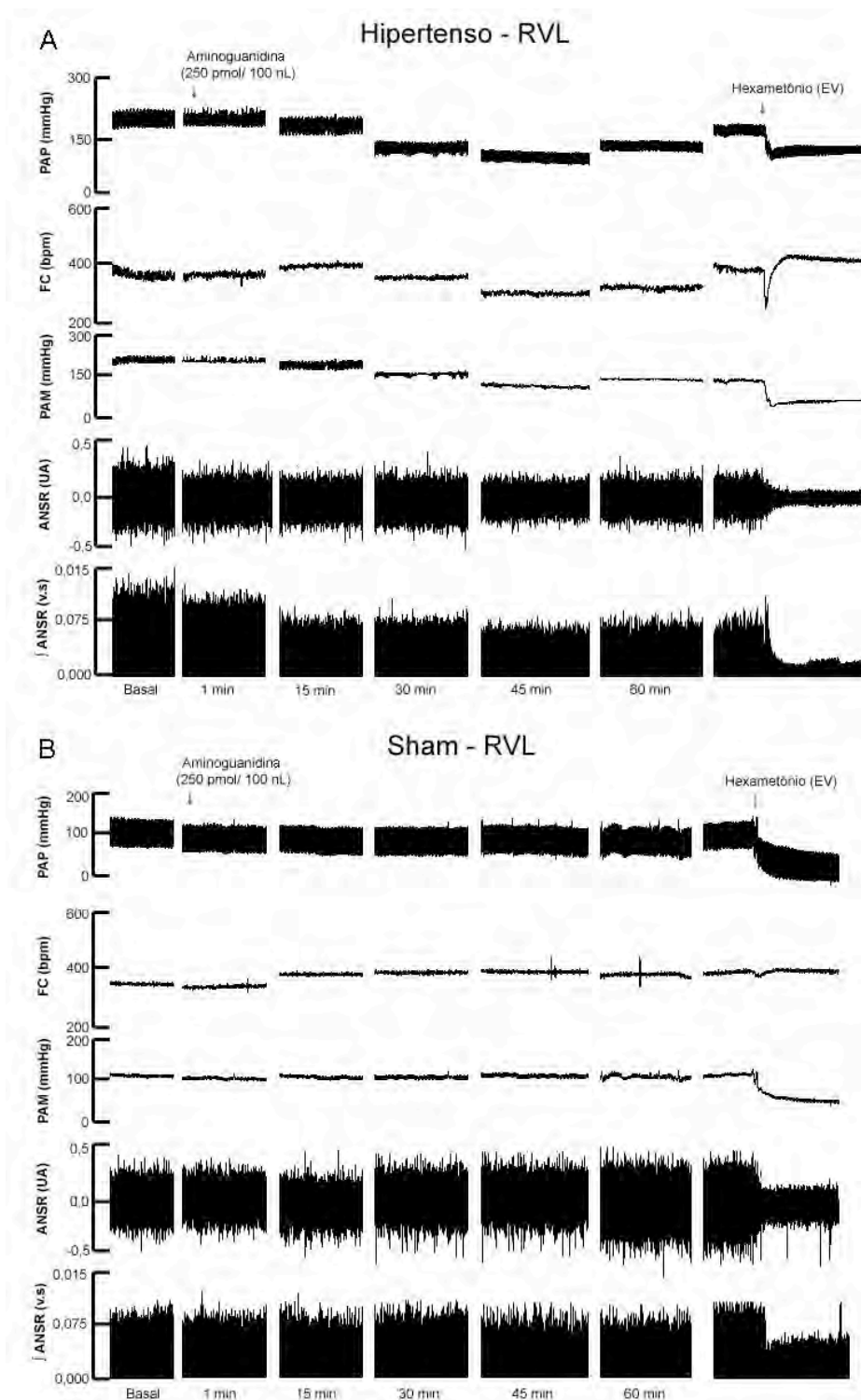
\* $P < 0,05$  em relação Sham;



**Figura 27. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina na região RVL nos animais 2R-1C e sham.**

(A) Valores de delta percentual de pressão arterial média (PAM) e (B) delta percentual de atividade nervosa simpática renal (ANSR) 1, 15, 30, 45 e 60 minutos após a nanoinjeção bilateral na região RVL de Aminoguanidina 250 pmol/ 100 nL no grupo hipertenso ( $n = 3$ ) e no grupo sham ( $n = 4$ ).

\* $P < 0,05$  em relação ao sham (ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Dunnet's).

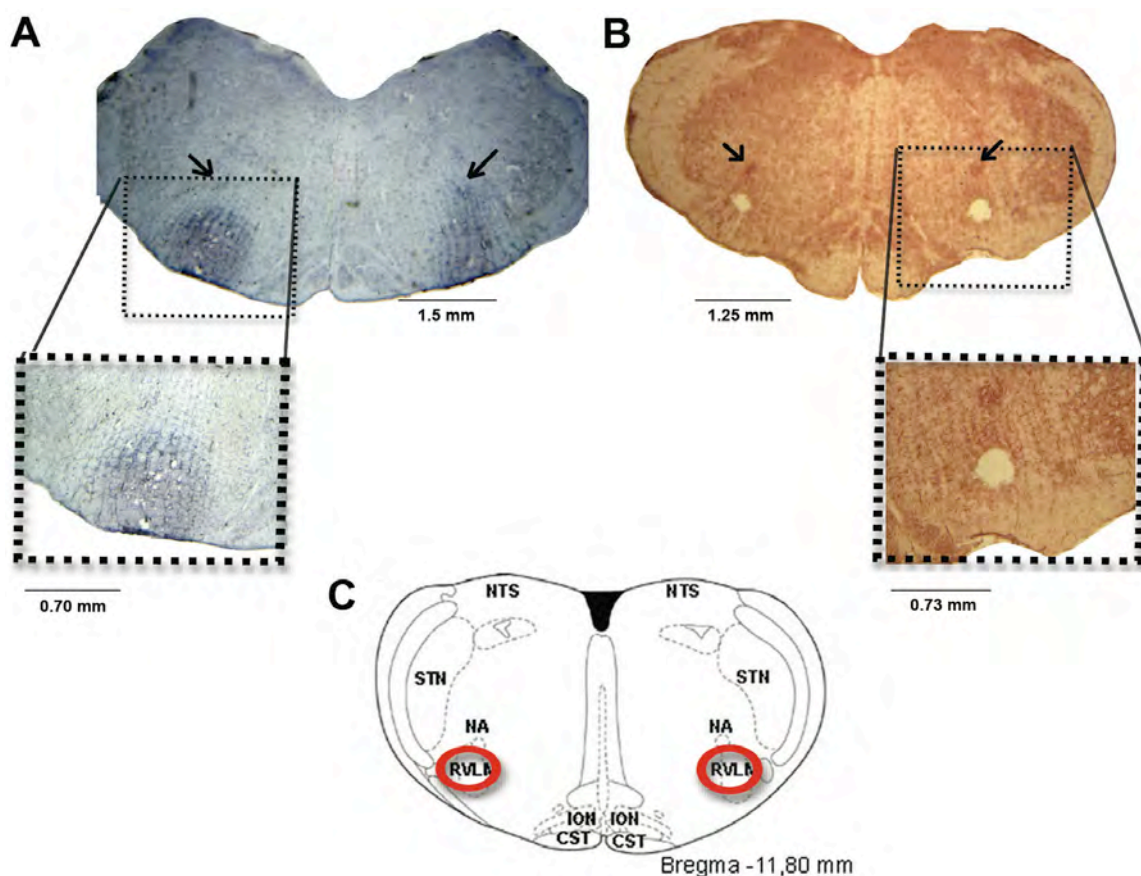


**Figura 28. Traçado representativo das respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina na região RVL em um animal 2R-1C e um sham.**

Traçados típicos das respostas de pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade simpática renal ( $\int$ ANSR) à nanoinjeção bilateral de Aminoguanidina na região RVL em um animal hipertenso (A) e um sham (B).

#### 4.2.4. Comprovação histológica da nanoinjeção de Azul de Evans e dos punches realizados na região RVL

A figura a seguir representa um corte coronal histológico da região RVL. Quando a difusão do azul de Evans (**A**) ou o *punche* (**B**) foi visualizada ventralmente ao núcleo ambíguo (NA) e lateralmente ao núcleo inferior olivar (ION), foi considerada histologia positiva. Em **C**, encontra-se o esquema representativo da região RVL segundo o Atlas de Paxinos (1984).



**Figura 29. Comprovação histológica dos sítios de injeção e dos *punches* realizados na região RVL.**

Representação de um corte histológico coronal do local do sítio de injeção de azul de Evans na região RVL (**A**), um corte histológico coronal do local do *punche* (**B**) e esquema representativo do na região RVL (**C**). As setas indicam o núcleo ambíguo (NA); ION: núcleo olivar inferior; NTS: núcleo do trato solitário, STN: núcleo trigêmio espinal, CST: trato cortico espinal.

### 4.3. Resultados da 3ª Série de Experimentos

#### 4.3.1. Análise da expressão gênica das subunidades da NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD e receptor AT-1 nas regiões RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e sham

A quantificação da expressão de mRNA de p47phox tanto na região RVL como no PVN em animais hipertensos está significativamente aumentada em relação ao grupo sham. Os valores de CTs encontrados na região RVL para hipertensos foram de  $21,8 \pm 3,6$  e para animais sham de  $1,0 \pm 0,1$  UA. No PVN os valores encontrados para animais hipertensos foram de  $35,9 \pm 13,9$  e  $1,0 \pm 0,2$  para animais sham. Em relação ao CN, a expressão gênica da subunidade p47phox foi semelhante tanto nos animais sham, como nos animais hipertensos (Sham:  $1,21 \pm 0,3$  UA / 2R-1C:  $1,45 \pm 0,4$  UA), como mostra a **figura 30A**.

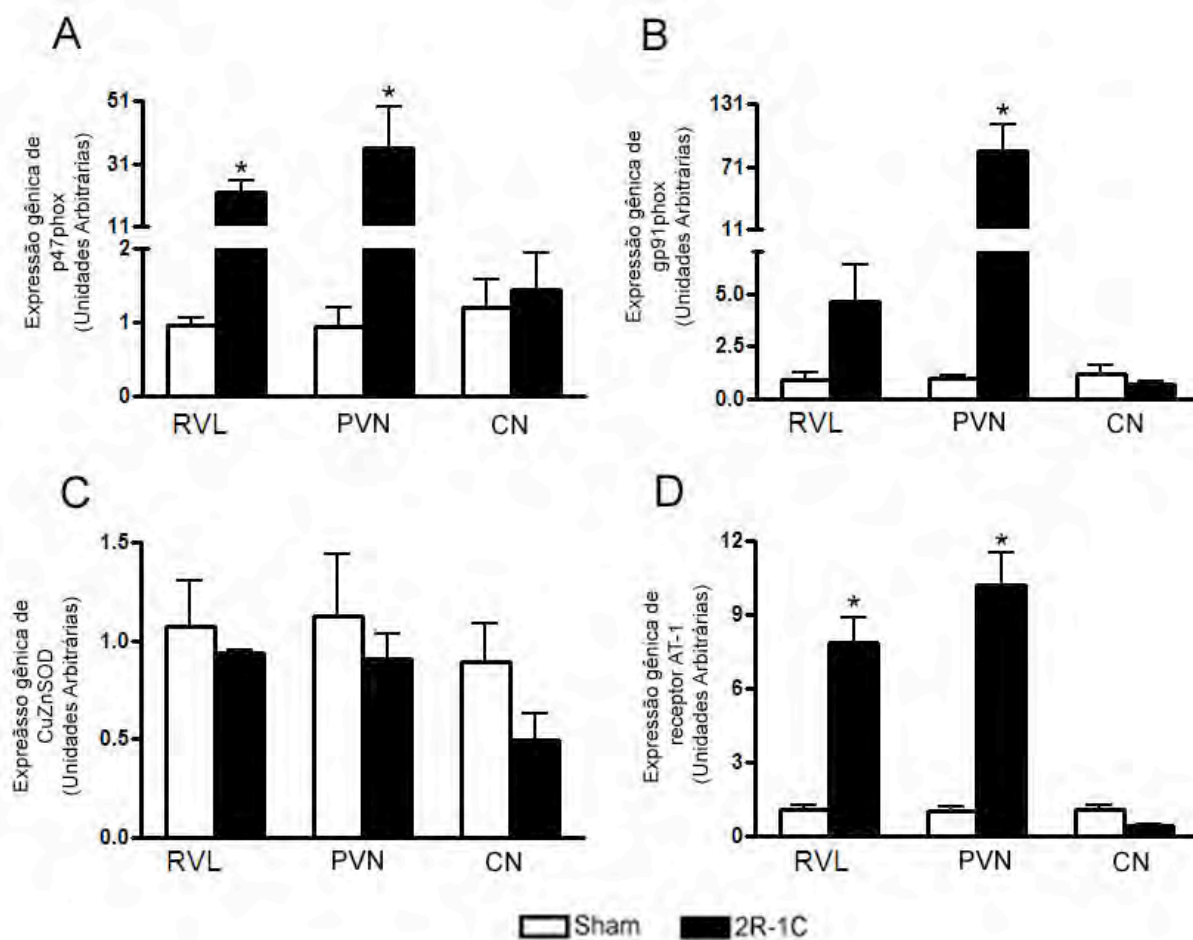
A quantificação por RT-PCR quantitativo em Tempo Real mostrou que a gp91phox em animais hipertensos está significativamente aumentada em relação ao grupo sham apenas na região do PVN, (2R-1C  $85,8 \pm 25,4$  e sham  $1,0 \pm 0,1$  UA,  $P < 0,01$ ), como demonstra a **figura 30B**. Na região RVL também houve aumento nos animais hipertensos, entretanto, este aumento apenas apresentou uma tendência a ser significativo ( $P = 0,07$ ), em relação ao grupo sham (Sham:  $1,0 \pm 0,2$  / 2R-1C:  $4,6 \pm 1,8$  UA). Em relação à região CN, a expressão da subunidade gp91phox não diferiu entre os grupos 2R-1C e sham (Sham:  $1,22 \pm 0,41$  UA / 2R-1C:  $0,75 \pm 0,13$  UA).

Não foi observado diferenças na expressão gênica de CuZnSOD em animais hipertensos em relação aos animais sham na região do RVL (2R-1C:  $0,9 \pm 0,01$  e Sham  $0,85 \pm 0,2$  UA). Entretanto, no PVN houve redução não significativa na expressão no grupo hipertenso em relação ao sham (Sham:  $1,0 \pm 0,2$  e 2R-1C:  $0,6 \pm 0,08$  UA), como demonstra a **figura 30C**. Em relação à região CN, a expressão da CuZnSOD também foi semelhante tanto nos animais sham, como nos animais hipertensos (Sham:  $0,89 \pm 0,20$  UA / 2R-1C:  $0,50 \pm 0,13$  UA).

Portanto, estes resultados sugerem que há um desequilíbrio entre a produção de ROS e o sistema antioxidante na região RVL e no PVN dos animais hipertensos, caracterizando um estado de estresse oxidativo nestas regiões.

A quantificação do receptor AT-1 por RT-PCR quantitativo em Tempo Real mostrou aumento significativo em animais hipertensos em relação ao grupo sham tanto na região RVL como no PVN. Na região RVL os valores obtidos para animais hipertensos foram de  $7,8 \pm 1,0$  e para os sham de  $0,85 \pm 0,1$  UA ( $P < 0,0005$ ), como demonstra a **figura 30D**. Na região do PVN os valores para animais hipertensos foram de  $10,1 \pm 1,3$  e para os sham de  $1,1 \pm 0,1$  UA ( $P < 0,004$ ). Em relação à região CN, a expressão gênica do receptor AT-1 não diferiu entre os grupos estudados (Sham:  $1,07 \pm 0,20$  UA / 2R-1C:  $0,40 \pm 0,10$  UA).





**Figura 30.** Expressão gênica das subunidades de NADP(H)oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD e receptor AT-1 nas regiões RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e sham.

Quantidade relativa de mRNA de p47phox (A), gp91phox (B), CuZnSOD (C) e receptor AT-1 (D) nas regiões de RVL, PVN e CN de animais sham (n = 5) e hipertensos (n = 5) em unidades arbitrárias resultantes de PCR em tempo real.

\* $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham (ANOVA One-Way seguida pelo pós-teste de Newman – Keuls method).

#### **4.3.2. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Tempol na RVL nos animais 2R-1C e sham**

Para confirmar a localização da região RVL foram realizadas previamente nanoinjeções bilaterais do aminoácido excitatório L-glutamato (10 nmol/100 nL). Quando se observou um aumento mínimo de 30 mmHg da PAM foi considerada a localização positiva, e as nanoinjeções de Tempol foram realizadas de forma randômica (1 e 5 nmol/100 nL).

No grupo hipertenso, a menor concentração de Tempol (1 nmol) causou a maior diminuição da PAM (de  $166 \pm 13$  para  $141 \pm 13$  mmHg) em relação a maior concentração, o qual representou uma queda de  $15 \pm 1\%$ ,  $P < 0,03$ . Tempol (5 nmol) reduziu significativamente PAM (de  $155 \pm 14$  para  $136 \pm 18$  mmHg), equivalente à uma queda de  $12 \pm 4\%$ ,  $P < 0,03$ .

Nos animais sham, as duas concentrações de Tempol (1 e 5 nmol) produziram um variações de PAM, porém não significante. A pressão após a nanoinjeção de Tempol (1 nmol) variou de  $100 \pm 1$  para  $93 \pm 3$  mmHg, já a administração de Tempol (5 nmol) de  $100 \pm 2$  para  $97 \pm 0,9$  mmHg. Os deltas de variação da PAM estão representados na **figura 31A**.

Não ocorreram variações importantes na FC nos dois grupos observados após as nanoinjeções de Tempol 1 e 5 nmol na RVL.

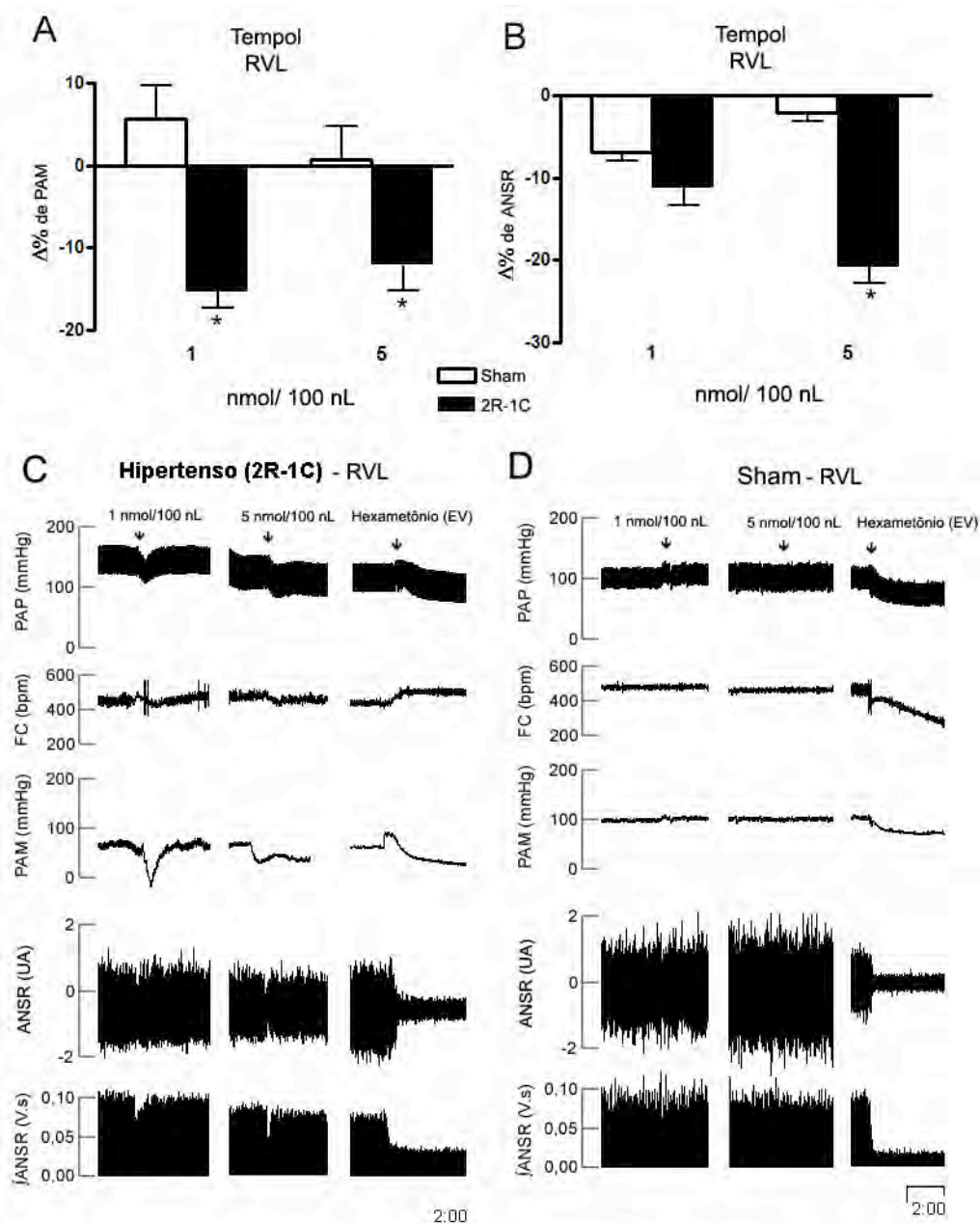
Ao administrar-se Tempol (1 nmol) na RVL foi observada uma diminuição na ANSR tanto nos animais hipertensos ( $11 \pm 2\%$ ) como nos sham ( $7 \pm 1\%$ ). A administração de Tempol (5 nmol) diminuiu significativamente a ANSR em  $20 \pm 7\%$ ,

$P < 0,0001$  apenas nos animais hipertensos. Por outro lado, nos sham, causou apenas uma ligeira redução da ANSR e  $2 \pm 2\%$ , como mostra a **figura 31B**.

Os grupos 2R-1C e sham nos quais foram nanoinjetados salina na região RVL não apresentaram alterações nos parâmetros analisados.

A **figura 31** mostra uma resposta típica à nanoinjeção bilateral de Tempol na região RVL (1 e 5 nmol/100 nL) em um animal hipertenso (**31C**) e sham (**31D**).

Portanto, estes resultados sugerem que o estresse oxidativo na região RVL está envolvido na geração da hipertensão arterial e hiperatividade simpática no modelo de hipertensão 2R-1C.



**Figura 31. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção bilateral de Tempol na região RVL nos animais 2R-1C e sham.**

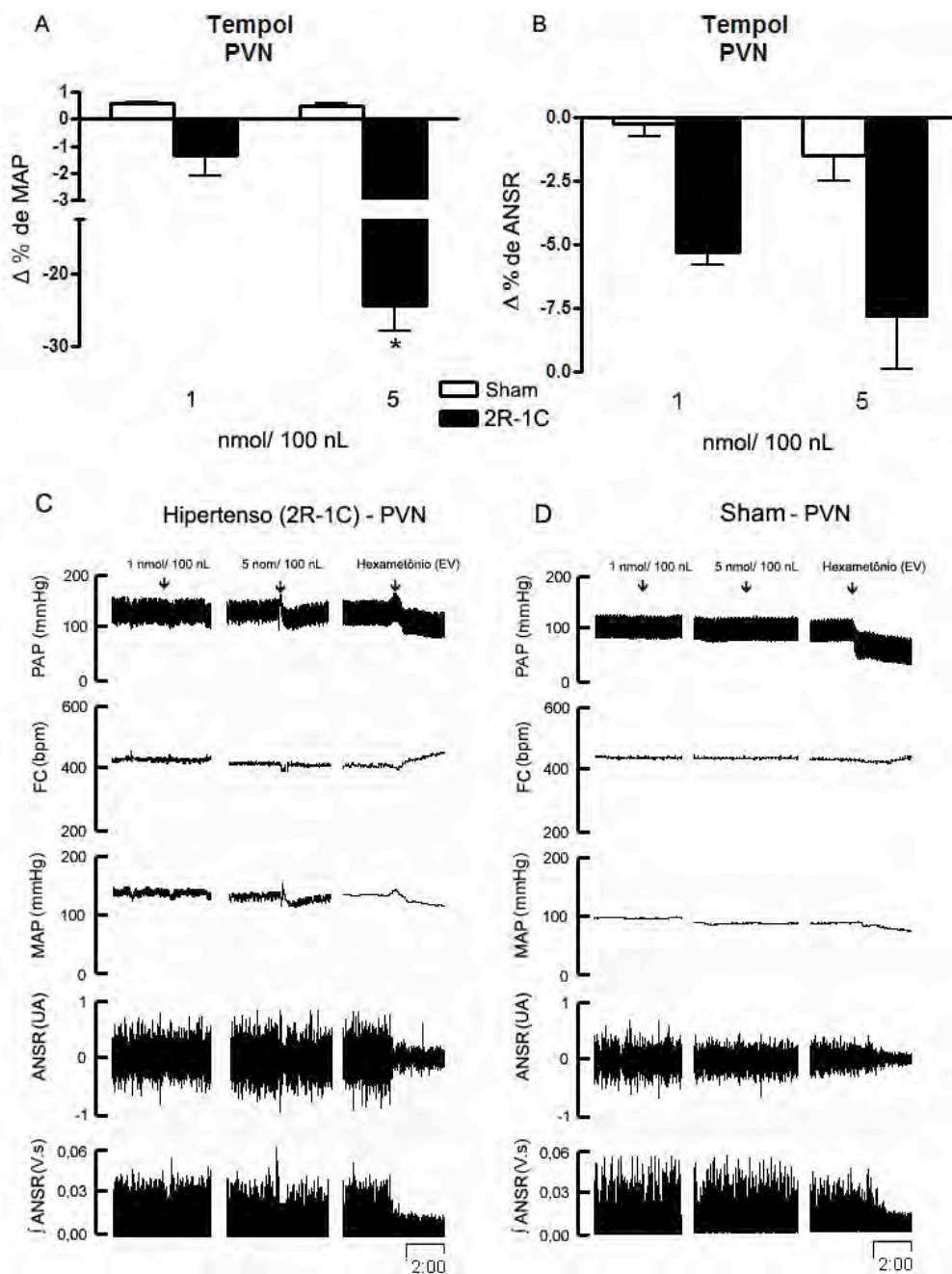
(A) Valores de delta de queda percentual de pressão arterial média (PAM) e (B) delta de queda percentual de atividade nervosa simpática renal (ANSR) após a nanoinjeção bilateral de Tempol 1 e 5 nmol/100 nL na região RVL no grupo hipertenso ( $n = 5$ ) e no grupo sham ( $n = 5$ ). Traçados típicos das respostas de pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade simpática renal ( $\int$ ANSR) à microinjeção bilateral de Tempol na região RVL (1 e 5 nmol/100 nL) em um animal hipertenso (C) e um sham (D).

\* $P < 0,05$  em relação basal (ANOVA One-Way seguida pelo pós-teste de Newman – Keuls method).

### **4.3.3. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção unilateral de Tempol na PVN em animais 2R-1C e sham**

O Tempol foi nanoinjetado no PVN unilateralmente, as respostas obtidas não diferiram entre lados, portanto, os dados apresentados abaixo mostram os dados referentes à administração de Tempol no PVN esquerdo. Tempol (1 nmol) nanoinjetado no do PVN nos animais hipertensos não produziu alteração significativa de PAM (de  $156 \pm 8$  para  $155 \pm 8$  mmHg). Entretanto, a maior concentração de Tempol (5 nmol) resultou numa queda significativa da PAM de  $148 \pm 7$  para  $124 \pm 8$  mmHg, equivalente a  $24 \pm 1$  %. Nos animais sham, as duas concentrações de Tempol nanoinjetados no PVN produziram um discreto aumento da PAM. Os deltas percentuais da PAM após as microinjeções unilaterais de Tempol 1 e 5 nmol no PVN estão representados na **figura 32A**. Não ocorreram variações importantes na FC nos dois grupos observados após as nanoinjeções de Tempol 1 e 5 no PVN.

Ao administrar-se Tempol (1 nmol) no do PVN observou-se uma queda da ANSR de 5,3%, nos animais hipertensos e uma discreta diminuição da ANSR nos animais sham ( $0,25 \pm 0,5$  %). Adicionalmente, Tempol (5 nmol) também provocou queda da ANSR apenas nos animais hipertensos ( $7,9 \pm 2\%$ ). Os deltas percentuais de ANSR após as microinjeções unilaterais de Tempol 1 e 5 nmol no PVN estão representados na **figura 32B**. Os grupos 2R-1C e sham nos quais foram nanoinjetados salina no PVN não apresentaram alterações nos parâmetros analisados. A **figura 32** mostra uma resposta típica a microinjeção de Tempol (1 e 5 nmol/100 nL) no lado esquerdo do PVN em um animal hipertenso (**C**) e sham (**D**).

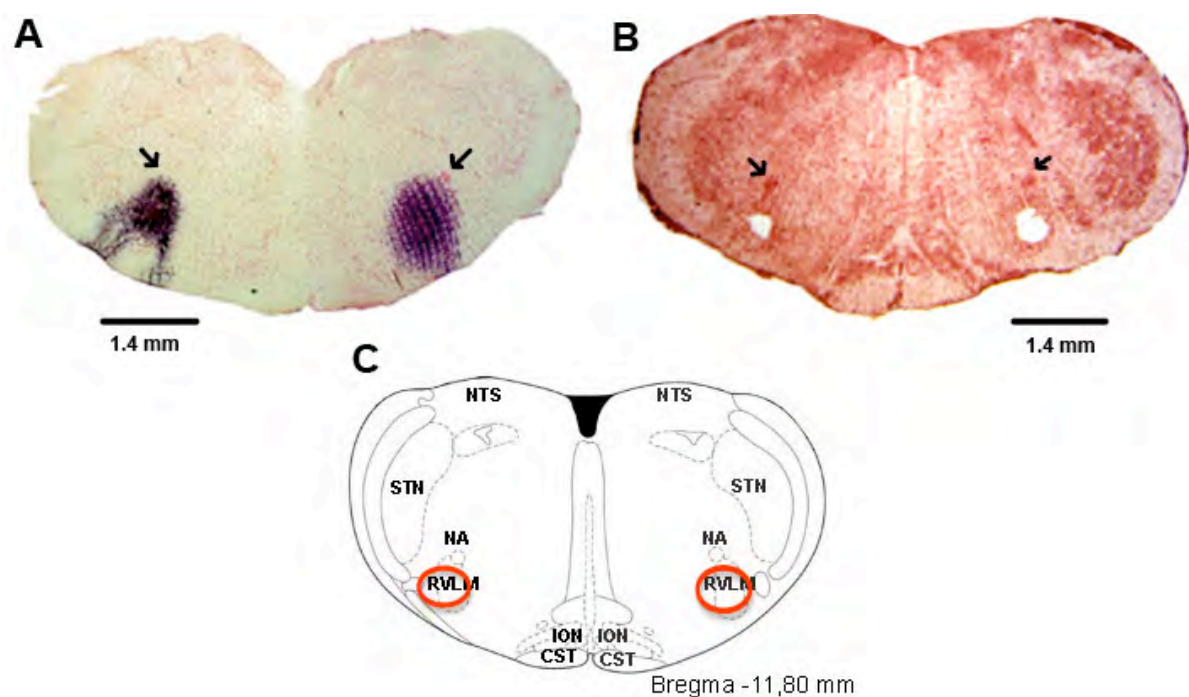


**Figura 32. Respostas cardiovasculares à nanoinjeção unilateral de Tempol no PVN nos animais 2R-1C e sham.**

(A) Valores de delta de queda percentual de pressão arterial média (PAM) e (B) delta de queda percentual de atividade nervosa simpática renal (ANSR) após a nanoinjeção unilateral no PVN de Tempol 1 e 5 nmol/100 nL no grupo hipertenso ( $n = 5$ ) e no grupo sham ( $n = 5$ ). Traçados típicos das respostas de pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade simpática renal ( $\int$ ANSR) à nanoinjeção bilateral de Tempol no PVN (1 e 5 nmol/100 nL) em um animal hipertenso (C) e um sham (D). \* $P < 0,05$  em relação basal (ANOVA One-Way seguida pelo pós-teste de Newman – Keuls method).

#### 4.3.4. Comprovação histológica dos sítios de injeção e do punche bilateral realizados nas regiões RVL e PVN

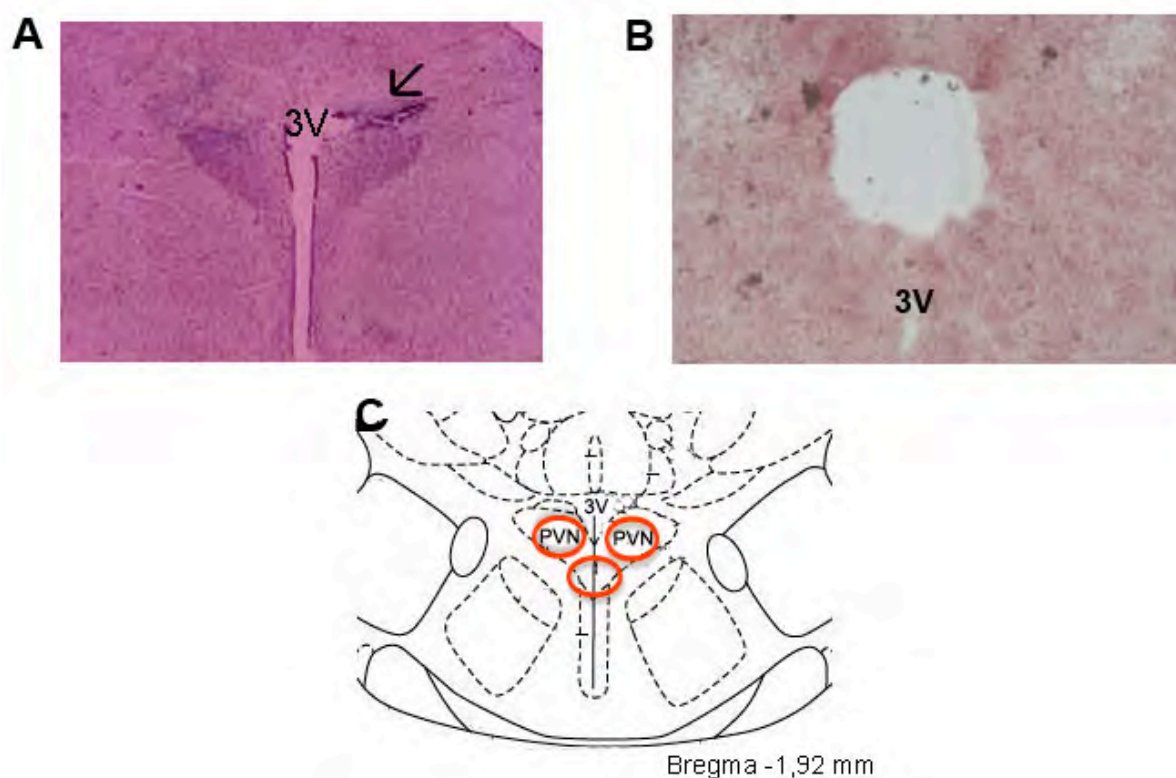
A figura a seguir representa um corte coronal histológico da região RVL. Quando a difusão do azul de Evans (**A**) ou o *punche* (**B**) foi visualizada ventralmente ao núcleo ambíguo (NA) e lateralmente ao núcleo inferior olivar (ION), foi considerada histologia positiva. Em **C**, encontra-se o esquema representativo da região RVL segundo o Atlas de Paxinos (1984).



**Figura 33. Comprovação histológica dos sítios de injeção e dos *punches* realizados na região RVL.**

Representação de um corte histológico coronal do local do sítio de injeção de azul de Evans na região RVL (**A**), um corte histológico coronal do local do *punche* (**B**) e esquema representativo do na região RVL (**C**). As setas indicam núcleo ambíguo (NA); ION: núcleo olivar inferior; NTS: núcleo do trato solitário, STN: núcleo trigêmio espinal, CST: trato cortico espinal

A figura a seguir representa um corte coronal histológico do PVN. Quando a difusão do azul de Evans **(A)** ou o *punche* **(B)** foi visualizada lateralmente ao terceiro ventrículo (3V) foi considerada histologia positiva. Em **C**, encontra-se o esquema representativo do PVN segundo o Atlas de Paxinos (1984).



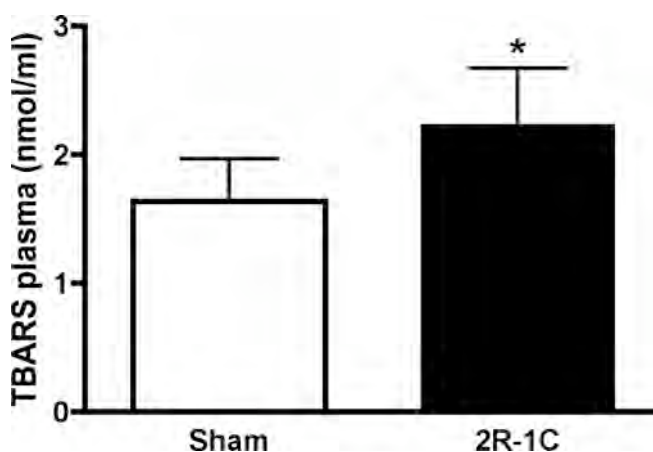
**Figura 34. Comprovação histológica dos sítios de injeção e dos *punches* realizados no PVN.**

Representação de um corte histológico coronal do local do sítio de injeção de azul de Evans unilateralmente no PVN **(A)**, um corte histológico coronal do local do *punche* **(B)** e esquema representativo do PVN **(C)**. 3V indica terceiro ventrículo.



#### 4.3.5. Resultados da avaliação de TBARS plasmático – indicativo indireto do estresse oxidativo

O resultado da quantificação plasmática do ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador de estresse oxidativo foi aumentado nos animais hipertensos (2R-1C:  $2,2 \pm 0,4$  vs. Sham  $1,6 \pm 0,3$  nmol/ml,  $P < 0,05$ ), conforme a **figura 35**.



**Figura 35.** Lipoperoxidação plasmática indicada pelos níveis de TBARS no grupo 2R-1C (n=9) e sham (n=8).

\* $P < 0,05$  em relação ao Sham (Teste *t* de Student).

#### **4.3.6. Respostas cardiovasculares à administração endovenosa de Tempol nos animais 2R-1C e sham**

A administração endovenosa de Tempol 10 e 30 mg/kg foi realizada por meio de uma bomba de infusão durante seis minutos e todos os parâmetros foram analisados até 30 minutos após o início da infusão.

No grupo hipertenso, a administração endovenosa de Tempol 10 mg/kg causou uma diminuição da PAM (de  $152 \pm 4$  para  $141 \pm 11$  mmHg) após seis minutos de infusão, o qual representou uma queda de  $7 \pm 1\%$ . Após a infusão, a PAM tendeu a se restabelecer abaixo dos valores basais. Porém, o grupo sham tratado com Tempol 10 mg/kg não apresentou alterações da PAM durante todo o período de observação. Quando comparados os dois grupos estudados tratados com Tempol 10 mg/kg, em todos os tempos, os grupos apresentaram-se diferentes entre si.

Tempol 30 mg/kg administrado no grupo hipertenso reduziu significativamente a PAM em  $23 \pm 4\%$  ( $164 \pm 9$  para  $125 \pm 10$  mmHg,  $P < 0,001$ ,  $n = 6$ ). Entretanto, nos animais sham tratados com Tempol 30 mg/kg apresentaram redução na PAM de  $10 \pm 2\%$ , conforme mostram as **figuras 36A e 36B**. Tanto nos animais hipertensos, como nos sham, nos quais administrou-se salina, não foram observadas alterações na PAM.

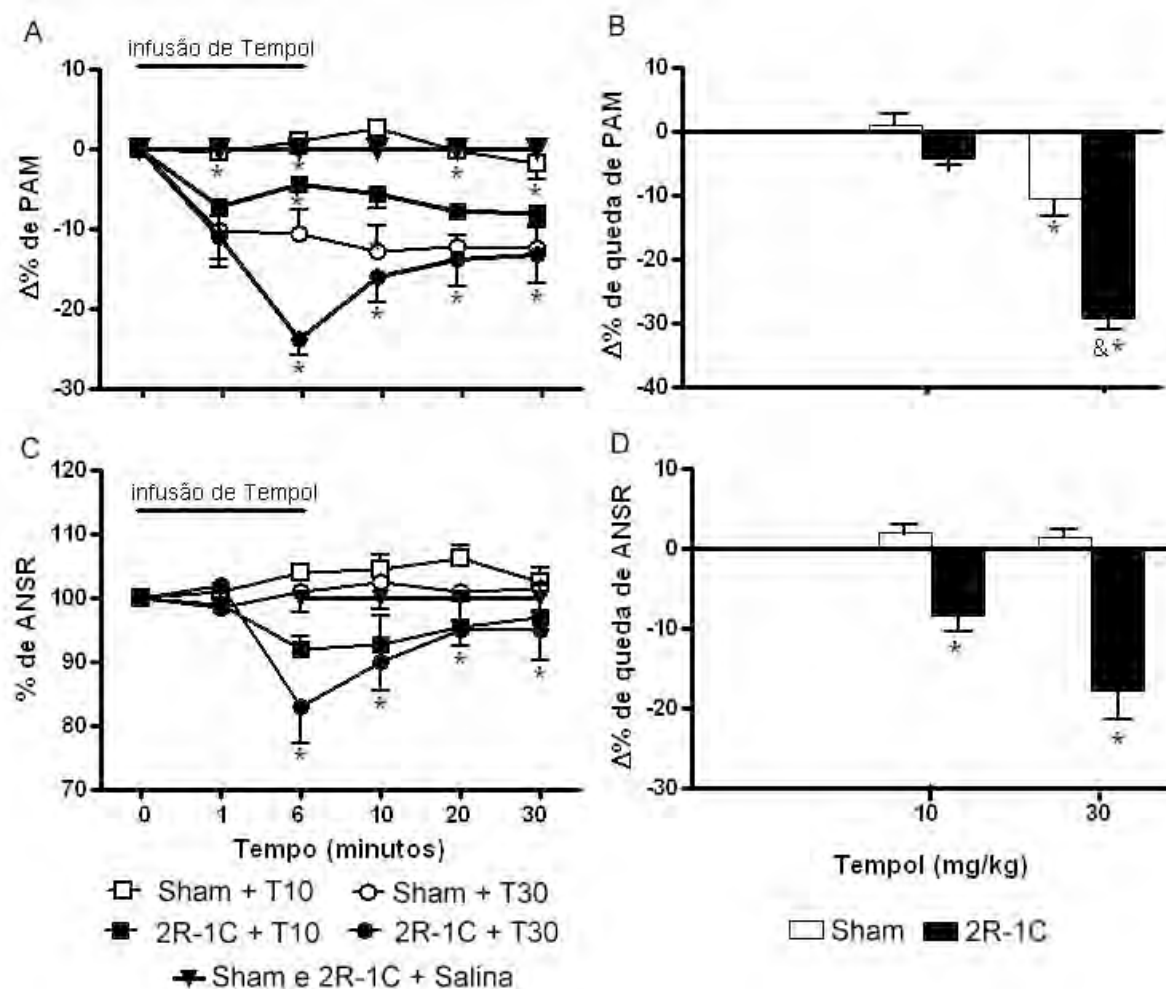
Ao administrar-se agudamente Tempol 10 mg/kg nos animais hipertensos, foi observada uma diminuição significativa na ANSR ( $8 \pm 2\%$ ,  $P < 0,02$ ) após seis minutos de infusão, enquanto os animais sham não apresentaram variação. A administração de Tempol 30 mg/kg diminuiu ainda mais a ANSR em  $17 \pm 7\%$ ,

$P < 0,04$  apenas nos animais 2R-1C, sem modificar o grupo sham, como mostram as **figuras 36C e 36D** abaixo. Tanto nos animais hipertensos como nos sham nos quais administrou-se salina, também não foram observadas alterações na ANSR.

Não ocorreram variações significantes na FC nos grupos observados durante a administração da Tempol 10 e 30 mg/kg.

A **figura 37** mostra uma resposta típica à administração de Tempol (10 mg/kg) EV (seis minutos) em um animal hipertenso (**37A**) e um animal sham (**37B**) e de Tempol (30 mg/kg) em um animal hipertenso (**37C**) e um animal sham (**37D**).

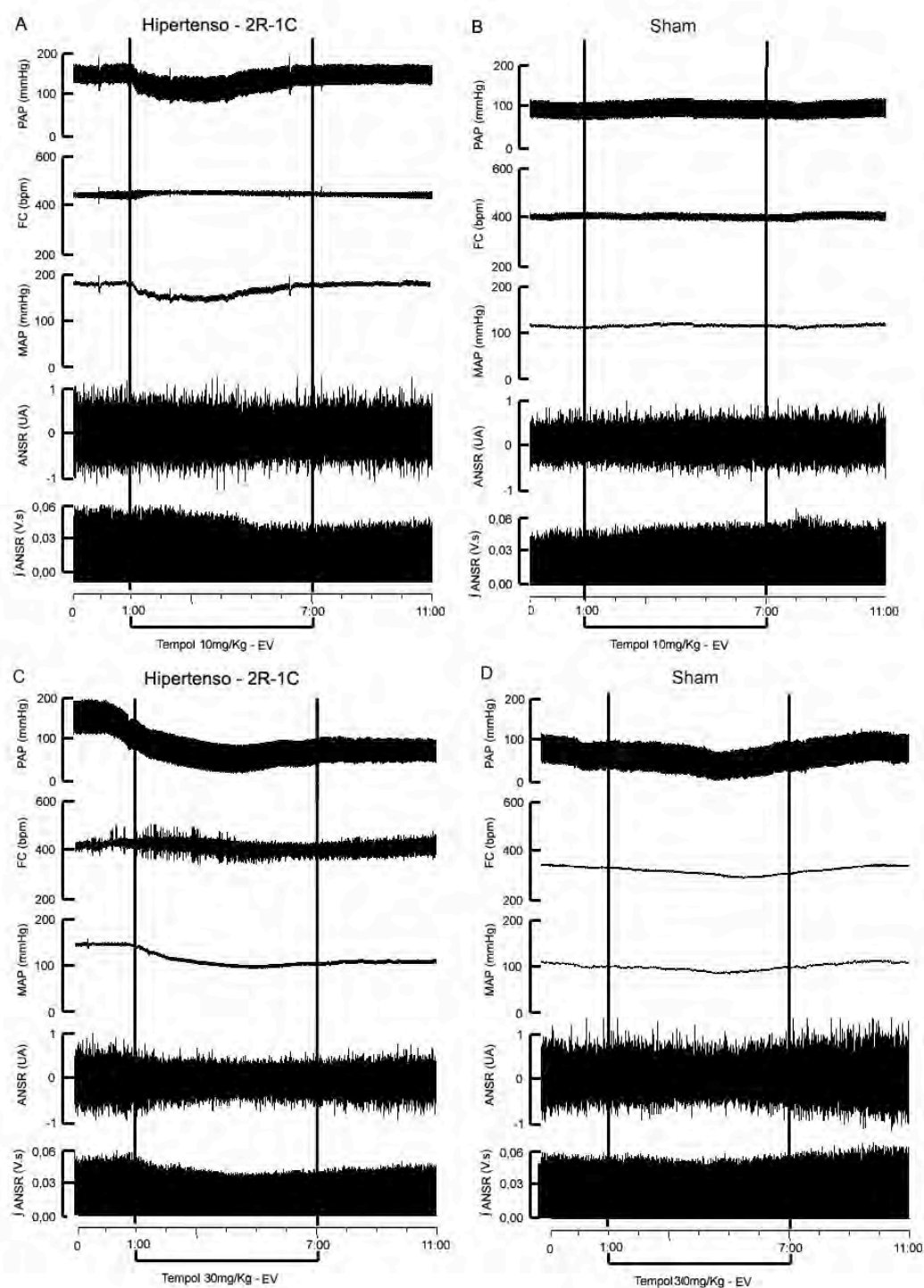
Portanto, a administração periférica de um antioxidante foi capaz de reduzir a atividade simpática e a pressão arterial de forma mais intensa em ratos 2R-1C do que no grupo sham.



**Figura 36. Respostas cardiovasculares à administração endovenosa de Tempol nos animais 2R-1C e sham.**

(A) Valores de delta de queda de pressão arterial média (PAM) e (C) de atividade nervosa simpática renal (ANSR) durante a infusão endovenosa de Tempol 10 e 30 mg/kg e nos tempos de 10, 20 e 30 minutos após a infusão, nos grupos hipertensos (2R-1C + T10, 2R-1C + T30, 2R-1C + Salina → n = 5) e no grupo sham (Sham + T10, Sham + T30, C + Salina → n = 5). (B) Valores de delta de queda de PAM e (D) ANSR após a infusão endovenosa de Tempol 10 e 30 mg/kg.

\* $P < 0,05$  em relação ao Sham + Salina, <sup>†</sup> $P < 0,05$  em relação ao Sham + T10 e <sup>&</sup> $P < 0,05$  em relação ao Sham + T30 (ANOVA One-Way seguida pelo pós-teste de Newman – Keuls method).



**Figura 37. Traçado representativo das respostas cardiovasculares à administração endovenosa de Tempol (10 e 30 mg/kg) de um animal 2R-1C e um sham.**

Respostas de pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade simpática renal ( $\int$ ANSR) à administração endovenosa de Tempol (10 mg/kg) em um animal hipertenso (A) e sham (B) e de Tempol (30 mg/kg) em um animal hipertenso (C) e um sham (D).

#### 4.4. Resultados da 4ª Série de Experimentos:

##### **4.4.1. Efeitos da super expressão de Ad-CMV-CuZnSOD e de Ad-CMV-eGFP na região RVL na pressão arterial nos animais 2R-1C e sham**

A PAS, PAD e PAM foram registrados por meio de rádio telemetria durante três semanas antes da nanoinjeção do vírus Ad-CMV-CuZnSOD ou do Ad-CMV-eGFP na região RVL. Posteriormente, o monitoramento persistiu por mais três semanas após a transfecção viral nos animais hipertensos e sham. Em ambos os grupos, os níveis basais de PAS, PAD e PAM foram semelhantes.

Logo após a transfecção do vírus Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL, observou-se uma redução significativa da PAS, PAD e PAM nos animais hipertensos. Uma semana depois, a PAS diminuiu de  $181 \pm 8$  para  $140 \pm 12$  mmHg, a PAD de  $142 \pm 8$  para  $103 \pm 3$  mmHg e PAM de  $174 \pm 13$  para  $115 \pm 7$  mmHg. E estes níveis continuaram estáveis até a sexta semana. De fato, a super expressão da CuZnSOD na região RVL resultou numa queda de  $40 \pm 0,5\%$  da PAM nos animais hipertensos após sete dias de transfecção (**Tabela 10 e figura 38**). Contudo, a transfecção do vírus Ad-CMV-eGFP não resultou em modificações na pressão arterial nos animais 2R-1C, como mostram as **figuras 38A, 38B e 38C**.

Em relação ao grupo sham, tanto a transfecção do vírus Ad-CMV-CuZnSOD como Ad-CMV-eGFP não causaram alterações na PAS, PAD e PAM durante o período observado (**Tabelas 10 e 11 e Figura 38**). Esse dado sugere que o vírus não produz lesões em neurônios, caso contrário, haveria queda de pressão arterial também no grupo sham. Portanto, pode-se sugerir que a super expressão de CuZnSOD na região RVL previne a hipertensão arterial no modelo 2R-1C.

**Tabela 10. Evolução da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial media (PAM) antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL de animais 2R-1C e sham.**

Semanas	PAS (mmHg)		PAD (mmHg)		PAM (mmHg)	
	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C
<b>0</b>	119 ± 5	134 ± 4	87 ± 4	103 ± 4	97 ± 4	112 ± 2
<b>1</b>	113 ± 7	155 ± 10	83 ± 5	120 ± 10	93 ± 5	131 ± 9
<b>2</b>	116 ± 3	166 ± 7*	88 ± 3	129 ± 8*	97 ± 3	142 ± 7*
<b>3</b>	117 ± 4	181 ± 8*	89 ± 4	142 ± 8*	98 ± 4	174 ± 13*
<b>4</b>	120 ± 3	140 ± 12	91 ± 3	103 ± 3	101 ± 3	115 ± 7
<b>5</b>	125 ± 5	137 ± 9	93 ± 2	102 ± 4	103 ± 2	113 ± 7
<b>6</b>	126 ± 7	136 ± 8	96 ± 8	99 ± 3	106 ± 7	115 ± 7

Valores de Média ± EPM.

\* $P < 0,05$  em relação Sham

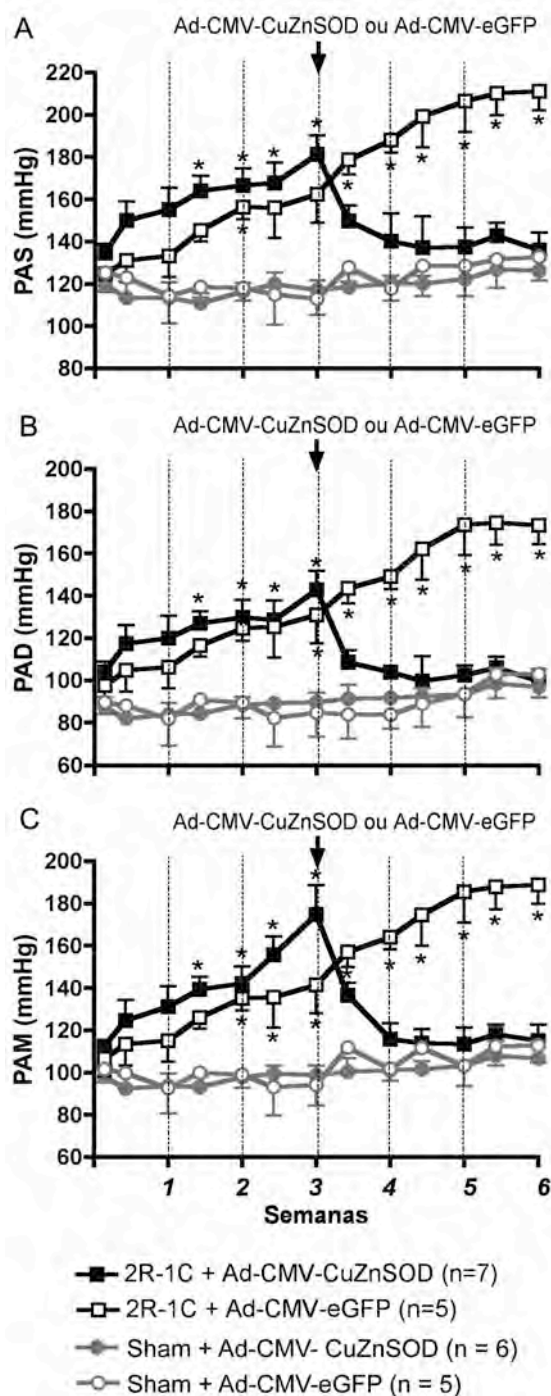
**Tabela 11. Evolução da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial media (PAM) antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-eGFP na região RVL de animais 2R-1C e sham.**

Semanas	PAS (mmHg)		PAD (mmHg)		PAM (mmHg)	
	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C
<b>0</b>	125 ± 8	128 ± 8	89 ± 6	103 ± 4	97 ± 4	106 ± 8
<b>1</b>	114 ± 13	133 ± 10	81 ± 12	106 ± 10	93 ± 5	113 ± 10
<b>2</b>	118 ± 5	156 ± 5*	89 ± 7	124 ± 5	97 ± 3	135 ± 5*
<b>3</b>	112 ± 7	166 ± 13*	84 ± 11	130 ± 13*	98 ± 4	141 ± 13*
<b>4</b>	117 ± 5	187 ± 5*	83 ± 6	149 ± 5*	101 ± 3	164 ± 5*
<b>5</b>	128 ± 14	206 ± 14*	93 ± 11	173 ± 14*	103 ± 2	185 ± 14*
<b>6</b>	132 ± 11	211 ± 9*	102 ± 11	173 ± 9*	106 ± 7	188 ± 9*

Valores de Média ± EPM.

\* $P < 0,05$  em relação Sham





**Figura 38. Efeitos da super expressão de Ad-CMV-CuZnSOD e de Ad-CMV-eGFP na região RVL na pressão arterial nos animais 2R-1C e sham.**

(A) Valores de pressão arterial sistólica (PAS), (B) de pressão arterial diastólica (PAD) e (C) de pressão arterial média (PAM) (C) registradas por rádio telemetria antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-CuZnSOD ou Ad-CMV-eGFP na região RVL de animais hipertensos (2R-1C + Ad-CMV-CuZnSOD e 2R-1C + Ad-CMV-eGFP) e de animais sham (Sham + Ad-CMV-CuZnSOD e Sham + Ad-CMV-eGFP).

\* $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham (ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Tukey's).

#### **4.4.2. Efeitos da super expressão de Ad-CMV-CuZnSOD e de Ad-CMV- eGFP na região RVL na variabilidade da pressão arterial sistólica nos animais 2R-1C e sham**

Antes da transfecção viral na região RVL, a LF (PAS) e a VLF (PAS) dos animais hipertensos não apresentaram diferenças significantes comparadas com os animais sham. Os valores do grupo hipertenso foram  $3,1 \pm 0,3$  mmHg<sup>2</sup> e  $4,0 \pm 0,2$  mmHg<sup>2</sup>, respectivamente, e os do grupo sham  $2,9 \pm 0,1$  mmHg<sup>2</sup> para LF (PAS) e  $4,9 \pm 0,9$  mmHg<sup>2</sup> para VLF (PAS).

Depois de três semanas de transfecção de Ad-CMV-CuZnSOD, não foram observadas alterações importantes na LF (PAS) (de  $3,3 \pm 0,3$  para  $2,3 \pm 0,1$  mmHg<sup>2</sup>) e na VLF (PAS) (de  $5,1 \pm 0,4$  para  $3,8 \pm 0,3$  mmHg<sup>2</sup>) nos animais hipertensos em relação aos níveis basais. Entretanto, os ratos 2R-1C nanoinjetados o Ad-CMV-eGFP demonstraram um aumento significativo da LF (PAS) de  $3,5 \pm 0,2$  para  $5,4 \pm 0,3$  mmHg<sup>2</sup> a partir da quarta semana, permanecendo níveis elevados até a sexta semana. Além disso, a VLF (PAS) também aumentou de  $5,1 \pm 0,4$  para  $6,5 \pm 0,4$  uma semana após a nanoinjeção de Ad-CMV-eGFP nos animais hipertensos.

A microinjeção tanto do vírus Ad-CMV-CuZnSOD como do Ad-CMV-eGFP na região RVL não resultou em modificações importantes na variabilidade da pressão arterial nos animais sham (**Tabelas 12 e 13; Figura 39**).

Portanto, a análise espectral da variabilidade de pressão arterial sistólica sugere que a super expressão de CuZnSOD na região RVL pode inibir o aumento da modulação do tônus vasomotor simpático nos animais hipertensos 2R-1C, principalmente a partir da quarta semana atingindo a estabilidade na sexta semana.

**Tabela 12. Análise espectral dos valores de muito baixa frequência de pressão arterial sistólica (VLF (PAS)) e baixa frequência de pressão arterial sistólica (LF (PAS)) antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL dos animais 2R-1C e sham.**

Semanas	VLF (PAS) (mmHg <sup>2</sup> )		LF (PAS) (mmHg <sup>2</sup> )	
	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C
<b>0</b>	4,9 ± 0,9	4,0 ± 0,2	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,3
<b>1</b>	4,7 ± 1,0	4,9 ± 0,4	3,8 ± 0,9	3,0 ± 0,08
<b>2</b>	3,4 ± 0,1	4,7 ± 0,3	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,3
<b>3</b>	3,3 ± 0,1	5,1 ± 0,4	2,8 ± 0,09	3,3 ± 0,3
<b>4</b>	3,5 ± 0,4	5,4 ± 0,9	2,8 ± 0,3	2,6 ± 0,2
<b>5</b>	3,8 ± 0,2	3,9 ± 0,1	2,8 ± 0,3	2,5 ± 0,2
<b>6</b>	3,6 ± 0,3	3,8 ± 0,3	2,8 ± 0,03	2,3 ± 0,1

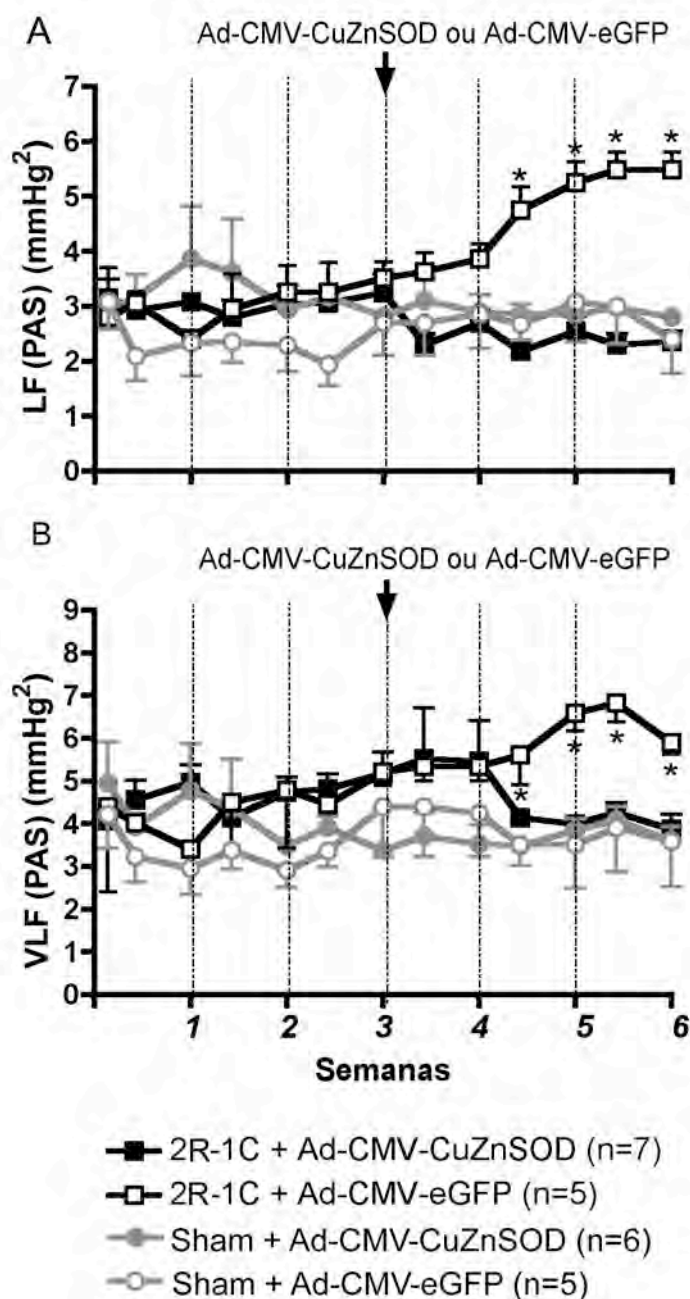
Valores de Média ± EPM.

**Tabela 13. Análise espectral dos valores de muito baixa frequência de pressão arterial sistólica (VLF (PAS)) e baixa frequência de pressão arterial sistólica (LF (PAS)) antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-eGFP na região RVL dos animais 2R-1C e sham.**

Semanas	VLF (PAS) (mmHg <sup>2</sup> )		LF (PAS) (mmHg <sup>2</sup> )	
	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C
<b>0</b>	4,2 ± 0,7	4,3 ± 2,0	3,0 ± 0,5	2,8 ± 0,8
<b>1</b>	2,9 ± 0,6	3,4 ± 0,03	2,3 ± 0,6	2,4 ± 0,1
<b>2</b>	2,9 ± 0,4	4,7 ± 1,3	2,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4
<b>3</b>	4,3 ± 1,1	5,0 ± 0,4	2,6 ± 0,6	3,5 ± 0,2
<b>4</b>	4,2 ± 0,1	5,3 ± 0,3	2,8 ± 0,6	3,8 ± 0,2
<b>5</b>	3,5 ± 1,0	6,4 ± 0,3*	3,0 ± 0,7	5,2 ± 0,3*
<b>6</b>	3,5 ± 1,0	5,8 ± 0,2*	2,4 ± 0,6	5,4 ± 0,3*

Valores de Média ± EPM.

\* $P < 0,05$  em relação Sham.



**Figura 39. Efeitos da super expressão de Ad-CMV-CuZnSOD e de Ad-CMV-eGFP na região RVL na variabilidade da pressão arterial sistólica nos animais 2R-1C e sham.**

**(A)** Valores de baixa frequência da pressão arterial sistólica LF (PAS) e **(B)** de muito baixa frequência da pressão arterial sistólica VLF (PAS) registradas por rádio telemetria antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV- CuZnSOD ou Ad-CMV-eGFP na região RVL de animais hipertensos (2R-1C + Ad-CMV-CuZnSOD e 2R-1C + Ad-CMV-eGFP) e de animais sham (Sham + Ad-CMV-CuZnSOD e Sham + Ad-CMV-eGFP).

\* $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham (ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Tukey's).

#### **4.4.3. Efeitos da super expressão de Ad-CMV-CuZnSOD e de Ad-CMV-eGFP na região RVL na frequência cardíaca e no ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco nos animais 2R-1C e sham**

Os valores basais da FC ( $385 \pm 14$  bpm) e do GRBe (FC) ( $-2.5 \pm 0,1$  bpm/mmHg) dos animais hipertensos foram semelhantes aos do grupo sham ( $380 \pm 11$  bpm e  $-2,4 \pm 0,3$  bpm/mmHg, respectivamente).

Após três semanas da transfecção de Ad-CMV-CuZnSOD na região da RVL, não foram observadas modificações importantes na FC (de  $394 \pm 9$  para  $388 \pm 8$  bpm) e no GRBe (FC) (de  $-1,7 \pm 0,1$  para  $-2,4 \pm 0,2$  bpm/ mmHg) nos animais hipertensos em relação ao basal. Contudo, nos animais 2R-1C que receberam o Ad-CMV-eGFP na região RVL observou-se uma taquicardia (de  $415 \pm 15$  para  $466 \pm 6$  bpm) seguida de uma redução significativa do GRBe (FC) de  $-2,0 \pm 0,1$  para  $-0,9 \pm 0,4$  bpm/ mmHg. Esses resultados sugerem que a taquicardia, desenvolvida nos animais hipertensos após à quarta semana, foi amenizada pela super expressão de CuZnSOD na região RVL e além disso, essa super expressão contribuiu para a melhora do ganho espontâneo do reflexo barorreflexo cardíaco.

Entretanto, os parâmetros FC e GRBe (FC) não apresentaram alterações após a nanoinjeção do vírus Ad-CMV-CuZnSOD ou Ad-CMV-eGFP nos animais sham. Estes resultados estão representados nas **tabelas 14 e 15 e figura 40**.

**Tabela 14. Mudanças na frequência cardíaca (FC) e no ganho espontâneo do reflexo do barorreceptor cardíaco em relação componente parassimpático (GRBe (FC)) antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL dos animais 2R-1C e sham.**

Semanas	FC (bpm)		GRBe (FC) (bpm/mmHg)	
	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C
<b>0</b>	380 ± 11	385 ± 14	-2,4 ± 0,3	-2,5 ± 0,1
<b>1</b>	401 ± 12	402 ± 6	-2,5 ± 0,3	-1,7 ± 0,1
<b>2</b>	408 ± 6	397 ± 12	-2,5 ± 0,3	-1,7 ± 0,1
<b>3</b>	395 ± 8	394 ± 9	-3,0 ± 0,2	-1,7 ± 0,1
<b>4</b>	404 ± 10	379 ± 7	-2,5 ± 0,2	-1,7 ± 0,2
<b>5</b>	374 ± 11	395 ± 9	-2,0 ± 0,5	-2,5 ± 0,2
<b>6</b>	378 ± 13	388 ± 8	-2,3 ± 0,1	-2,4 ± 0,2

Valores de Média ± EPM.

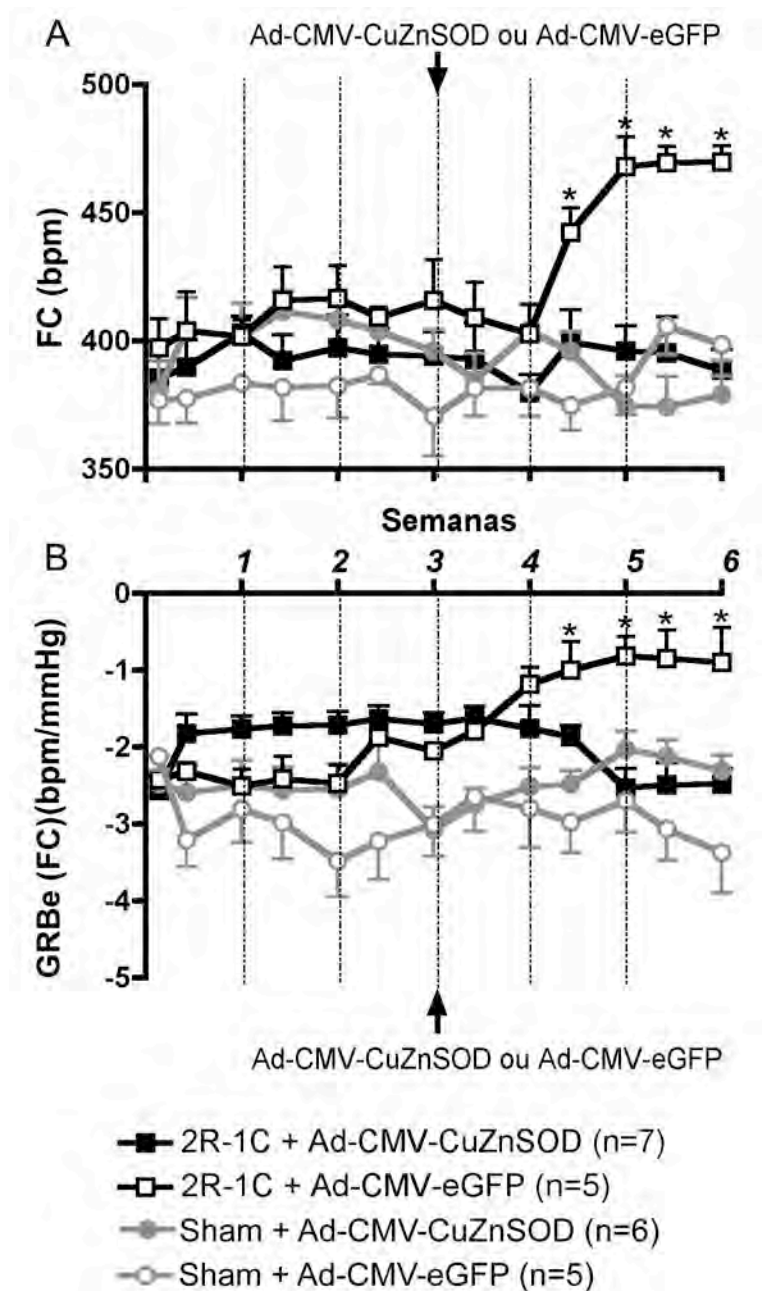
**Tabela 15. Mudanças na frequência cardíaca (FC) e no ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco em relação componente parassimpático (GRBe (FC)) antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-eGFP na região RVL dos animais 2R-1C e sham.**

Semanas	FC (bpm)		GRBe (FC) (bpm/mmHg)	
	Sham	2R-1C	Sham	2R-1C
<b>0</b>	376 ± 9	397 ± 11	-2,1 ± 0,1	-2,4 ± 0,03
<b>1</b>	383 ± 2	401 ± 6	-2,5 ± 0,2	-1,9 ± 0,1
<b>2</b>	416 ± 12	416 ± 12	-2,4 ± 0,2	-1,6 ± 0,1
<b>3</b>	380 ± 15	415 ± 15	-2,0 ± 0,1	-1,8 ± 0,3
<b>4</b>	402 ± 11	402 ± 11	-1,1 ± 0,2	-1,1 ± 0,01
<b>5</b>	468 ± 11	468 ± 11*	-0,8 ± 0,2	-0,8 ± 0,04*
<b>6</b>	398 ± 11	469 ± 6*	-0,9 ± 0,4	-0,9 ± 0,09*

Valores de Média ± EPM.

\* $P < 0,05$  em relação Sham – Semana 0 e Sham - semana 3.





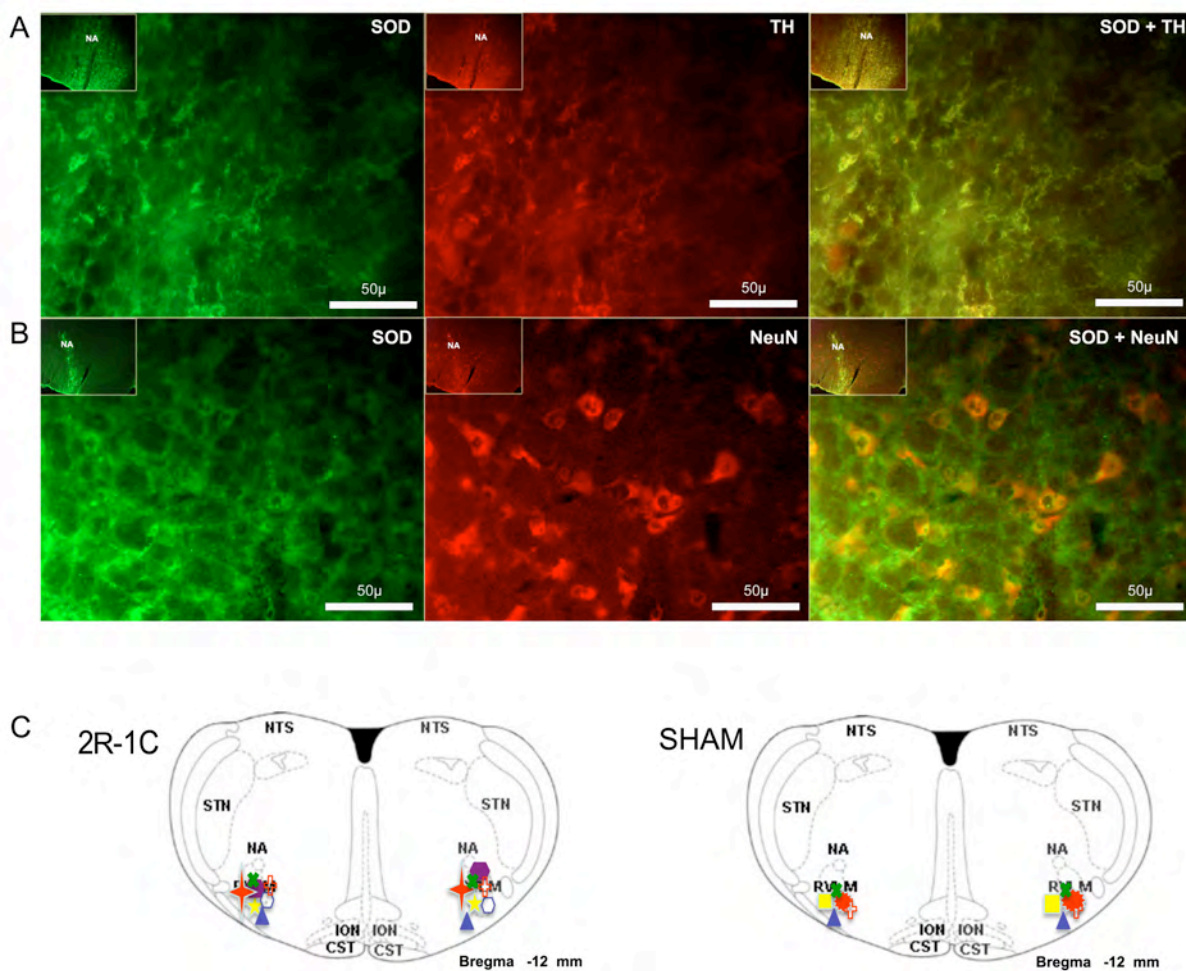
**Figura 40.** Efeitos da super expressão de Ad-CMV-CuZnSOD e de Ad-CMV-eGFP na região RVL na frequência cardíaca e no ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco nos animais 2R-1C e sham.

(A) Valores de frequência cardíaca (FC) e (B) do ganho espontâneo do reflexo barorreceptor cardíaco em relação à frequência cardíaca GRBe (FC) registradas por rádio telemetria antes e após a nanoinjeção de Ad-CMV-CuZnSOD ou Ad-CMV-eGFP na região RVL de animais hipertensos (2R-1C + Ad-CMV-CuZnSOD e 2R-1C + Ad-CMV-eGFP) e de animais sham (Sham+ Ad-CMV-CuZnSOD e Sham + Ad-CMV-eGFP).

\* $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham (ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Tukey's).

#### **4.4.4. Confirmação da transfecção do vírus Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL nos animais 2R-1C e sham**

Baseado na localização da imunoreactividade de CuZnSOD e expressão de eGFP, foi observado uma alta porcentagem de transfecção de ambos os vírus Ad-CMV-CuZnSOD e Ad-CMV-eGFP na região RVL nos animais hipertensos e sham. A dupla marcação de neurônios com TH (**Figura 41A**) e NeuN (**Figura 41B**) foi utilizado para facilitar a identificação da região RVL. Quando a marcação foi visualizada ventralmente ao núcleo ambíguo (AMB) e lateralmente ao núcleo inferior olivar (NOI), foi considerada histologia positiva (*Bregma*: - 12 mm). Na **figura 41C** encontra-se uma representação esquemática das nanoinjeções de Ad-CMV-SOD nos animais hipertensos e sham.

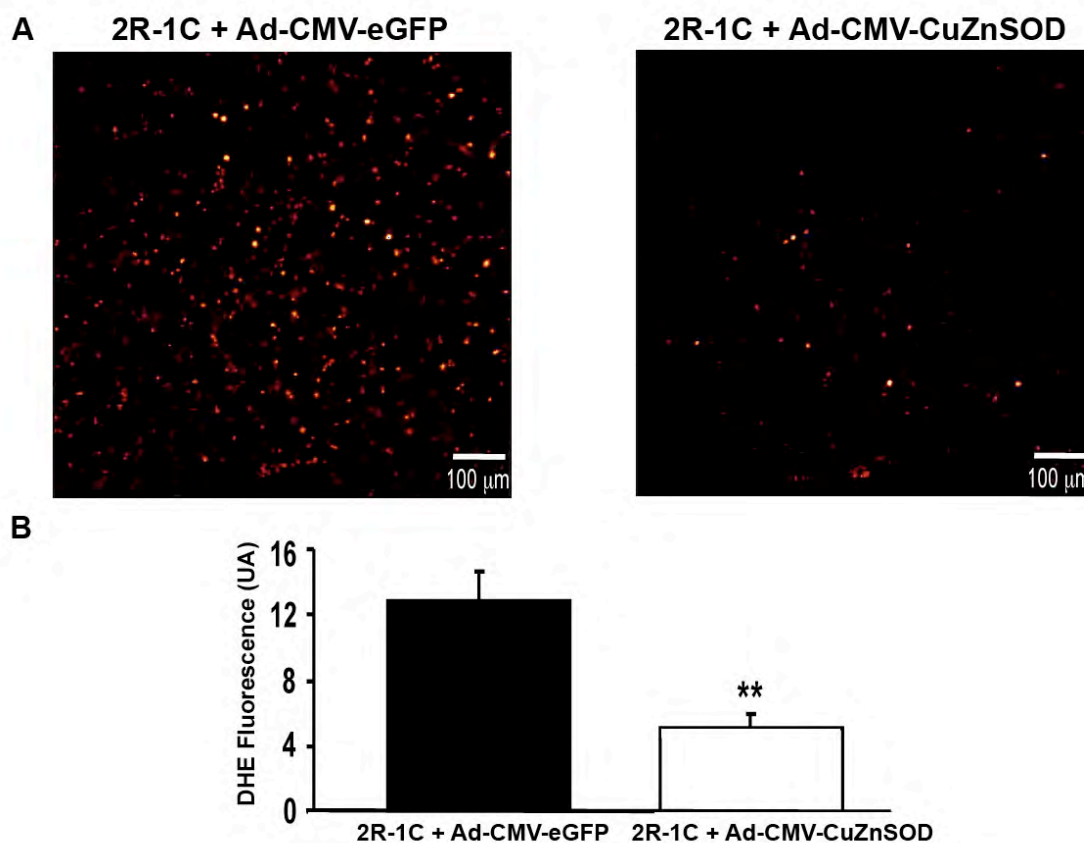


**Figura 41. Confirmação da transfecção do vírus Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL nos animais 2R-1C.**

Figura representativa da localização celular do vírus Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL após três semanas de transfecção. No quadro **A**, CuZnSOD encontra-se marcada com fluorescência verde (esquerda), TH em vermelho (centro) e as imagens sobrepostas CuZnSOD + TH (direita). No quadro **B**, CuZnSOD encontra-se marcada com fluorescência verde (esquerda), NeuN em vermelho (centro) e as imagens sobrepostas CuZnSOD + NeuN (direita). Estas imagens indicam o lado esquerdo da região RVL. Em **C**, representação esquemática das nanoinjeções de Ad-CMV-CuZnSOD nos animais hipertensos ( $n = 7$ ) e sham ( $n = 6$ ). CST, trato corticospinal; ION, núcleo inferior olivar; NA, núcleo ambíguo; NTS, núcleo do trato solitário; STN, núcleo trigêmio espinal.

#### 4.4.5. Níveis de superóxidos na região RVL dos animais 2R-1C transfectados com o vírus Ad-CMV-CuZnSOD e Ad-CMV-eGFP

Para comprovar se há um aumento nos níveis intracelulares de superóxidos na região RVL no modelo 2R-1C foi realizada a análise de fluorescência de DHE nos cortes transfectados com Ad-CMV-CuZnSOD ou Ad-CMV-eGFP. Nos animais transfectados com Ad-CMV-eGFP observou-se uma alta fluorescência de DHE, a qual foi revertida significativamente nos animais com o Ad-CMV-CuZnSOD (Figura 42).



**Figura 42.** Fluorescência de DHE dos animais 2R-1C transfectados com os vírus Ad-CMV-eGFP e Ad-CMV-CuZnSOD na região RVL.

(A) Figura representativa adquirida no microscópio confocal da fluorescência de DHE de um animal 2R-1C transfectado com o vírus Ad-CMV-eGFP (à esquerda) e outro com Ad-CMV-CuZnSOD (à direita). (B) Valores de fluorescência de DHE nos dois grupos analisados.

\*\* $P < 0,01$  em relação ao grupo 2R-1C + Ad-CMV-eGFP (Teste  $t$  de Student).

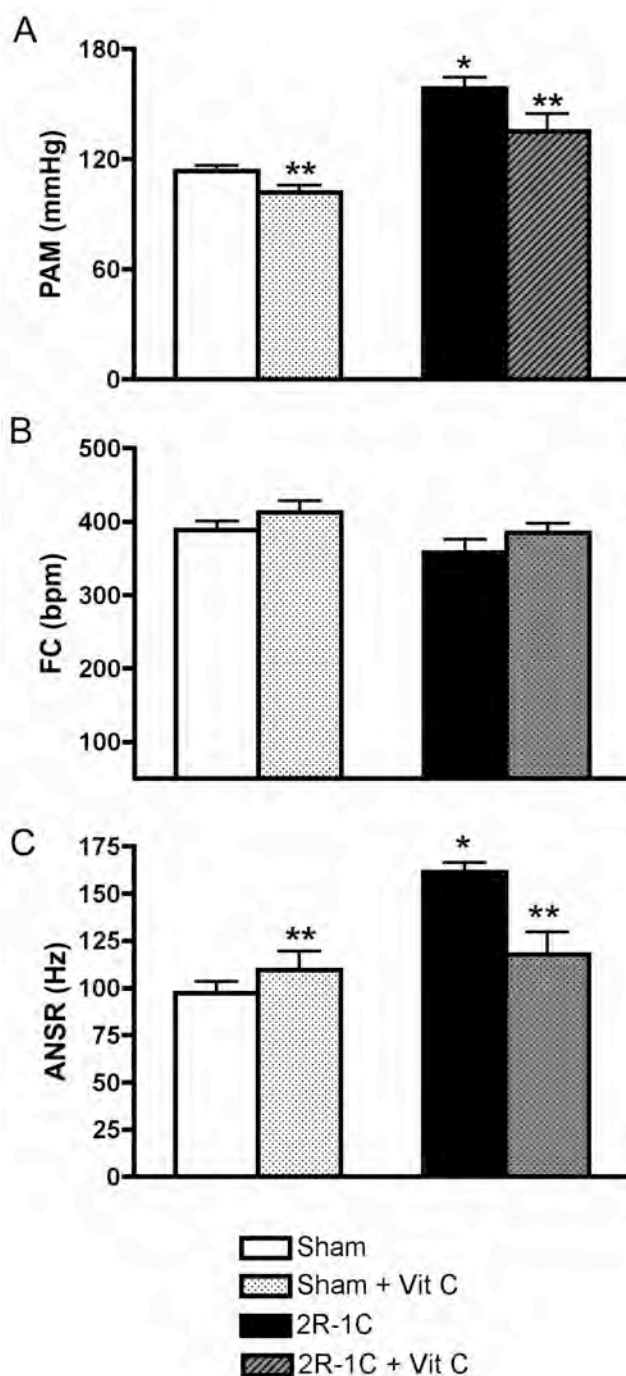
## 4.5. Resultados da 5ª Série de Experimentos:

### 4.5.1. Respostas cardiovasculares ao tratamento crônico com Vit C nos animais 2R-1C e sham

No grupo hipertenso, o tratamento crônico com Vit C causou uma diminuição significativa da PAM (de  $159 \pm 5$  para  $129 \pm 8$  mmHg,  $P < 0,05$ ,  $n = 12$ ) após sete dias de tratamento, o qual representou uma queda de  $22 \pm 7$  %. Além disso, o grupo Sham tratado com Vit C também apresentou redução da PAM após o tratamento porém não significativa (de  $113 \pm 3$  para  $102 \pm 3$  mmHg,  $P < 0,05$ ,  $n = 11$ ). Estes resultados estão representados na **figura 43A**.

Não foram observadas alterações na FC após o tratamento crônico com Vit C, conforme mostra a **figura 43B**. Os hipertensos variaram de  $358 \pm 17$  bpm para  $384 \pm 12$  bpm após o tratamento, já os animais sham apresentaram  $388 \pm 12$  bpm antes do tratamento e após  $412 \pm 15$  bpm.

Em relação à ANSR, observou-se uma diminuição significativa no grupo hipertenso tratado (de  $161 \pm 5$  para  $117 \pm 11$  Hz,  $P < 0,05$ ,  $n = 6$ ), enquanto os animais sham tratados não apresentaram alterações (de  $97 \pm 6$  para  $109 \pm 10$  Hz,  $n = 6$ ), como mostra a **figura 43C**.



**Figura 43. Respostas cardiovasculares ao tratamento crônico com Vit C nos animais 2R-1C e sham.**

(A) Valores de pressão arterial média (PAM), (B) de frequência cardíaca (FC) e (C) de atividade nervosa simpática renal (ANSR) antes e após o tratamento crônico com Vit C (150 mg/Kg) nos grupos hipertensos (2R-1C e 2R-1C + Vit C, n = 12) e nos grupos sham (Sham e Sham + Vit C, n = 11).

\*  $P < 0,05$  em relação ao Sham \*\* $P < 0,05$  em relação ao 2R-1C (ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Tukey's).

#### **4.5.2. Análise da expressão gênica das subunidades de NAD(P)H oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD e receptor AT-1 nas regiões RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e sham tratados com Vit C**

A quantificação da expressão de mRNA de p47phox, tanto no RVL como PVN, em animais hipertensos mostrou-se significativamente aumentada em relação ao grupo controle. Após o tratamento com Vit C, a subunidade p47phox diminuiu significativamente nos dois grupos tratados e em ambas as regiões estudadas (RVL: 2R-1C + Vit C:  $0,14 \pm 0,05$  UA / Sham + Vit C:  $0,12 \pm 0,03$  UA – PVN: 2R-1C + Vit C:  $0,48 \pm 0,13$  UA/ Sham + Vit C:  $0,51 \pm 0,07$ ), como demonstra a **figura 44A**. Em relação à região CN, a expressão da subunidade p47phox foi semelhante tanto nos animais sham, como nos animais hipertensos (Sham:  $1,2 \pm 0,3$  UA / 2R-1C:  $1,4 \pm 0,4$  UA).

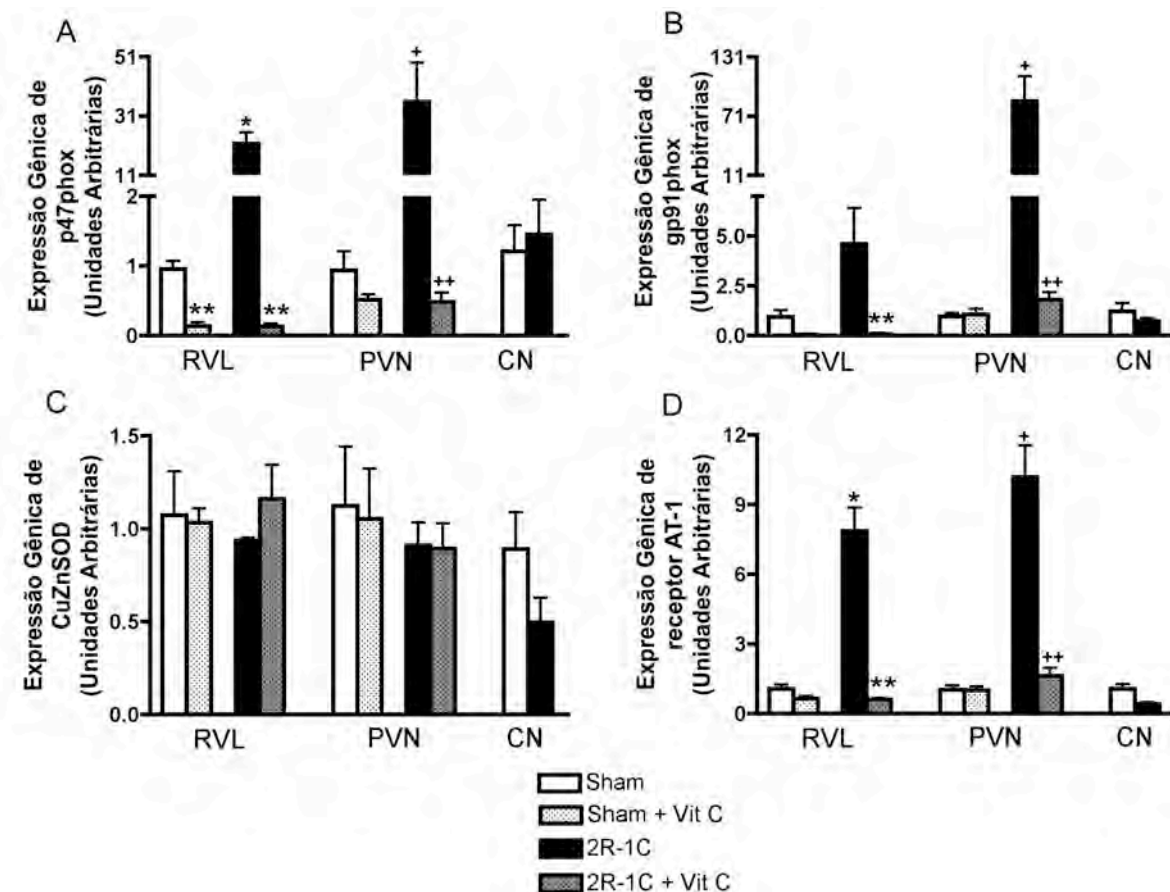
A expressão de gp91phox teve um padrão diferenciado entre as regiões estudadas, ou seja, apresentou-se significativamente aumentada nos animais hipertensos em relação ao grupo sham apenas na região do PVN (2R-1C:  $85,8 \pm 25,4$  UA e Sham:  $1,0 \pm 0,1$  UA,  $P < 0,01$ ), como demonstra a **figura 44B**. Na região RVL também houve aumento nos animais hipertensos, entretanto, este aumento apenas apresentou uma tendência a ser significativo ( $P = 0,07$ ), em relação aos normotensos (Sham:  $1,0 \pm 0,2$  UA/ 2R-1C:  $4,6 \pm 1,8$  UA). Após o tratamento com Vit C a subunidade gp91phox diminuiu nos dois grupos tratados na região RVL e diminuiu significativamente no PVN apenas no grupo hipertenso (RVL- 2R-1C + Vit C:  $0,08 \pm 0,03$  UA / Sham + Vit C:  $0,05 \pm 0,005$  UA – PVN- 2R-1C + Vit C:  $1,8 \pm 0,3$  UA/ Sham + Vit C:  $1,0 \pm 0,2$  UA). Em relação à região CN, a expressão da subunidade

gp91phox também foi semelhante tanto nos animais sham, como nos animais hipertensos (Sham:  $1,2 \pm 0,4$  UA / 2R-1C:  $0,7 \pm 0,1$  UA).

A quantificação por RT-PCR quantitativo em Tempo Real não demonstrou diferenças na expressão de CuZnSOD em animais hipertensos em relação aos animais sham na região do RVL (2R-1C:  $0,9 \pm 0,01$  UA e Sham:  $0,8 \pm 0,2$  UA). Entretanto, no PVN houve uma tendência não significativa à redução da expressão no grupo hipertenso em relação ao sham (Sham:  $1,0 \pm 0,2$  UA / 2R-1C:  $0,6 \pm 0,08$  UA), como demonstra a **figura 44C**. Além disso, após o tratamento com Vit C os dois grupos observados não alteraram seus valores de expressão (RVL- 2R-1C + Vit C:  $1,1 \pm 0,8$  UA / Sham + Vit C:  $1,0 \pm 0,007$  UA – PVN- 2R-1C + Vit C:  $0,8 \pm 0,1$  UA / Sham + Vit C:  $1,0 \pm 0,2$  UA). Em relação à região CN, a expressão da CuZnSOD também foi semelhante tanto nos animais sham, como nos animais hipertensos (Sham:  $0,8 \pm 0,2$  UA / 2R-1C:  $0,5 \pm 0,1$  UA).

A expressão do receptor AT-1 foi significativamente aumentada nos animais hipertensos em relação ao grupo sham, tanto na região RVL como no PVN. Na RVL os valores obtidos para animais hipertensos foram de  $7,8 \pm 1,0$  UA e para sham de  $0,8 \pm 0,1$  UA ( $P < 0,0005$ ), como demonstra a **figura 44D**. Na região do PVN os valores para animais hipertensos foram de  $10,1 \pm 1,3$  UA e para sham de  $1,1 \pm 0,1$  UA ( $P < 0,004$ ), ou seja, um aumento de 10 vezes aproximadamente. Além disso, após o tratamento com Vit C somente o grupo hipertenso diminuiu significativamente a expressão deste receptor (RVL: 2R-1C + Vit C:  $0,6 \pm 0,06$  UA / Sham + Vit C:  $0,6 \pm 0,1$  UA – PVN: 2R-1C + Vit C:  $1,6 \pm 0,3$  UA / Sham + Vit C:  $1,0 \pm 0,1$  UA). Em relação à região CN, a expressão gênica do receptor AT-1 também foi semelhante tanto nos animais sham, como nos animais hipertensos (Sham:  $1,07 \pm 0,2$  UA / 2R-1C:  $0,4 \pm 0,1$  UA).





**Figura 44. Análise da expressão gênica das subunidades de NAD(P)H oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD e receptor AT-1 nas regiões RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e sham tratados com Vit C.**

Representação gráfica do nível de expressão de p47phox (A), gp91phox (B), CuZnSOD (C) e receptor AT-1 (D) nas regiões RVL, PVN e CN de animais sham (n=5), sham tratados com Vit C (n=5), hipertensos (n=5) e hipertensos tratados com Vit C (n=5) em unidades arbitrárias resultantes de PCR em tempo real.

\* $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham - RVL. \*\* $P < 0,05$  em relação ao 2R-1C - RVL. + $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham - PVN. ++ $P < 0,05$  em relação ao 2R-1C - PVN (ANOVA One-Way seguida pelo pós-teste de Newman – Keuls method).

#### **4.5.3. Análise da expressão gênica de nNO, iNOS, IL-1 $\beta$ e Glut-1 nas regiões RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e sham tratados com Vit C**

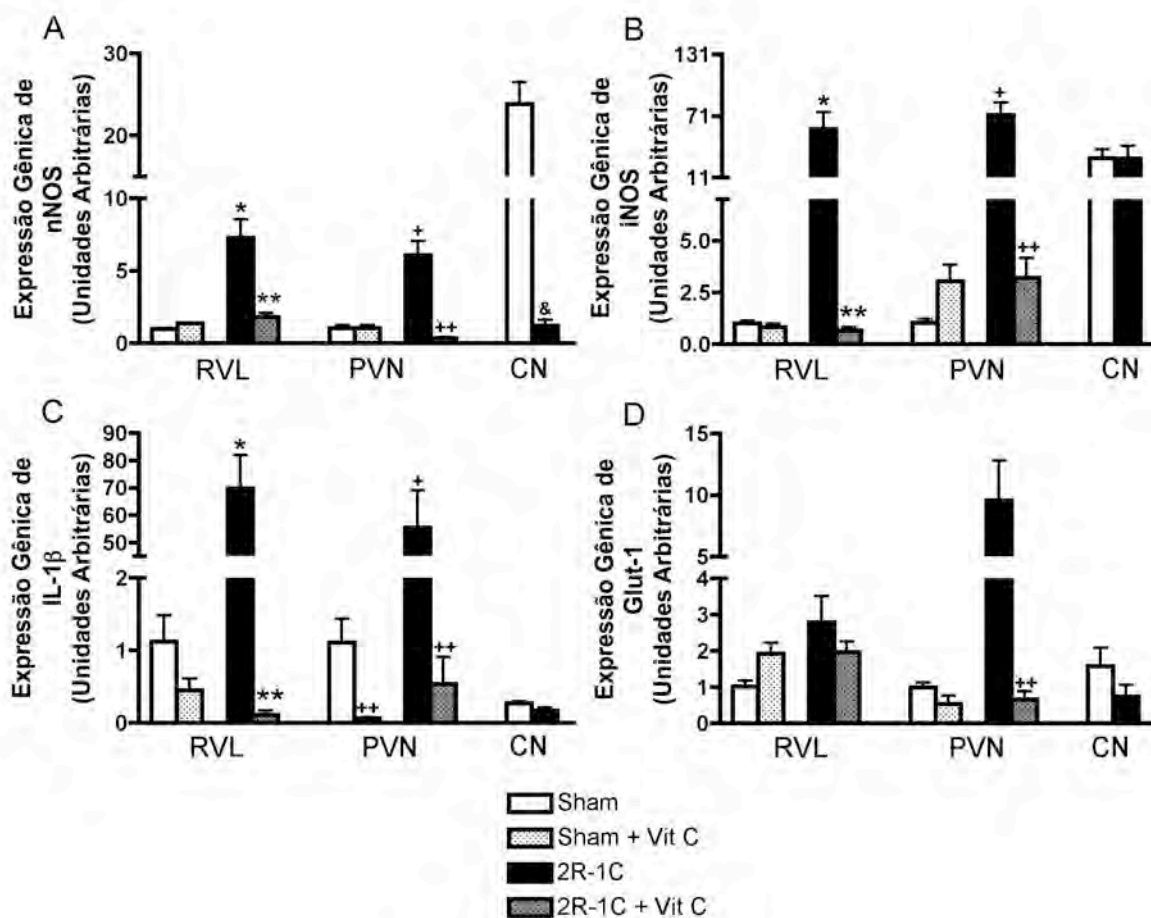
A expressão tanto de nNOS como iNOS apresentou-se significativamente aumentada nos animais hipertensos em relação ao grupo sham, tanto na região RVL como no PVN. Na região RVL, os valores obtidos para expressão de nNOS nos animais hipertensos foram de  $7,2 \pm 1,2$  UA e para sham de  $0,97 \pm 0,07$  UA ( $P < 0,05$ ), como demonstra a **figura 45A** e a expressão de iNOS na região RVL foi  $58,3 \pm 16,4$  UA nos animais hipertensos e  $1,01 \pm 0,08$  UA nos sham ( $P < 0,05$ ), **figura 45B**. Na região do PVN, os valores de nNOS para animais hipertensos foram de  $6,09 \pm 0,97$  UA e para os sham de  $1,2 \pm 0,1$  UA ( $P < 0,05$ ). A expressão de mRNA de iNOS no PVN foi  $79,1 \pm 12,1$  UA para animais hipertensos e  $1,04 \pm 0,05$  ( $P < 0,05$ ) para os sham.

Entretanto, após o tratamento com Vit C somente o grupo hipertenso diminuiu significativamente a expressão de nNOS e iNOS na região RVL e PVN (nNOS  $\rightarrow$  RVL: 2R-1C + Vit C,  $1,8 \pm 0,1$ / Sham + Vit C,  $1,3 \pm 0,03$  UA – PVN: 2R-1C + Vit C,  $0,3 \pm 0,08$  UA/ Sham + Vit C,  $1,0 \pm 0,1$  UA)/ iNOS  $\rightarrow$  RVL: 2R-1C + Vit C,  $0,6 \pm 0,1$  UA / Sham + Vit C,  $0,8 \pm 0,1$  UA – PVN: 2R-1C + Vit C,  $2,4 \pm 0,9$  UA/ Sham + Vit C,  $3,0 \pm 0,7$  UA). Em relação à região CN, a expressão de nNOS apresentou-se significativamente diminuída nos animais hipertensos comparados com os sham (Sham:  $23,8 \pm 2,6$  UA / 2R-1C:  $1,2 \pm 0,4$  UA). Já a expressão de iNOS foi semelhante tanto nos animais sham, como nos animais hipertensos (Sham:  $29,8 \pm 8,8$  UA / 2R-1C:  $29,5 \pm 12,4$  UA).

A quantificação por RT-PCR Quantitativo em Tempo Real demonstrou um aumento significativo na expressão de IL-1 $\beta$  na região do RVL dos animais hipertensos em relação aos sham (2R-1C:  $69,8 \pm 12,1$  UA e Sham  $1,1 \pm 0,3$  UA). E também no PVN (2R-1C:  $55,4 \pm 13,6$  UA/ Sham,  $1,1 \pm 0,3$  UA), como demonstra a **figura 45C**. Além disso, após o tratamento com Vit C os dois grupos observados diminuiram significativamente seus valores de expressão de IL-1 $\beta$  tanto na RVL como PVN (RVL: 2R-1C + Vit C,  $0,1 \pm 0,06$  UA / Sham + Vit C,  $0,45 \pm 0,16$  UA – PVN: 2R-1C + Vit C,  $0,43 \pm 0,38$  UA/ Sham + Vit C,  $0,06 \pm 0,02$  UA). Em relação à região CN, a expressão gênica de IL-1 $\beta$  foi semelhante tanto nos animais sham, como nos animais hipertensos (Sham:  $0,2 \pm 0,03$  UA / 2R-1C:  $0,1 \pm 0,04$  UA).

A quantificação por RT-PCR Quantitativo em Tempo Real de Glut-1 apresentou-se significativamente aumentada nos animais hipertensos em relação ao grupo sham, tanto na região da RVL como no PVN. Na região RVL, os valores obtidos para animais hipertensos foram de  $2,9 \pm 0,6$  e para os sham de  $1,0 \pm 0,2$  UA ( $P < 0,05$ ), como demonstra a **figura 45D**. Na região do PVN, os hipertensos apresentaram valores de  $8,5 \pm 2,7$  e os sham de  $0,8 \pm 0,1$  UA ( $P < 0,04$ ).

Após o tratamento com Vit C, somente o grupo hipertenso diminuiu a expressão de Glut-1 na região RVL (2R-1C + Vit C,  $1,9 \pm 0,3$  UA / Sham + Vit C,  $1,9 \pm 0,3$  UA). Já no PVN, houve diminuição tanto nos animais hipertensos como os sham (2R-1C + Vit C,  $0,6 \pm 0,2$  UA/ Sham + Vit C,  $0,5 \pm 0,2$ ), entretanto apenas nos hipertensos a redução foi significativa. Em relação à região CN, a expressão gênica de Glut-1 foi semelhante tanto nos animais sham, como nos animais hipertensos (Sham:  $1,5 \pm 0,5$  UA / 2R-1C:  $0,7 \pm 0,3$  UA).



**Figura 45. Análise da expressão gênica das subunidades de nNOS, iNOS, IL-1 $\beta$  e de Glut-1 nas regiões RVL, PVN e CN de ratos 2R-1C e sham tratados com Vit C.**

Representação gráfica do nível de expressão de nNOS (A), iNOS (B), IL-1 $\beta$  (C) e Glut-1 (D) nas regiões RVL, PVN e CN de animais sham (n=5), sham tratados com Vit C (n=5), hipertensos (n=5) e hipertensos tratados com Vit C (n=5) em unidades arbitrárias resultantes de PCR em tempo real.

\* $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham. \*\* $P < 0,05$  em relação ao 2R-1C. + $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham - PVN. ++ $P < 0,05$  em relação ao 2R-1C - PVN. & $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham - CN (ANOVA One-Way seguida pelo pós-teste de Newman - Keuls method).

## 5. DISCUSSÃO

Os principais achados da presente Tese foram:

1. O modelo de hipertensão 2R-1C está associado com uma alteração no controle autonômico cardiovascular caracterizado por um aumento no componente LF da PAS a partir da quarta semana, indicando maior modulação simpática sobre os vasos. Houve um prejuízo da sensibilidade reflexa do barorreceptor e uma taquicardia a partir da quarta semana e que persistiram até a sexta semana analisada;

3. A Ang II (via receptor AT-1) e o NO (produzido pela iNOS) na região RVL, participam mantendo a HA e a ANSR na sexta semana de indução da hipertensão 2R-1C;

4. Há um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, caracterizando um estado de estresse oxidativo nas regiões RVL e PVN dos animais 2R-1C, visto que o aumento de PA e a hiperatividade simpática são revertidos com a administração do antioxidante (Tempol) nessas duas regiões na sexta semana após a clipagem;

5. Durante a fase estável da hipertensão 2R-1C, o estresse oxidativo sistêmico também parece estar acentuado, sendo que a administração aguda de Tempol em duas concentrações provocou queda da pressão arterial e simpato-inibição;

6. A super expressão crônica de CuZnSOD na região RVL preveniu a HA e reduziu a produção de superóxidos nessa região em ratos 2R-1C. Além disso,

melhorou a sensibilidade reflexa do barorreceptor e inibiu a taquicardia observada a partir da quarta semana do modelo 2R-1C;

7. O tratamento crônico com o antioxidante (Vit C) na fase estável da hipertensão 2R-1C, promoveu queda da PA e simpato-inibição no modelo 2R-1C. Além disso, reduziu a expressão gênica das subunidades de NAD(P)H oxidase nas regiões RVL e PVN. Contudo, o tratamento não interferiu na expressão de CuZnSOD;

8. O estresse oxidativo também parece influenciar na expressão gênica do receptor AT-1, iNOS, nNOS, IL-1  $\beta$  e Glut-1 nas regiões RVL e PVN, visto que o tratamento com vitamina C reduziu a expressão desses componentes.

Em conjunto, os resultados sugerem que o sistema angiotensinérgico, nitrérgico e o estresse oxidativo contribuem de forma relevante para a geração central do tônus vasomotor simpático e HA no modelo 2R-1C. A redução do estresse oxidativo nas regiões RVL e PVN foi capaz tanto de reverter como inibir o desenvolvimento da HA e simpatoexcitação no modelo estudado. As principais observações feitas durante este estudo serão apresentadas e discutidas de acordo com a sequência das séries de experimentos realizadas.

### **5.1. Estudo das variações cardiovasculares autonômicas na evolução da hipertensão 2R-1C em ratos acordados**

Nesta série de experimentos nós demonstramos pela primeira vez a evolução temporal das mudanças autonômicas cardiovasculares que ocorrem na evolução da hipertensão renovascular, avaliando-se a modulação autonômica cardiovascular diariamente durante as seis semanas de evolução do estado hipertensivo. Nossos resultados indicam que o modelo de hipertensão 2R-1C está associado com a perda do tônus vagal, acompanhada por uma taquicardia e a perda da sensibilidade reflexa do barorreceptor a partir da quarta semana após a colocação do clipe. Além de apresentar uma elevada modulação vasomotora simpática sobre os vasos a partir da quarta semana, a qual persiste até a sexta semana observada.

Os resultados demonstraram que a PA nos animais hipertensos aumenta de maneira gradual e significativa após a estenose da artéria renal por cinco semanas até atingir a estabilidade na sexta semana. Este achado é corroborado por estudos de Martinez-Maldonado, em 1991, o qual reportou que a hipertensão renovascular de Goldblatt experimental (2R-1C) ou clínica em humanos possui três fases específicas. Fase I compreende as 4 semanas iniciais. Fase II, entre 5-8 semanas e Fase III, 9 semanas ou mais. O pré-tratamento com inibidores da enzima de conversão da Ang I (ECA) previne a hipertensão renovascular, indicando que este modelo é determinado pelo aumento da Ang II circulante. Após a colocação do clipe, a PA aumenta quase imediatamente e está associada com aumento da

atividade plasmática de renina (APR) e com aumento da concentração de Ang II circulante. Inibição da ECA ou remoção do clipe dentro de 7-10 dias reduz rapidamente a PA para níveis da normalidade (Fase I). Durante a Fase II, a PA pode continuar estável ou aumentando e a APR começa a reduzir-se. Entretanto, a infusão de Ang II exógena nessa fase demonstra aumento na sua sensibilidade, ou seja, é necessário menos Ang II para aumentar a PA. Isto indica *upregulation* dos receptores AT-1 de Ang II. Remoção do clipe ou tratamento com inibidores da ECA podem reduzir a PA para o normal, mas o tempo para isso acontecer é maior do que na Fase I. Na Fase III, a PA continua alta e mais elevada que na Fase I, entretanto, nesta fase há queda da APR e da concentração plasmática de Ang II em relação à fase II. Deste modo, a remoção do clipe ou administração de inibidores nesta fase, não restabelecem totalmente a pressão de volta ao normal. Entretanto, altas doses de inibidores de ECA ou outros anti-hipertensivos podem reduzir a PA a níveis da normalidade. Portanto, nossos experimentos foram realizados até a fase II de desenvolvimento da hipertensão 2R-1C, ou seja, fase renina-dependente.

Vários estudos têm sugerido um importante papel do tônus vasomotor simpático na evolução da hipertensão em ratos 2R-1C. Em 1982, Katholi demonstrou que a denervação renal melhora a hipertensão em animais 2R-1C, mostrando participação da atividade simpática renal (aferente e eferente) nesse modelo. Posteriormente, Faber & Brody, em 1983, reportaram um inapropriado aumento do tônus simpático neste modelo de hipertensão. McEbroy & Zimmerman, em 1989 demonstraram que em coelhos hipertensos 2R-1C, a afinidade dos receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos encontrava-se aumentada duas semanas após a clipagem do rim esquerdo (e não no rim contralateral) na vasculatura arterial



intrarenal. Em seis semanas, a afinidade desses receptores encontrou-se aumentada em ambos os rins quando comparada a animais controles, entretanto, em doze semanas não foi detectada nenhuma diferença. Dados similares também foram encontrados por Nakada e cols, em 1996, os quais evidenciaram aumento da ANS em animais 2R-1C quatro semanas pós-clipagem. Finalmente, Johansson e cols, em 1999, também observaram aumento da ANS em humanos hipertensos renovasculares. Em um estudo recente no nosso laboratório, reportamos que seis semanas após a colocação do clipe, a PAM e RSNA estavam significativamente aumentadas nos animais hipertensos 2R-1C anestesiados com uretana comparados com os animais controles (Oliveira-Sales *et al.*, 2008). Adicionalmente, vale ressaltar que a participação do SNS no modelo 2R-1C parece ter tanto um efeito direto, evidenciado pelo aumento da ANSR como um efeito indireto, por meio do SRAA, ou seja, a maior ativação simpática produz maior liberação de renina (Miayajima *et al.*, 1991; Johansson *et al.*, 1999; Head & Burke, 2004). Além disso, o componente simpático também pode estar envolvido em outros mecanismos, como maior reabsorção de sódio neste modelo de HA (Dibona & Kopp, 1997).

Contudo, os estudos anteriores foram realizados em fases específicas da do desenvolvimento da HA, como 2, 3, 4, 6 ou 12 semanas após a estenose da artéria renal. Portanto, monitorar diariamente as modificações na atividade autonômica cardiovascular ao longo de seis semanas de evolução da hipertensão 2R-1C foi extremamente relevante para examinar exatamente quando as modificações acontecem. Na presente Tese, identificamos que o aumento da modulação simpática nos vasos sanguíneos coincide com o aumento dos níveis tensionais.

A respeito da variabilidade de PA, sabe-se que o LF (PAS) representa um indicativo da modulação vasomotora simpática (deBoer *et al.*, 1987) e a VLF (PAS) inclui a modulação gerada por diversos mecanismos, como pelo sistema simpático, termorregulação, atividade hormonal ou mudanças no fluxo sanguíneo para o local de maior demanda metabólica (Cerutti *et al.*, 1991). Nossos resultados mostraram que a LF (PAS) aumentou principalmente a partir da quarta semana e após a quinta semana pós-clipagem permaneceu constante até o final do monitoramento nos animais hipertensos. Adicionalmente, a VLF (PAS) também apresentou o mesmo padrão, indicando um aumento generalizado da modulação do tônus vasomotor simpático. Nossos resultados corroboram com os de Ponchon & Elghozi, 1996 que demonstraram que há um aumento na LF (PAS) seis semanas após a colocação do clipe. Eles também demonstraram redução nas flutuações de VLF (PAS) após o bloqueio simultâneo do sistema cinina-caliceína e do SRAA, sugerindo a contribuição do sistema humoral na VLF (PAS). Adicionalmente, outros estudos demonstraram aumento nas oscilações de LF (PAS) duas semanas (Nobre *et al.*, 2006) ou seis semanas após a colocação do clipe (Wang *et al.*, 2005). Também existem evidências que aumento na LF (PAS) está relacionados à hiperatividade simpática em humanos com hipertensão renovascular, embora os fatores humorais como a diminuição da produção de NO e aumento do SRAA também estejam associados (Nafz *et al.*, 2001; Mussalo *et al.*, 2003).

A análise espectral revelou que HF (IP), um índice associado com a modulação parassimpática cardíaca (Pagani *et al.*, 1986; Cerutti *et al.*, 1991), foi marcadamente reduzida a partir da quarta semana. O mesmo foi relatado por Souza

e cols, em 2008, os quais observaram uma significativa supressão vagal no nono dia após a clipagem em outro modelo experimental de HA, ratos 1R-1C acordados.

Além disso, uma taquicardia exacerbada foi observada a partir da quarta semana nos animais 2R-1C. Machado e cols, em 1987, também evidenciaram esse aumento na FC no sétimo dia após a indução da HA renovascular (1R-1C), provavelmente devido ao aumento de Ang II. Estudos posteriores destes mesmos autores relataram que a taquicardia poderia estar diretamente relacionada ao aumento do tônus simpático (Machado & Brody, 1989). Outro estudo também demonstrou que a integridade da região AV3V é importante para a geração da taquicardia e adicionalmente evidenciaram que a Ang II poderia estar envolvida neste mecanismo, visto que a taquicardia foi prevenida com a administração de captopril (inibidor da enzima conversora de Ang) (Menani *et al.*, 1988). Portanto, esses dados em conjunto, apontam para ações no SNC da Ang II no que diz respeito ao aumento da FC.

O presente estudo também mostrou que o GRBe, um índice da atividade reflexa do barorreceptor calculado a partir de flutuações de FC e do IP, diminuiu gradualmente até a quinta semana atingindo o platô na sexta semana de HA. Os mecanismos pelos quais a sensibilidade reflexa do barorreceptor está reduzida na hipertensão 2R-1C são desconhecidos. Atualmente, está bem documentado que há um prejuízo no reflexo do barorreceptor na HA (Guo & Abboud, 1984; Michelini *et al.*, 1992; Moreira *et al.*, 1992, Irigoyen *et al.*, 1991). Os experimentos clássicos de Salgado & Krieger, em 1973, demonstraram que a adaptação dos barorreceptores se processa de forma completa após dois dias aproximadamente de HA. Entretanto,

o papel dos barorreceptores no controle crônico do sistema cardiovascular é ainda motivo de discussão e estudo. Por exemplo, Barret e cols. demonstraram redução sustentada da ANSR em resposta à infusão crônica de Ang II em coelhos monitorados por telemetria, portanto, aparentemente existe uma organização topográfica no que diz respeito ao processo de adaptação dos barorreceptores e a adaptação em relação à FC se processa de forma mais rápida do que a adaptação para o território renal (Barrett *et al.*, 2005).

Muitos estudos relacionam a ação da Ang II com as alterações das funções cardiovasculares em diferentes modelos de hipertensão (Korner, 1975; Guo & Abboud, 1984; Berecek *et al.*, 1987; Moreira *et al.*, 1988). Uma maior ativação do SRAA com conseqüente aumento na FC e prejuízo tanto no reflexo taquicárdico e bradicárdico foram observados no modelo de coartação da aorta (Michelini *et al.*, 1992 e 2001; Santos *et al.*, 1995). Adicionalmente, a Ang II também possui um importante papel na sensibilidade do reflexo barorreceptor e da atividade simpática no modelo SHR (Berecek *et al.*, 1987). Além disso, estudos de Michelini & Bonagamba (1988) demonstraram que a administração de Ang II no NTS reduz a sensibilidade do reflexo do barorreceptor (Michelini & Bonagamba, 1988).

Sabe-se que um prejuízo na sensibilidade reflexa do barorreceptor pode ocorrer em qualquer nível desse mecanismo, ou seja, no terminal barorreceptor, nas vias aferentes, na integração central, vias eferentes e efetores. Nossos dados mostram que a hiperatividade simpática depende de modificações na neurotransmissão em neurônios pré-motores do simpático, que podem por sua vez, também modificar o reflexo barorreceptor. Na fase estável do modelo de hipertensão

DOCA-sal sensível, por exemplo, há um aumento na atividade colinérgica da RVL, sem nenhuma alteração na atividade de outros núcleos do bulbo (Kubo *et al.*, 1996). Isto sugere, portanto, uma possível especificidade no aumento da atividade nervosa simpática e manutenção da hipertensão.

Em estudo prévio desenvolvido em nosso laboratório, demonstrou-se que em animais hipertensos 2R-1C existe uma modificação no número e/ou sensibilidade de receptores glutamatérgicos na região RVL e estas alterações poderiam estar envolvidas na geração e/ou manutenção deste modelo de hipertensão (Bergamaschi *et al.*, 1995). Demonstrou-se ainda que a retirada total da atividade dos neurônios da região RVL produzia importante queda da PA, para níveis não diferentes daqueles observados após administração de bloqueador ganglionar simpático. Além disso, a microinjeção na região RVL de antagonista glutamatérgico produziu queda da PA somente em animais hipertensos. Posteriormente, evidenciou-se que o bloqueio periférico da enzima conversora de angiotensina (doses subdepressoras) abolia a resposta hipotensora do antagonista glutamatérgico, sugerindo forte interação entre Ang II e glutamato (Carvalho *et al.*, 2003).

Entretanto, estudos complementares são importantes para compreender melhor o papel dos barorreceptores no controle do sistema cardiovascular. Alguns autores sugerem que a análise do reflexo do barorreceptor somente por meio das respostas de FC não é um parâmetro representativo de eferência simpática, ou seja, a vasculatura periférica pode ter um controle diferenciado e organizado topograficamente (Barret & Malpas, 2005).

Portanto, nossos resultados indicam que o modelo de hipertensão 2R-1C está associado com a perda da sensibilidade reflexa do barorreceptor, acompanhada de uma perda do tônus vagal (HF(IP)) e uma elevada LF (PAS) e VLF (SBP). Sugerindo uma elevada modulação vasomotora simpática quatro semanas após a colocação do clipe, que persiste até a sexta semana observada. Vale ressaltar, que mesmo com medições contínuas de PA e IP, não podemos afirmar ainda se a hiperatividade simpática antecede a HA ou se inicialmente há aumento de PA, com conseqüente prejuízo do reflexo do barorreceptor seguido de aumento de atividade vasomotora simpática. De qualquer forma, podemos afirmar que tais alterações dependem de níveis elevados de Ang II e conseqüente indução de estresse oxidativo no SNC.

## **5.2. Participação angiotensinérgica e do NO na região RVL nos animais com hipertensão 2R-1C já estabelecida (após 6 semanas)**

Nesta série de experimentos nós demonstramos que há uma super expressão gênica e protéica dos receptores AT-1 e iNOS na região RVL dos animais hipertensos (2R-1C). Adicionalmente, testamos funcionalmente estes achados por meio do bloqueio dos receptores AT-1 e da inibição específica da enzima iNOS nesta região. Os resultados obtidos em resposta a esses bloqueios foram uma redução da PA e simpato-inibição somente nos animais hipertensos. Diante disso, evidenciamos que a ação da Ang II (via receptor AT-1) e do NO (produzidos pela iNOS) na região RVL são imprescindíveis para manter o tônus vasomotor simpático e a hipertensão arterial no modelo 2R-1C.

Em relação a expressão gênica e protéica do receptor AT-1 na região RVL, resultados semelhantes foram observados em outros modelos experimentais, como, por exemplo, no infarto do miocárdio experimental (Liu *et al.*, 2006), visto que esse modelo também apresenta uma hipertonia simpática. Nesse sentido, após a administração de Losartan na região RVL, observamos uma resposta hipotensiva lenta e gradual somente nos animais hipertensos. O pico máximo da resposta foi visualizado após 30 minutos. Essa resposta depressora lenta pode ser explicada pelo mecanismo de ação da Ang II na região RVL. Em experimentos realizados em estudos *in vitro* em neurônios da região RVL (Li & Guyenet, 1996) demonstraram que as células C1 possuem receptores AT-1, e que estes ao serem ativados promovem uma redução da condutância de repouso de potássio. Esse efeito diminui a taxa de descarga e excitabilidade das células. Além disso, na presente Tese, o bloqueio do receptor angiotensinérgico também promoveu uma simpato-inibição nos animais hipertensos de forma gradual.

A hipótese de que a estimulação tônica da região RVL pelos receptores AT-1 poderia aumentar tônus vasomotor simpático é coerente com as observações de que a injeção de Ang II na RVL promove hiperatividade simpática e hipertensão em ratos (Muratani *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1993; Averill *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1997) e em outras espécies (Andreatta *et al.*, 1988; Allen *et al.*, 1988; Sasaki & Dampney, 1990). Allen e cols, em 1998, relataram a presença de receptor AT-1 na região RVL e em estudos posteriores *in vitro* realizados por outros autores demonstraram que a estimulação do receptor AT-1 pela Ang II promove um aumento na atividade dos neurônios da região RVL (Li & Guyenet, 1995 e 1996).

Diferentes modelos experimentais têm demonstrado que Ang II pode agir via receptor AT-1 na região RVL promovendo hipertensão, incluindo ratos SHR (Ito *et al.*, 2002; Allen, 2001), DOCA-sal (Ito *et al.*, 2003) e hipertensão dependente de renina induzida em ratos transgênicos (TGR(mREN2)27) (Fontes *et al.*, 2000). Diante disso, nosso intuito foi investigar se poderia existir um mecanismo semelhante no modelo de hipertensão 2R-1C, visto que é um modelo renina-angiotensina dependente.

Allen, em 2001, demonstrou que a administração de candesartan (antagonista angiotensinérgico de AT-1) na região RVL produz hipotensão e redução de 20% na ANS lombar em SHR. Adicionalmente, estudos posteriores deste mesmo autor relataram que a transfecção de adenovírus de uma forma constitutivamente ativa do receptor AT-1A na região RVL, resultou em HA a qual foi mantida durante três a quatro dias. Este achado é interessante, porque mostrou pela primeira vez que o aumento crônico da atividade de receptores AT-1A na região RVL promoveu aumento da PA durante um período de dias (Allen *et al.*, 2006).

Nossos dados sugerem um papel importante na ativação central do SRAA na manutenção da hipertensão no modelo 2R-1C e corroboram com relatos anteriores da literatura. Nishimura e cols, em 1992, demonstraram aumentos nos níveis de mRNA de angiotensinogênio em várias regiões cerebrais como bulbo e hipotálamo durante a fase estável de hipertensão 2R-1C. Além disso, há evidências de que a infusão intracerebroventricular do antisense do receptor AT-1 previne a hipertensão 2R-1C por inibir a síntese do receptor (Kagiyama *et al.*, 2001; Galli *et al.*, 2001).



Outro importante achado desta série de experimentos foi a super expressão, tanto gênica como protéica, de iNOS na região RVL dos animais hipertensos 2R-1C. Além disso, a inibição da iNOS na RVL promoveu hipotensão e simpato-inibição nos animais hipertensos, contudo não foram observadas alterações cardiovasculares em animais sham. Diante disso, além da participação do receptor angiotensinérgico AT-1 podemos evidenciar que o NO, produzido pela iNOS, também possui um papel fundamental na manutenção da hipertensão 2R-1C. Após 45 minutos da nanoinjeção bilateral de aminoguanidina na RVL, observamos que a pressão atingiu níveis de normalidade nos animais hipertensos, contudo depois de uma hora os valores de pressão tenderam a se restabelecer aos valores pré-nanoinjeção.

Os efeitos de NO na regulação da PA são controversos. Alguns estudos demonstram que o NO na região RVL reduz a PA por inibir a ANS (Tseng *et al.*, 1996; Kagiya *et al.*, 1997 e 1998; Zanzinger *et al.*, 1995), entretanto resultados opostos também são reportados (Hirooka *et al.*, 1996; Martins-Pinge *et al.*, 1997 e 2007; Chan *et al.*, 2003). Além disso, existem evidências que NO pode provocar respostas bifásicas dependendo da dose administrada (Morimoto *et al.*, 2000). Entretanto, as diferenças entre estes resultados podem estar relacionadas às diferenças metodológicas, por exemplo, a maioria dos experimentos foi realizada em ratos anestesiados e avaliados efeitos agudos de doadores de NO e bloqueadores não seletivos de NO.

Kimura *et al.*, 2005, transfectaram um adenovírus que super expressa iNOS na região RVL em animais normotensos e evidenciaram hipertensão e

simpato-excitação. Após a administração de aminoguanidina na região transfectada observou-se redução na PA e na atividade simpática. Adicionalmente, observaram que a administração de Tempol promoveu hipotensão e simpato-inibição, com consequente redução na produção de superóxidos e peroxidação lipídica nestes mesmos animais. Portanto, os resultados deste estudo sugeriram que o aumento da expressão de iNOS na região RVL foi importante na modulação simpática resultando em alterações de pressão, decorrentes do aumento do estresse oxidativo. Visto que o NO pode ser inibitório ou excitatório em neurônios da região RVL de acordo com a sua biodisponibilidade.

Estudos anteriores de nosso laboratório, demonstraram que a administração de Vit C diretamente na região RVL promove efeito depressor e redução da ANSR nos animais hipertensos 2R-1C (Oliveira-Sales *et al.*, 2008). Diante disso, não podemos excluir a possibilidade de que esta super produção de NO, pela ativação da iNOS, propicie maior interação com superóxido formando o peroxinitrito, que por sua vez gera o estresse oxidativo na região RVL nos animais hipertensos. Este mecanismo pode contribuir para hiperatividade simpática e hipertensão.

Nossos resultados corroboram com um estudo realizado recentemente em SHR. Os autores demonstraram que a super expressão de iNOS na região RVL contribui para o aumento da PA neste modelo, sendo que o bloqueio da enzima iNOS promoveu hipotensão e bradicardia (Kimura *et al.*, 2009).

Portanto, os resultados desta série de experimentos sugerem que um aumento na expressão dos receptores AT-1 e uma super ativação da iNOS na RVL podem ser um mecanismo importante na manutenção da pressão arterial elevada e ativação simpática no modelo 2R-1C.

### **5.3. Participação do estresse oxidativo nas regiões RVL e PVN nos animais com hipertensão 2R-1C já estabelecida (após 6 semanas)**

Nesta série de experimentos demonstramos a existência de um desequilíbrio entre a expressão gênica das subunidades da NAD(P)H oxidase e a enzima endógena antioxidante CuZnSOD nas regiões RVL e PVN dos animais 2R-1C, promovendo um estado de estresse oxidativo nestas regiões. Além disso, uma super expressão do receptor AT-1 também foi evidenciada nas regiões estudadas dos animais hipertensos. Nesse sentido, ao testarmos funcionalmente a importância destes resultados, observamos que a hipertensão e a simpato-excitação foi revertida ao administrarmos o Tempol (SOD mimética) nas regiões RVL e PVN dos animais hipertensos. Adicionalmente, testamos a influência do estresse oxidativo sistêmico na manutenção da hipertensão neste modelo. Para isto, foi administrado Tempol (EV) agudamente e evidenciamos uma resposta hipotensora e simpato-inibitória nos animais 2R-1C. Diante disso, estes resultados em conjunto, sugerem que o estresse oxidativo é um mecanismo essencial na manutenção do tônus vasomotor simpático e da hipertensão arterial no modelo dependente de Ang II 2R-1C.

Como evidenciado na série de experimentos anterior, há um aumento significativo da expressão gênica do receptor AT-1 na região RVL nos animais hipertensos 2R-1C. Adicionalmente, nesta série observamos um aumento na expressão gênica do receptor AT-1 também no PVN nesses animais. O PVN apresenta um predomínio dos receptores AT-1 com altas densidades especialmente na região parvocelular, região principalmente envolvida na regulação simpática e cardiovascular (Badoer, 2001; Allen *et al.*, 1998; McKinley *et al.*, 2003; Blair *et al.*, 1996). Portanto, esses resultados sugerem que aumento de Ang II central pode auto-regular os receptores AT-1, tanto nas regiões RVL como PVN, aumentando a sua expressão, no modelo de hipertensão 2R-1C.

O mecanismo pelo qual Ang II circulante exerce seu efeito central seria por meio da sua interação com seus receptores localizados nos Órgãos circumventriculares (OCV) (Wright & Harding, 1994, Ferguson & Bains, 1997; Phillips & Summers, 1998). Essas regiões são constituídas de grande número de capilares fenestrados e estão localizados ao redor do terceiro e quarto ventrículo, permitindo que a Ang II acesse o SNC. Além disso, como essas regiões mantêm estreita relação com RVL e PVN pela proximidade topográfica e por enviarem eferências para estes núcleos (Ku *et al.*, 1999; Potts *et al.*, 1999), são conhecidos como fundamentais no mecanismo de regulação da PA.

Contudo, o exato mecanismo pelo qual a Ang II está envolvida na geração do estresse oxidativo nas regiões RVL e PVN é desconhecido. Uma hipótese é que Ang II via receptor AT-1, aumenta a atividade de NAD(P)H oxidase, a qual estimula a produção de superóxidos centralmente no modelo de hipertensão 2R-1C. Sabe-se

que a principal fonte de ânion superóxido no sistema cardiovascular é a NAD(P)H oxidase. Ela é composta por duas subunidades de membrana (gp91phox e p22phox) e muitas subunidades citoplasmáticas (p47phox, p40phox e p67phox) (Lassegue & Clempus, 2003). Na presente Tese escolhemos estudar a expressão gênica de dois tipos de subunidades, uma de membrana – gp91phox e outra citoplasmática – p47phox e demonstramos um significativo aumento da expressão gênica da subunidade p47phox na RVL e uma tendência ao aumento ( $P=0.07$ ) da expressão da subunidade gp91phox nesta mesma região nos animais hipertensos. Enquanto que no PVN, a expressão gênica das duas subunidades (p47phox e gp91phox) encontrou-se significativamente elevada nos animais hipertensos comparados com os sham. É sabido que a ativação da NAD(P)H oxidase compreende múltiplos processos, sendo que estes são iniciados pela fosforilação da serina na subunidade p47phox regulatória citoplasmática. Depois da translocação da membrana, a subunidade p47phox ativada se associa com as subunidades gp91phox e p22phox na membrana para iniciar a produção da atividade enzimática (Touyz *et al.*, 2002; DeLeo *et al.*, 1996).

Existem muitos estudos sugerindo que a expressão gênica das subunidades NAD(P)H oxidase estão relacionados com a produção de ROS nos vasos sanguíneos, rim e sistema nervoso central. Li e cols, em 2003, demonstraram que a produção de ROS é reduzida pela transfecção do antisense p47phox nas células endoteliais e células do músculo liso vascular provenientes de pequenos vasos sanguíneos expostos a Ang II. Adicionalmente, ao remover o gene p47phox a produção de ROS foi abolida nas mesmas células estudadas, portanto, esses resultados sugerem que o estresse oxidativo nos vasos sanguíneos depende da

expressão do gene p47phox. Posteriormente, Modlinger e cols, em 2006, demonstraram que administração EV de RNA silenciadores de p22phox preveniu a hipertensão dependente da infusão de Ang II e, além disso, diminuiu a excreção de isoprostano na urina (um marcador de estresse oxidativo sistêmico). Recentemente, Perterson e cols, em 2007, demonstraram que os OCVs expressam abundantemente a subunidade gp91phox e identificaram esta subunidade como sendo fundamental para respostas cardiovasculares produzidas pelo aumento pela produção de ROS no modelo de hipertensão induzido pela Ang II. Gao e cols, em 2005, observaram que há um aumento na expressão de RNA mensageiro de p40phox, p47phox, p67pox e de gp91phox no modelo experimental de infarto do miocárdio após infusão Ang II. Vale ressaltar, que esse modelo é caracterizado por aumento na atividade vasomotora simpática. Portanto, vários trabalhos sugerem uma forte relação entre o aumento da expressão gênica das subunidades de NAD(P)H oxidase, particularmente gp91phox e p47phox, e o aumento do estresse oxidativo no SNC em resposta a Ang II. Além disso, o aumento do ânion superóxido associado com o aumento da atividade da NAD(P)H oxidase está evidenciado na hipertensão DOCA-sal (Wu *et al.*, 2001) e SHR (Zalba *et al.*, 2000).

Outros pesquisadores demonstraram que após a administração bilateral de Ang II na região RVL houve um aumento significativo da produção de superóxidos 5 minutos após a microinjeção, permanecendo os níveis elevados até os 20 minutos seguintes. Contudo, o pico de produção de superóxidos foi significativamente reduzido pela administração de Losartan. Além disso, demonstraram que a fosforilação dos resíduos de serina da subunidade p47phox induzida por Ang II na região RVL foi reduzida pela administração de losartan (Chan

*et al.*, 2005). Nesse sentido, nossos resultados sugerem que o aumento de Ang II central promove a super expressão gênica das subunidades de NAD(P)H oxidase nas regiões RVL e PVN aumentando a produção de superóxidos, na qual resulta na hiperatividade simpática em virtude da maior atividade de neurônios pré-motores do simpático no modelo de hipertensão 2R-1C. Estudos prévios demonstraram que o aumento na produção intracelular de ânions superóxidos é um mecanismo potente para aumentar a atividade neuronal (Zimmerman *et al.*, 2005).

Após observarmos que há uma produção excessiva de ânion superóxido nos animais hipertensos nas regiões RVL e PVN, nosso objetivo foi investigar a expressão gênica da defesa antioxidante enzimática endógena nestas mesmas regiões. Pois o desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes promove o estresse oxidativo. Diante disso, escolhemos estudar uma das enzimas a CuZnSOD. Nossos resultados evidenciaram uma semelhança na defesa antioxidante enzimática CuZnSOD na RVL nos animais sham e hipertensos e uma redução com tendência significativa nos animais 2R-1C no PVN. Portanto, nossos resultados sugerem que o estresse oxidativo poderia aumentar a atividade dos neurônios das regiões RVL e PVN no modelo 2R-1C, visto que há um aumento na produção de superóxidos e um sistema antioxidante ineficiente. Adicionalmente, como as análises da região do córtex pré-frontal (controle negativo) não apresentaram diferenças entre os grupos analisados, este efeito parece ser aparentemente preferencial para os grupos pré-motores do simpático.

Recentemente, Chan e cols., em 2006 demonstraram que a *downregulation* da expressão gênica e da atividade enzimática de CuZnSOD pode

aumentar os níveis de superóxidos na região RVL, promovendo aumento no estresse oxidativo, hipertensão e simpatoexcitação no modelo de hipertensão SHR. Zanzinger e Czachurski, em 2000, estudaram os efeitos de microinjeções de SOD na RVL no modelo 2R-1C. Suínos foram cronicamente tratados com nitratos orgânicos os quais induzem farmacologicamente ao aumento do estresse oxidativo, nestas condições, microinjeções de SOD foram administradas na região RVL e observaram uma diminuição de mais de 70% da ANS. Em outro experimento, o estresse oxidativo severo levou a formação de uma significativa quantidade de peroxinitrito dentro da RVL causando marcada e irreversível depressão do SNS. Posteriormente, Kishi e cols. em 2004, observaram que os níveis de TBARS estão elevados na região RVL dos animais SHRSP comparados com ratos Wistar-Kyoto. Além disso, demonstraram que microinjeções de Tempol (SOD sintético) na região RVL provocavam queda da PAM de forma dose dependente em SHR, porém, essa resposta não era evidenciada em ratos Wistar-Kyoto. Esses dados em conjunto, indicam que o estresse oxidativo é um sinalizador importante no que diz respeito a excitabilidade de neurônios da região RVL. Na presente Tese, a redução aguda do estresse oxidativo nessa região normalizou a HA e reduziu significativamente a atividade vasomotora simpática.

Além das alterações vistas na região RVL, mudanças na neurotransmissão no PVN também podem estar envolvidas na ativação simpática na hipertensão. Os neurônios autonômicos do PVN são capazes de alterar a atividade vasomotora simpática e os parâmetros cardiovasculares por agirem diretamente nos neurônios pré-ganglionares da medula espinal ou via conexões diretas com a região RVL (Strack *et al.*, 1989).



Este foi o primeiro estudo demonstrando que o Tempol administrado diretamente nas regiões RVL e PVN produz diminuição na PAM e ANSR no modelo 2R-1C. Nossos resultados demonstraram que a menor dose de Tempol (1nmol) nanoinjetado na região RVL nos animais hipertensos provocou maior hipotensão comparado com a maior dose (5 nmol). Entretanto, curiosamente, no PVN, a maior dose de Tempol provocou a maior queda de PA. Nos animais sham, nenhuma dose de Tempol produziu alterações na PAM ou ANSR, tanto na RVL como PVN. Entretanto, a expressão gênica de AT-1 e das subunidades de NAD(P)H oxidase apresentou-se mais elevada no PVN comparado ao RVL nos animais hipertensos. Portanto, podemos especular que devido a este resultado, a maior dose de Tempol causou a maior queda da PAM e ANSR no PVN e a menor dose de Tempol foi capaz de reduzir significativamente a pressão na RVL. Considerando esses resultados, sugerimos que o aumento do estresse oxidativo na região RVL e PVN possui um importante papel na manutenção da pressão arterial e da atividade vasomotora simpática no modelo de hipertensão 2R-1C.

Os mecanismos pelos quais o aumento no estresse oxidativo na RVL e PVN aumentam a PA e a atividade simpática são desconhecidos. Essas repostas podem ser mediadas pela interação entre o superóxido e o NO. O superóxido reage rapidamente com o NO, formando o peroxinitrito e diminuindo a disponibilidade de NO (Beckman & Koppenol, 1996). Portanto, um aumento nos níveis de superóxidos nas regiões RVL e PVN pode diminuir a disponibilidade de NO nestas regiões, levando o aumento dos disparos neuronais. Este mecanismo pode contribuir para hiperatividade simpática e HA. Entretanto, esta hipótese precisa ser confirmada pela avaliação da produção de superóxidos e peroxinitrito nestas regiões.

Sugere-se que o Tempol seja um potente antioxidante, pois ao reagir com o ânion superóxido, previne a formação de peroxinitrito, aumenta a biodisponibilidade de NO e assim, diminuiu o efeito pressor e a ativação reflexa do sistema nervoso simpático. Sabe-se que a taxa de reação constante entre SOD e ânion superóxido estimada é  $2 \times 10^9 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  e entre NO e ânion superóxido de  $1,9 \times 10^{10} \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Gokce *et al.*, 1999; Ting *et al.*, 1997). Portanto, para o Tempol competir eficientemente com o NO pelo ânion superóxido, a sua deve exceder em 10 vezes a de NO. Contudo, como o efeito do Tempol é mediado em parte pelo NO, uma molécula de período de meia vida muito curto, a resposta observada é aparentemente fugaz e transiente nas regiões RVL e PVN.

Nesta série de experimentos, também foi examinado se o estresse oxidativo estava presente sistemicamente no modelo de hipertensão 2R-1C. Nossos resultados demonstraram que os níveis de TBARS plasmático estão significativamente elevados nos animais hipertensos comparados com os animais sham. Adicionalmente, realizamos infusão EV de Tempol (10 e 30 mg/ Kg) e observamos efeito hipotensor e uma simpato-inibição dose-dependente somente nos animais 2R-1C. Guron e cols, em 2006, administraram Tempol agudamente (200  $\mu\text{M/ Kg/ h}$ ) em ratos Sprague-Dawley hipertensos 2R-1C e também observaram uma queda de 15% na PAM. Além disso, outros investigadores têm reportado resultados semelhantes em animais normotensos (Xu *et al.*, 2001) e DOCA-sal (Xu *et al.*, 2002; 2004; Meng *et al.*, 2003). Portanto, nossos resultados corroboram com a literatura de que o Tempol é um eficiente antioxidante na hipertensão. Como é altamente permeável à membrana, é possível que a administração de Tempol EV seja capaz

de atravessar a membrana hemato-encefálica e atingir a RVL e o PVN, gerando simpato-inibição nos animais 2R-1C.

O Tempol tem sido bem caracterizado com um *scavenger* de superóxidos, entretanto, existem vários trabalhos que relatam outras funções antioxidantes, incluindo redução de metais hipervalentes e redução de peróxido de hidrogênio (Samuni *et al.*, 1991; Offer *et al.*, 2000). Nesse sentido, diante dos resultados apresentados nesta série de experimentos sugerimos a importância dos efeitos centrais de Tempol, promovendo redução da PA e da atividade simpática na hipertensão 2R-1C.

#### **5.4. Participação do estresse oxidativo na região RVL durante a evolução da hipertensão 2R-1C (após 3 semanas)**

Nesta série de experimentos nós demonstramos que a super expressão crônica de CuZnSOD, que leva a aumento de SOD na região RVL preveniu o desenvolvimento da hipertensão 2R-1C e reduziu a produção de ânions superóxidos nessa região. Esses resultados sugerem que o ânion superóxido intracelular na região da RVL é essencial para os mecanismos sinalizadores do desenvolvimento do modelo de hipertensão 2R-1C.

Nossa hipótese corrobora com os achados de Chan *et al.*, em 2006 onde relataram que a *downregulation* da expressão gênica e da atividade enzimática de CuZnSOD na região RVL pode contribuir para o aumento dos níveis dos ânions

superóxidos nesta região, gerando estresse oxidativo, HA e simpato-excitação nos animais SHR.

Vários pesquisadores têm utilizado a técnica da transfecção viral em regiões específicas do cérebro para estudar o efeito da super expressão ou inibição de determinados agentes. Diante disso, nesta série de experimentos realizamos a transfecção de adenovirus CuZnSOD na região RVL nos animais hipertensos. Estudos demonstram que a transfecção de adenovirus MnSOD na região RVL promove hipotensão e bradicardia em ratos SHRSP. Adicionalmente, não foram observadas alterações nos parâmetros cardiovasculares nos animais Wistar-Kyoto (Kishi *et al.*, 2004). Zimmerman e cols., em 2002, utilizando administração intracerebroventricular tanto de Ad-MnSOD or Ad-CuZnSOD preveniram a resposta pressora induzida pela Ang II. Além disso, eles observaram que Ad-ECSOD – a qual age na matriz extracelular - não promoveu melhora da hipertensão induzida pela Ang II (Zimmerman *et al.*, 2004<sup>a</sup>; 2004<sup>b</sup>). Como mencionado anteriormente, a Ang II exerce seu papel centralmente ao se ligar em receptores em regiões do cérebro desprovida da barreira hemato-encefálica, conhecidos como os CVOs, por exemplo: o órgão subfornical (SFO). Os resultados de Zimmerman sugerem que a infusão de Ang II promove o aumento intracelular e não extracelular de ânions superóxidos no SFO. Na presente Tese, demonstramos que há aumento de ânions superóxidos na região RVL em ratos 2R-1C.

Nossos resultados demonstram que a transfecção de Ad-CuZnSOD na região RVL preveniu o aumento da modulação do tônus vasomotor simpático (LF (PAS) nos animais 2R-1C. Estes resultados sugerem que o estresse oxidativo na

região RVL pode contribuir para a geração e manutenção da hiperatividade simpática no modelo de hipertensão 2R-1C.

Adicionalmente, demonstramos que a super expressão de CuZnSOD na região RVL reduziu a taquicardia e preveniu a redução do ganho do componente parassimpático do barorreceptor cardíaco. Os mecanismos envolvidos na normalização do ganho do barorreceptor cardíaco podem ser devido a redução na atividade simpática ao coração e portanto, permitindo que a transmissão cardíaca vagal se torne mais efetiva. Levy, em 1991, relatou que interações não-lineares entre o SNS e SNP ocorrem no coração, no qual altos níveis de atividade simpática pode deprimir a bradicardia vagal. Contudo, nós não podemos excluir a possibilidade do efeito central de CuZnSOD nos neurônios envolvidos na integração dos barorreceptores. Além disso, sabe-se que há uma relação entre o estresse oxidativo e o prejuízo no baroreflexo (Monahan, 2007).

Li e cols.; 1996 demonstraram que a geração de ROS na artéria carótida de coelhos com aterosclerose reduz a atividade nervosa do seio carotídeo em resposta às elevações da pressão, sendo que esta resposta poderia ser exacerbada com a administração exógena de ROS e prevenida com a administração de antioxidantes. Diante disso, o aumento na excitabilidade neuronal da região RVL pode ser em parte mediado pelo prejuízo do reflexo do barorreceptor aumentado pelo estresse oxidativo observado nesta região. Entretanto, o exato mecanismo pelo qual as ROS na região RVL altera a função reflexa do barorreceptor não está bem estabelecida. Evidências anteriores suportam a idéia que a redução na biodisponibilidade de NO nos neurônios cardiovasculares pode estar envolvido neste

mecanismo (Zanzinger, 1999).

Portanto, os resultados desta série de experimentos demonstram que o estresse oxidativo na região RVL é essencial para ativação do tônus vasomotor simpático e para o desenvolvimento da hipertensão 2R-1C. Níveis elevados endógenos de Ang II e um desequilíbrio na sensibilidade reflexa do barorreceptor são provavelmente os maiores mecanismos de aumento de ânions superóxidos na região RVL na hipertensão 2R-1C.

#### **5.5. Participação do estresse oxidativo sistêmico nos mecanismos centrais nos animais com hipertensão 2R-1C já estabelecida (após 6 semanas)**

Nesta série de experimentos demonstramos que o tratamento crônico com Vit C, como estratégia para reduzir o estresse oxidativo sistêmico, preveniu a HA e o aumento da atividade simpática no modelo 2R-1C. Além disso, evidenciamos nesta série, que o tratamento crônico com Vit C interferiu nos mecanismos centrais no período de estabilidade da hipertensão 2R-1C, visto que reduziu a expressão gênica das subunidades da NAD(P)H oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD, AT-1, transportador Glut-1, IL-  $\beta$ , iNOS e nNOS nas regiões pré-motores do simpático – RVL e PVN dos animais hipertensos.

Muitas terapias antioxidantes utilizam a administração crônica de Vit C. Por ser hidrossolúvel é necessário consumi-la frequentemente para manter a saturação dos tecidos, pois ela é armazenada apenas em quantidades limitadas. A

ingestão diária de Vit C deve ser igual à quantidade excretada ou destruída por oxidação, ou seja, o balanço deve ser neutro. Os adultos sadios perdem em média 3-4% de sua reserva corporal dessa vitamina diariamente. Para manter uma reserva de 1500 mg de Vit C no homem adulto, seria necessária uma absorção de cerca de 60 mg/dia. Vale ressaltar, que toda a Vit C corporal em humanos é proveniente da dieta.

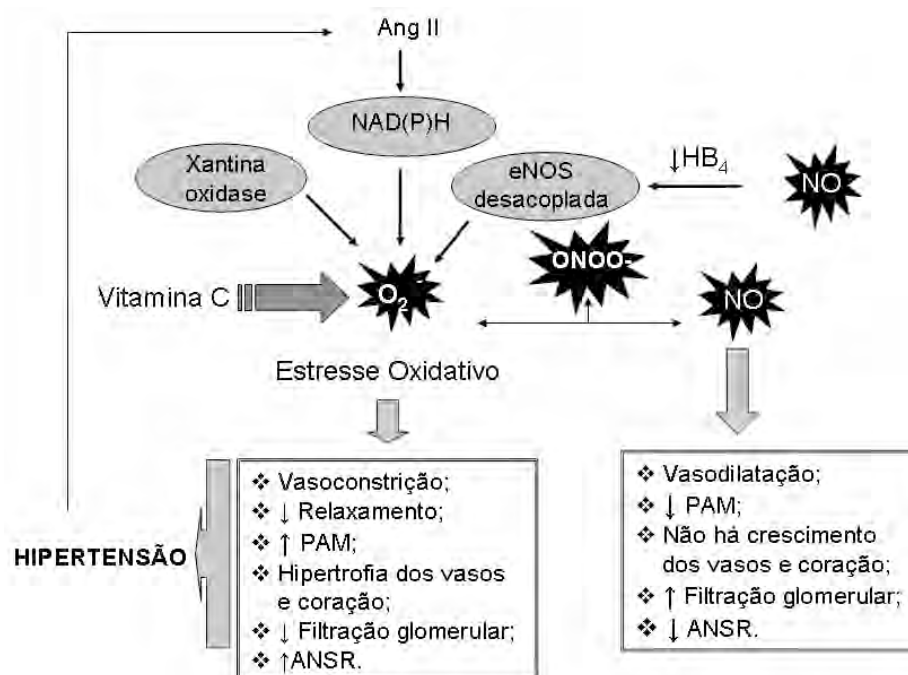
Estudos posteriores, tanto experimentais como clínicos, demonstraram efeitos benéficos da Vit C sobre a PA em casos de hipertensão. A administração aguda de 2 g de Vit C melhorou a vasodilatação dependente do endotélio, reduziu a rigidez arterial e diminuiu a agregação plaquetária em seres humanos (Ting *et al.*, 1997, Wilkinson *et al.*, 1999). Nishikawa e cols, em 2003 administraram 200 mg/rato/ dia de Vit C em água de beber de ratos SHR durante 53 semanas, e verificaram uma diminuição da PA nestes ratos. Estudos comprovaram que a administração oral de 2 g de Vit C reverte a disfunção vasomotora endotelial de pacientes com doença na artéria coronária (Levine *et al.*, 1996). Além disso, o tratamento crônico com Vit C (500 mg/dia) durante um mês em pacientes com hipertensão essencial, diminuiu a pressão sistólica média de  $155 \pm 22$  para  $142 \pm 16$  mmHg (Duffy *et al.*, 1999).

Nesta Tese, observamos que tratamento crônico com Vit C produziu uma diminuição significativa da PAM em animais hipertensos renovasculares 2R-1C, contudo, também foi observada uma pequena redução da PAM nos animais sham, porém não significativa. Esta queda de PAM nos hipertensos foi acompanhada de queda na ANSR. Estes resultados corroboraram com os resultados obtidos

anteriormente, onde demonstramos que o modelo de hipertensão 2R-1C é caracterizado por um estado de estresse oxidativo exacerbado e que a administração aguda de antioxidante (Tempol) reduz a PA e ANSR.

Nossa hipótese como mecanismo vascular é que a Vit C compete com o NO pelo ânion superóxido. Sabe-se que a taxa de reação constante entre Vit C e ânion superóxido estimada é  $3,3 \times 10^5 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  e entre NO e ânion superóxido de  $1,9 \times 10^{10} \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Como a cinética de reação entre Vit C e ânion superóxido é  $10^5$  vezes menor que a de NO e ânion superóxido, para competir efetivamente é necessário administrar altas concentrações fisiológicas de Vit C para produzir o efeito desejado (Gokce *et al.*, 1999; Ting *et al.*, 1997; Huie & Padmaja, 1993; Jackson *et al.*, 1998; Sherman *et al.*, 2000). Portanto, quando a Vit C reage com o ânion superóxido, aumenta a biodisponibilidade de NO e conseqüentemente, diminuiu o efeito pressor. Vale ressaltar, que a dose utilizada em ratos é alta, particularmente pelo alto metabolismo basal dessa espécie. A **figura 46** mostra um resumo esquemático de como o estresse oxidativo periférico pode gerar a HA.





**Figura 46. Resumo esquemático do mecanismo gerador da HA via ROS.**

Além de investigarmos a ação do tratamento crônico com Vit C sobre os efeitos cardiovasculares e a atividade vasomotora simpática, também foram estudadas as expressões gênicas de várias moléculas nas regiões RVL e PVN no modelo de hipertensão 2R-1C após o tratamento.

Contudo, sabe-se que a Vit C possui uma certa limitação em atravessar a barreira hemato-encefálica, essa a ação só é permitida através do transporte facilitado (Glut-1) (Agus *et al.*, 1997). Nossos resultados comprovaram que a expressão gênica de Glut-1 nas regiões RVL e PVN está significativamente aumentada nos animais hipertensos comparados com os sham. Nesse sentido, podemos sugerir que a Vit C deve atingir os núcleos pré-motores do simpático RVL e PVN causando simpato-inibição, visto que os animais hipertensos possuem mais Glut-1 nestas regiões. Contudo, após o tratamento crônico com a Vit C a expressão de Glut-1 diminuiu na região RVL e PVN nos animais hipertensos. Diante disso, é

possível que essa expressão seja controlada pelos níveis de Vit C dentro do SNC, com mais Vit C disponível, menor expressão de Glut-1. Vale ressaltar, que o SNC tem aproximadamente 10 vezes mais Vit C comparando-se com regiões fora do SNC. Acredita-se ainda, que a Vit C seja fundamental para a homeostase de neurônios catecolaminérgicos (Agus *et al.*, 1997). A região RVL, por exemplo, é rica em neurônios catecolaminérgicos C1.

Estudos realizados em modelo de hipertensão dependente de Ang II, demonstraram que o estresse oxidativo induzido por Ang II foi completamente bloqueado com a administração de Losartan. Portanto, os pesquisadores concluíram que esses efeitos são mediados através de receptores AT-1 (Rajagopalan *et al.*, 1996; Laplante *et al.*, 2003). Nossos resultados concordam com estes estudos, pois evidenciamos um aumento na expressão de RNA mensageiro desse receptor, tanto na RVL como PVN, de animais hipertensos. Com o tratamento da Vit C, a expressão gênica de AT-1 reduziu significativamente somente nos animais hipertensos. Podemos aventar que este resultado seja devido a uma redução no estado de estresse oxidativo (Lazartigues *et al.*, 2004).

Como mencionado anteriormente, nossa hipótese é de a Ang II, via receptor AT-1, ativa a NAD(P)H oxidase a aumentar a produção central do ânion superóxido na hipertensão renovascular. Resultados da série anterior de experimentos demonstraram um significativo aumento nos dois tipos de subunidades da NAD(P)H oxidase, a p47phox e gp91phox, tanto na RVL como no PVN, em animais hipertensos renovasculares. Contudo, evidenciamos nesta série de experimentos que após o tratamento crônico com Vit C, houve uma redução

significante na expressão das subunidades na região RVL, tanto no grupo sham como no hipertenso. Enquanto no PVN, a redução foi evidenciada apenas no grupo hipertenso tratado. Diante disso, esses resultados sugerem que estas regiões específicas do SNC podem estar associadas com o estado de estresse oxidativo na hipertensão renovascular, visto que as ROS podem aumentar a atividade vasomotora simpática e perpetuar o estado hipertensivo.

O balanço entre a geração de ROS e sistema antioxidante determina o grau de estresse oxidativo. Nossos resultados apontam para um aumento significativo da expressão gênica das subunidades de NAD(P)H oxidase nas regiões RVL e PVN, contudo a expressão de CuZnSOD foi semelhante nos animais hipertensos ao comparar com os animais sham. Após o tratamento com Vit C não foram observadas alterações nestes resultados. Nesse sentido, podemos sugerir que o sistema endógeno antioxidante central – CuZnSOD – independe da ação de outro antioxidante.

Nesta série de experimentos, avaliamos a expressão de mRNA de nNOS e iNOS na região RVL e no PVN de animais hipertensos renovasculares tratados com Vit C. Nos resultados anteriores demonstramos um aumento da expressão gênica de iNOS na região RVL dos animais hipertensos. Nesta série, evidenciamos também um aumento na expressão gênica da isoforma nNOS, contudo não tão significativa ao se comparar com a expressão de iNOS na RVL dos animais hipertensos. Adicionalmente, a região do PVN apresentou aumento significativo nas expressões gênicas de nNOS e iNOS nos animais hipertensos. Após o tratamento com vitamina C, observamos uma redução significativa na expressão gênica de

nNOS e iNOS nas regiões RVL e PVN somente nos animais hipertensos. Diante desses resultados, podemos sugerir que o aumento dessas enzimas nestas regiões estudadas nos animais hipertensos seja um mecanismo regulatório na tentativa de diminuir a PA, contudo esta estratégia pode contribuir ainda mais para estado oxidativo. Após o tratamento com a Vit C, esse mecanismo não é mais tão imprescindível.

O estresse oxidativo pode ativar ainda vias inflamatórias e liberar citocinas, como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Schmieder, 2005). Segundo Campese e cols, em 2004, o aumento de nNOS é regulado pela IL-1 $\beta$ . Nossos resultados corroboram com esta afirmação, pois a expressão gênica de IL-1 $\beta$  demonstrou-se coincidir com os resultados de nNOS e iNOS. Ou seja, nos animais hipertensos, tanto na RVL e PVN, a expressão de mRNA de nNOS, iNOS e de IL-1 $\beta$  demonstrou-se elevada. Entretanto, após o tratamento com Vit C observamos redução na expressão de nNOS, iNOS e conseqüentemente IL-1  $\beta$  nos animais hipertensos.

Estudos realizados em modelo experimental de injúria renal provocado pela infusão de fenol, evidenciaram uma super expressão gênica de IL-1 $\beta$  e nNOS no hipotálamo posterior, no PVN e no locus coeruleus. Contudo, após a administração intracerebroventricular de PEG-SOD essa super expressão de IL-1 $\beta$  e nNOS foram revertidos para valores da normalidade nas regiões estudadas. Nesse sentido, esses resultados sugerem que a inibição na produção de IL-1 $\beta$  e nNOS, a nível de transcrição, participam na ativação do SNS neste modelo de injúria renal induzido por fenol (Ye *et al.*, 2006). Diante disso, podemos sugerir um mecanismo semelhante no modelo de hipertensão 2R-1C.

Finalizando, pôde-se observar nesta série de experimentos que o tratamento crônico com Vit C reverteu a HA e a simpato-excitação gerada pelo modelo 2R-1C. Além disso, a Vit C promoveu seus efeitos antioxidantes, tanto sistemicamente como no SNC, em regiões específicas para o controle do tônus vasomotor simpático, como RVL e PVN na hipertensão 2R-1C. Contudo, novos estudos se fazem necessários para melhor compreender o papel do estresse oxidativo nos mecanismos de controle cardiovascular, por exemplo, como o superóxido produzido intracelularmente é capaz de estabelecer um novo patamar de atividade neuronal, atividade vasomotora simpática e conseqüente HA.

## 6. CONCLUSÃO

As regiões RVL e PVN contêm neurônios pré-motores do simpático envolvidos na manutenção do tônus vasomotor simpático e, conseqüentemente, da PA. Alterações na excitabilidade neuronal destes neurônios é provavelmente um importante mecanismo envolvido no aumento da atividade simpática na HA.

Baseado em nossos resultados, podemos sugerir que o sistema angiotensinérgico, nitrérgico e o estresse oxidativo nas regiões RVL e PVN estão envolvidos na manutenção do tônus simpático e da HA dependente de Ang II. O estresse oxidativo em neurônios pré-motores do simpático é um mecanismo essencial para o estabelecimento e manutenção da HA Ang II - dependente.

Contudo, novas estratégias para o controle do estresse oxidativo devem ser endereçados para o novo paradigma do tratamento da HA. Na presente Tese, diferentes técnicas foram empregadas, desde abordagens moleculares até a análise de funções cardiovasculares no rato intacto. Entretanto, futuros estudos moleculares e integrativos são necessários para melhor compreender o balanço entre estresse oxidativo central e a sua contribuição na hipertensão dependente de Ang II.

A **Figura 47** sumariza as principais observações feitas neste estudo enfocando as principais alterações na neurotransmissão na região RVL e no PVN na hipertensão 2R-1C.

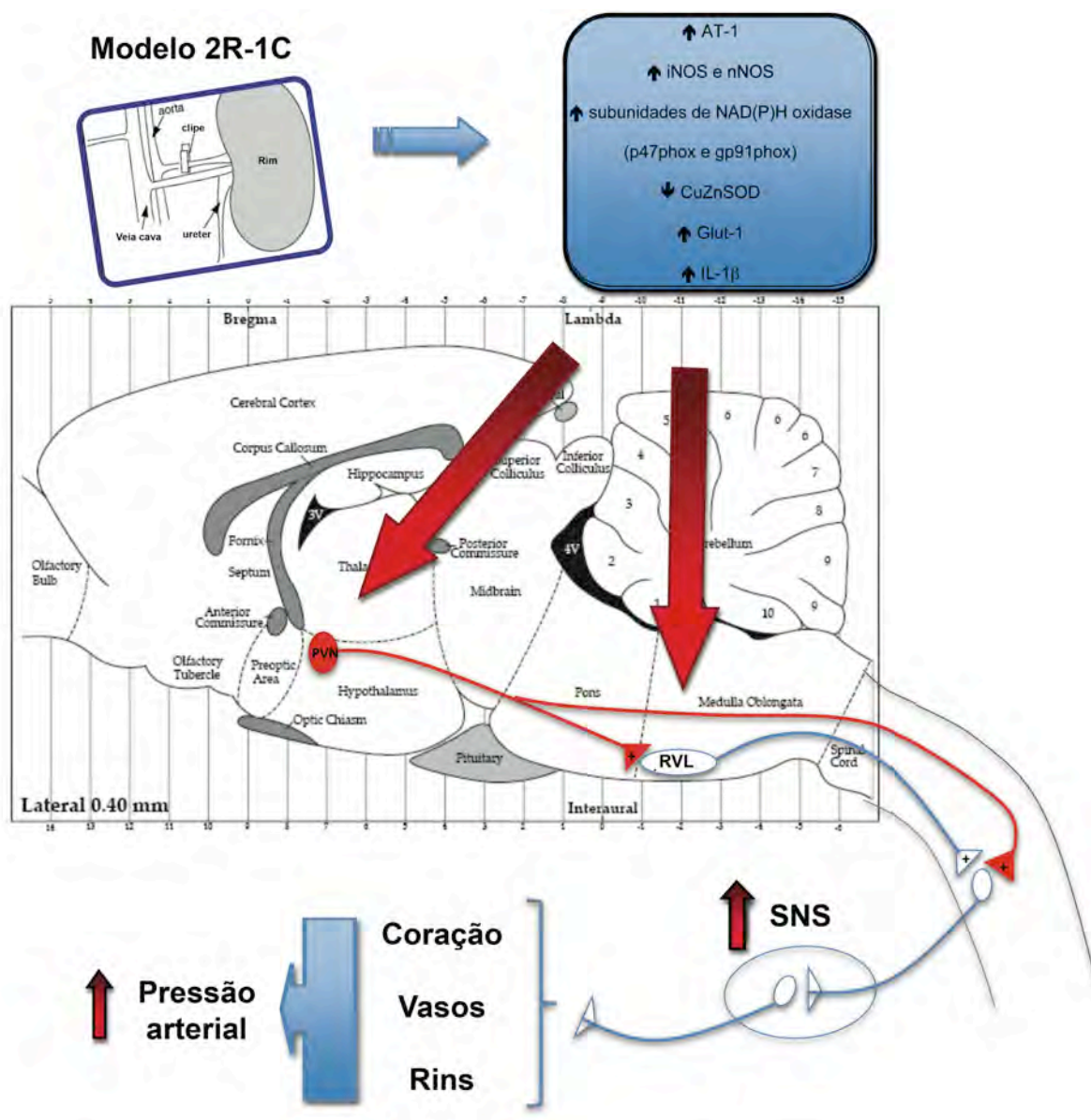


Figura 47. Esquema representativo das principais observações deste estudo mostrando que alterações em vários fatores, como AT-1, iNOS, nNOS, subunidades da NAD(P)H oxidase (p47phox e gp91phox), CuZnSOD, IL-1β e Glut-1 nas regiões pré-motoras do simpático, RVL e PVN, podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão 2R-1C.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agus DB, Gambhir SS, Pardridge WM, Spielholz C, Baselga J, Vera JC, & Golde DW (1997). Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J Clin Invest* **100**, 2842-2848.

Allen AM, Dampney RAL, & Mendelsohn FAO (1988). Angiotensin receptor binding and pressor effects in cat subretrofacial nucleus. *Am J Physiol* **255**, H1011–H1017.

Allen AM, Moeller I, Jenkins T A, Zhuo J, Aldred GP, Chai SY, & Mendelsohn FAO (1998). Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain Res Bull* **47**, 17-28.

Allen AM (2001). Blockade of angiotensin AT1-receptors in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats reduces blood pressure and sympathetic nerve discharge. *J Ren Angiotensin-Aldosterone System* **2**(suppl 1), S120–S124.

Allen AM (2002). Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension* **39**, 275-280.

Allen AM, Dosanjh JK, Erac M, Dassanayake S, Hannan RD, & Thomas WG (2006). Expression of constitutively active angiotensin receptors in the rostral ventrolateral medulla increases blood pressure. *Hypertension* **47**(6), 1054-61.



Andreatta SH, Averill DB, Santos RAS, & Ferrario CM (1988). The ventrolateral medulla: a new site of the action of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. **11**(suppl I), I-163–I-166.

Ardailou R (1997). Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **1**: 28-34.

Atlas SA (1998). The renin-angiotensin system revisited: classical and nonclassical pathways of angiotensin formation. *The Mount Sinai Journal of Medicine* **65**: 87-95.

Averill DB, Tsuchihashi T, Khosla MC, & Ferrario CM (1994). Losartan, nonpeptide angiotensin II-type 1 (AT1) receptor antagonist, attenuates pressor and sympathoexcitatory responses evoked by angiotensin II and L-glutamate in rostral ventrolateral medulla. *Brain Res* **665**, 245–252.

Badoer E (2001). Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**, 95-99.

Barrett CJ & Malpas SC (2005). Problems, possibilities, and pitfalls in studying the arterial baroreflexes' influence over long-term control of blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R837-845.

Barrett CJ, Guild SJ, Ramchandra R, & Malpas SC (2005). Baroreceptor denervation prevents sympathoinhibition during angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* **46**(1),168-72.

Beckman JS & Koppenol WH (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271**(5 Pt 1), C1424-37. Review.

Beluli DJ & Weaver LC (1991). Areas of rostral medulla providing tonic control of renal and splenic nerves. *Am J Physiol* **261**, H1687-H1692.

Berecek KH, Kirk KA, Nagahama S, & Oparil S (1987). Sympathetic function in spontaneously hypertensive rats after chronic administration of captopril. *Am J Physiol* **252**, H796–H806.

Bergamaschi C, Campos RR, Schor N, & Lopes OU (1995). Role of the rostral ventrolateral medulla in maintenance of blood pressure in rats with Goldblatt hypertension. *Hypertension* **26**, 1117-1120.

Bergamaschi CT, Campos RR, & Lopes OU (1999). Rostral ventrolateral medulla : A source of sympathetic activation in rats subjected to long-term treatment with L-NAME. *Hypertension* **34**, 744-747.

Beyer W, Imlay J, & Fridovich I (1991). Superoxide dismutases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **40**, 221-253.

Blair MI, Piekut D, Want A, & Olschowka JA (1996). Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in cardiovascular regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **23**, 161-165.

Brody MJ (1988). Central nervous system and mechanism of hypertension. *Clin Physiol Biochem* **6**, 230-239.

Campese VM, Ye SO, Zhong H, Yanamadala V, Ye Z, & Chiu J (2004). Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H695-H703.

Campos RR, Colombari E, Cravo S, & Lopes O U (2001). Hipertensão arterial: o que tem a dizer o sistema nervoso. *Rev Bras Hipertens* **8**, 41-54.

Campos RR & Bergamaschi CT (2006). Neurotransmission alterations in central cardiovascular control in experimental hypertension. *Curr Hypertens Rev* **22**, 193–198.

Campos RR, Oliveira-Sales EB, & Bergamaschi CT. Regulação Neuro-humoral do Sistema Cardiovascular. **In:** Serrano Jr CV Jr, Timerman A, Stefanini E, ed. *Tratado de Cardiologia SOCESP*. 2ª ed. São Paulo, SP: Editora Manole. 2009:113-124.

Carvalho TH, Bergamaschi CT, Lopes OU, & Campos RR (2003). Role of endogenous angiotensin II on glutamatergic actions in the rostral ventrolateral medulla in Goldblatt hypertensive rats. *Hypertension* **42**(4), 707-12.

Cerutti C, Gustin MP, Paultre CZ, Lo M, Julien C, Vincent M & Sassard J (1991). Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *Am J Physiol* **261**, H1292-1299.

Chan SHH, Wang L-L, & Chan JYH (2003). Differential engagements of glutamate and GABA receptors in cardiovascular actions of endogenous nNOS or iNOS at rostral ventrolateral medulla of rats. *Br J Pharmacol* **138**, 584–593.

Chan SH, Hsu KS, Huang CC, Wang LL, Ou CC, & Chan JY (2005). NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. *Circ Res* **97**(8), 737-9.

Chan SH, Tai MH, Li CY, & Chan JY (2006). Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Biol Med* **40**(11), 2028-39.

Chen X, Touyz RM, Park JB, & Schiffrin EL (2001). Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* **38**(3 Pt 2), 606-11.

Chou T-C, Yen M-H, Li C-Y, & Ding Y-A (1998). Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* **31**, 643– 648.

Chu Y, Iida S, Lund DD, Weiss RM, DiBona GF, Watanabe Y, Faraci FM, & Heistad DD (2003). Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain. *Circ Res* **92**, 461–468.

Colombari E, Bonagamba LG, & Machado BH (1994). Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. *Am J Physiol* **266**, R730-738.

Colombari E, Sato MA, Cravo SL, Bergamaschi CT, Campos RR Jr, & Lopes OU (2001). Role of the medulla oblongata in hypertension. *Hypertension* **38**, 549-554.

Crandall CG (2000). Carotid baroreflex responsiveness in heat-stressed humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H1955-1962.

Dampney RA & Moon EA (1980). Role of ventrolateral medulla in vasomotor response to cerebral ischemia. *Am J Physiol* **239**, H349-H358.

Dampney RAL (1994). Functional Organization of Central Pathways Regulation the Cardiovascular System. *Physiol Rev* **74**(2), 323-364, 1994.

Dampney RA, Fontes MA, Hirooka Y, Horiuchi J, Potts PD, & Tagawa T (2002). Role of angiotensin II receptors in the regulation of vasomotor neurons in the ventrolateral medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**(5-6), 467-72. Review.

Dampney RA, Horiuchi J, Tagawa T, Fontes MA, Potts PD, & Polson JW (2003). Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. *Acta Physiol Scand* **177**, 209-218.

Dampney RA, Horiuchi J, Killinger S, Sheriff MJ, Tan PS, & McDowall LM (2005). Long-term regulation of arterial blood pressure by hypothalamic nuclei: some critical questions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **32**, 419-425.

Dawson VL & Dawson TM (1996). Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat* **10**, 179-190.

De Burgh Daly M (1997). *Peripheral Arterial Chemoreceptors and Respiratory-Cardiovascular Integration*. Oxford Univ. Press, Oxford, UK.

De Champlain J, Wu RO, Girouard H, Karas M, EL Midaoui A, Laplante MA, & Wu L (2004). Oxidative Stress in Hypertension. *Clin and Exp Hypertens* **26**(7-8), 593-601.

deBoer RW, Karemaker JM, & Strackee J (1987). Hemodynamic fluctuations and baroreflex sensitivity in humans: a beat-to-beat model. *Am J Physiol* **253**, H680-689.

DeLeo FR, Ulman KV, Dvais AR, Jutila KL, & Quinn MT (1996). Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67phox and flavocytochromem b to a common functional domain in p47phox. *J Biol Chem* **271**, 17013-17020.

Dhalla NS, Temsah RM, & Netticadan T (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* **18**, 655-673.

Dibona GF & Kopp UC (1997). Neural control of renal function. *Physiol Rev* **77**: 75–197.

Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47-95.

Duffy SJ, Gokce N, Holbrook M, Huang A, Frei B, Keaney JF Jr, & Joseph AV (1999). Treatment of hypertension with ascorbic acid. *Lancet* **354**(9195), 2048-9.

Edmunds ME, Russel GI, & Bing RF (1991). Reversal of experimental renovascular hypertension. *Hypertension* **9**, 289-301.

Esler M, Lambert G & Jennings G (1989). Regional norepinephrine turnover in human hypertension. *Clin Exp Hypertens A* **11** Suppl 1, 75-89.

Esler M (2002). Differentiation in the effects of the angiotensin II receptor blocker class on autonomic function. *J Hypertens Suppl* **20**, S13-S19.

Faber JE & Brody MJ (1983). Neural contribution to renal hypertension following acute renal artery stenosis in conscious rats. *Hypertension* **5**, 155-164.

Feldberg W & Guertzenstein PG (1972). A vasodepressor effect of pentobarbitone sodium. *J Physiol* **224**, 83- 103.

Ferguson AV & Bains JS (1997). Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: implications for long term control of autonomic output. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**, 96–101.

Fink GD (1997). Long term sympatho-excitatory effect of angiotensin II: mechanism of spontaneous and renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**, 91-95.

Fontes MAP, Pinge MCM, Naves V, Campagnole-Santos MJ, Lopes OU, Khosla MC, & Santos RAS (1997). Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. *Brain Res* **750**, 305–310.

Fontes MA, Baltatu O, Caligiore SM, Campagnole-Santos MJ, Ganten D, Bader M, & Santos RA (2000). Angiotensin peptides acting at rostral ventrolateral medulla contribute to hypertension of TGR(mREN2)27 rats. *Physiol Genomics* **2**, 137–142.

Furchgott RF & Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**(5789), 373-376.

Galli SM & Phillips MI (2001). Angiotensin II AT(1A) receptor antisense lowers blood pressure in acute 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension* **38**, 674–678.

Gao L, Wang W, Li Yu-L, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, & Zucker IH (2005). Sympathoexcitation by central Ang II: Roles for AT-1 receptor upregulation and NADP(H) oxidase in RVLM. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H2271-H2279.



Gokce N, Keaney JF Jr, Frei B, Holbrook M, Olesiak M, Zachariah BJ, Leeuwenburgh C, Heinecke JW, & Vita JA (1999). Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* **99**(25), 3234-40.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, & Summerville WW (1934). Studies on experimental hypertension. 1. The production of persistent elevation systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* **59**:347-378.

Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A & Mancia G (1998). Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension* **31**, 68-72.

Grassi G (2004). Counteracting the sympathetic nervous system in essential hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **13**, 513-519.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, & Alexander RW (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **74**, 1141-1148.

Griendling KK, Sorescu D, & Ushio-Fukai M (2000). NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* **86**, 494-501.

Guertzenstein PG (1973). Blood pressure effects obtained by drugs applied to the ventral surface of the brain stem. *J Physiol* **229**, 395-408.

Guertzenstein PG & Silver A (1974). Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J Physiol* **242**, 489-503.

Guo GB & Abboud FM (1984). Angiotensin II attenuates baroreflex control of heart rate and sympathetic activity. *Am J Physiol* **246**, H80–H89.

Guyenet PG (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* **7**, 335-346.

Guron GS, Grimberg ES, Basu S, & Herlitz H (2006). Acute effects of the superoxide dismutase mimetic tempol on split kidney function in two-kidney one clip hypertensive rats. *J Hypertension* **24**(2), 387-94.

Hampel V & Herget J (2000). Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* **80**, 1337-1372.

Hart MC (1999). Nitric oxide in adult lung disease. *Chest* **115**, 1407-17.

Head GA & Burke SL (2004). Sympathetic responses to stress and rilmenidine in 2K1C rabbits. Evidence of enhanced nonvascular effector mechanism. *Hypertension* **43**, 636–642.

Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, MacHarzina R, Bräsen JH, Meinertz T, & Münzel T (1999). Increased NAD(P)H oxidase mediated superoxide production in renovascular hypertension evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* **55**, 52-260.

Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, & Chayama K (2002). Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med*. **346** (25), 1954-1962.

Hirooka Y, Polson JW, & Dampney RA (1996). Pressor and sympathoexcitatory effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla. *J Hypertens* **14**, 1317–1324.

Horiuchi J, Killinger S, & Dampney RA (2004). Contribution to sympathetic vasomotor tone of tonic glutamatergic inputs to neurons in the RVLM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**(6), R1335-43.

Huang J, Agus DB, Winfree CJ, Kiss S, Mack WJ, McTaggart RA, Choudhri TF, Kim LJ, Mocco J, Pinsky DJ, Fox WD, Israel RJ, Boyd TA, Golde DW, & Connolly ES (2001). Dehydroascorbic acid, a blood-brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 11720–11724.

Huie RE & Padmaja S (1993). The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* **18**(4), 195-9.

Huikuri HV, Ylitalo A, Pikkujämsä SM, Ikäheimo MJ, Airaksinen KEJ, Rantala AO, Lilja M & Kesäniemi YA (1996). Heart rate variability in systemic hypertension. *The Am J Cardiol* **77**, 1073-1077.

Infanger DW, Sharma RV, & Davisson RL (2006). NADPH Oxidases of the Brain: Distribution, Regulation, and Function. *Antioxi Redox Signal* **8**(9-10), 1583-1596.

Irigoyen MC, Moreira RD, Moreira ED, & Krieger EM (1991). High-renin renal hypertension depresses the baroreflex control of heart rate and sympathetic activity. In: Kunos G, Ciriello J, eds. *Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation*. Boston: Birkhäuser: 254 – 264.

Ito S, Komatsu K, Tsukamoto K, & Sved AF (2000). Excitatory amino acids in the rostral ventrolateral medulla support blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **35**, 413-417.

Ito S, Komatsu K, Tsukamoto K, & Sved AF (2001). Tonic excitatory input to the rostral ventrolateral medulla in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* **37**, 687-691.

Ito S, Komatsu K, Tsukamoto K, Kanmatsuse K, & Sved AF (2002). Ventrolateral medulla AT1 receptors support blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension* **40**(4), 552-9.

Ito S, Hiratsuka M, Komatsu K, Tsukamoto K, Kanmatsuse K, & Sved AF (2003). Ventrolateral medulla AT1 receptors support arterial pressure in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* **41**(3 Pt 2), 744-50.

Iwasaki K-I, Zhang R, Zuckerman JH, Pawelczyk JA, & Levine BD (2000). Effect of head-down-tilt bed rest and hypovolemia on dynamic regulation of heart rate and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R2189-2199.

Jackson TS, Xu A, Vuta JA, & Keane JF Jr (1998). Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ Res* **83**(9), 916-922.

Johansson M, Elam M, Rundqvist B, Eisenhofer G, Herlitz H, Lambert G, & Friberg P (1999). Increased sympathetic nerve activity in renovascular hypertension. *Circulation* **99**, 2537-2542.

Kagiyama S, Tsuchihashi T, Abe I, & Fujishima M (1997). Cardiovascular effects nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of rats. *Brain Res* **757**, 155–158.

Kagiyama S, Tsuchihashi T, Abe I, & Fujishima M (1998). Enhanced depressor response to nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **31**, 1030 –1034.

Kagiyama S, Varela A, Phillips MI, & Galli SM (2001). Antisense inhibition of brain renin-angiotensin system decreased blood pressure in chronic 2-kidney, 1 clip hypertensive rats. *Circ Res* **37**, 371–375.

Kannan H, Hayashida Y, & Yamashita H (1989). Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am J Physiol* **256**, R1325-R1330.

Katholi RE, Winternitz SR, & Oparil S (1982). Decrease in peripheral sympathetic nervous system activity following renal denervation or unclipping in the one-kidney one clip Goldblatt hypertensive rat. *Clin Invest* **69**, 55-62.

Katona PG, Poitras JW, Barnett GO, & Terry BS (1970). Cardiac vagal efferent activity and heart period in the carotid sinus reflex. *Am J Physiol* **218**, 1030-1037.

Kerr S, Brosnan MJ, Mcintyre M, Reid JL, Dominiczak AF & Hamilton CA (1999). Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension* **33**(6),1353-8.

Kimura Y, Hirooka Y, Sagara Y, Ito K, Kishi T, Shimokawa H, Takeshita A, & Sunagawa K (2005). Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress. *Circ Res* **96**(2), 252-60.

Kimura Y, Hirooka Y, Kishi T, Ito K, Sagara Y, & Sunagawa K (2009). Role of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla in blood pressure regulation in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* **31**(3), 281-6.

Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H, & Takeshita A (2004). Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* **109**, 2357–2362.

Korner PI (1975). Central and peripheral resetting of the baroreceptor system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2**, 171–178.

Krukoff TL (1999). Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Rev* **30**, 52– 65.

Ku YH, Jia YF, & Chang YZ (1999). Mechanisms underlying pressor response of subfornical organ to angiotensin II. *Peptides* **20**, 171–176.

Kubo T, Fukumori R, Kobayashi M, & Yamaguchi H (1996). Enhanced cholinergic activity in the medulla oblongata of DOCA-salt hypertensive and renal hypertension rats. *Hypertens Res* **19**: 213-219.

Laplante MA, Wu R, El Midaoui A, & de Champlain J (2003). NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p 42/44 ERK-MAPK pathway activation in rats vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* **21**, 927-936.

Lassègue B & Clempus RE (2003). Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**(2), R277-97.

Lawrence AJ (1997). Nitric oxide as a modulator of medullary pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**, 760 –763.

Lazartigues E, Lawrence AJ, Lamb FS, & Davisson RL (2004). Renovascular hypertension in mice with brain-selective overexpression of AT1a receptors is buffered by increased nitric oxide production in the periphery. *Circ Res* **95**(5), 523-31.

Lee K, Jackson DN, Cordero DL, Nishiyasu T, Peters JK, & Mack GW (2003). Change in spontaneous baroreflex control of pulse interval during heat stress in humans. *J Appl Physiol* **95**, 1789-1798.

Lerman LO, Nath KA, Rodriguez-Porcel M, Krier JD, Schwartz RS, Napoli C, & Romero JC (2001). Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension* **37**(2), 541-546.

Lerman LO, Chade AR, Sica V, & Napoli C (2005). Animals models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* **146**, 160-173.

Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney Jr JF, & Vita JA (1996). Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* **93**(6), 1107-13.



Levy MN (1971). Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. *Circ Res* **29**(5), 437-45.

Li JM & Shah AM (2003). Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem* **278**(14), 12094-100.

Li YW & Guyenet PG (1995). Neuronal excitation by angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla of the rat in vitro. *Am J Physiol* **268**, R272–R277.

Li YW & Guyenet PG (1996). Angiotensin II decreases a resting K<sup>-</sup> conductance in rat bulbospinal neurons of the C1 area. *Circ Res* **78**, 274–282.

Li Z, Mao HZ, Abboud FM, & Chapleau MW (1996). Oxygen-derived free radicals contribute to baroreceptor dysfunction in atherosclerotic rabbits. *Circ Res* **79**, 802–811.

Liu D, Gao L, Roy SK, Cornish KG, & Zucker IH (2006). Neuronal angiotensin II type 1 receptor upregulation in heart failure: activation of activator protein 1 and Jun N-terminal kinase. *Circ Res* **99**(9), 1004-11.

Livak KJ, & Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  method. *Methods* **25**, 402–408.

Loewy AD, & Spyer KM (1990). Central regulation of autonomic functions. New York, Oxford, 390p.

Lupu AN, Maxwell MH, Kaufman JJ, & White FN (1972). Experimental unilateral renal artery constriction in the dog. *Cir Res* **30**, 567.

Machado BH, Krieger EM, & Salgado HC (1987). Changes of the intrinsic heart rate during the onset of renal hypertension. *J Hypertens* **5**, 755–759.

Machado BH & Brody MJ (1989). Contribution of neurogenic mechanisms to control of intrinsic heart rate. *Am J Physiol* **256**(1 Pt 2), R231–R235.

Machado BH (2001). Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Ann N Y Acad Sci* **940**, 179-196.

Madsen LB, Moller DS, Rasmussen JK, Nyvad O & Pedersen EB (2005). Abnormal heart rate variability in essential hypertension. *Am J Hypertens* **18**, A184-A184.

Malliani A, Pagani M, Furlan R, Guzzetti S, Lucini D, Montano N, Cerutti S, & Mela GS (1997). Individual recognition by heart rate variability of two different autonomic profiles related to posture. *Circulation* **96**, 4143– 4145.

Malliani A (2006). Cardiovascular variability is/is not an index of autonomic control of circulation. *J Appl Physiol* **101**(2), 684.

Mancia G, Grassi G, Giannattasio C & Seravalle G (1999). Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. *Hypertension* **34**, 724-728.

Martin DS, Segura T, & Haywood JR (1991). Cardiovascular responses to bicuculline in the paraventricular nucleus of the rat. *Hypertension* **18**, 48-55.

Martinez-Maldonado M (1991). Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension* **17**(5), 707-19.

Martins-Pinge MC, Baraldi-Passy I, & Lopes OU (1997). Excitatory effects of nitric oxide within the rostral ventrolateral medulla of freely moving rats. *Hypertension* **30**, 704 –707.

Martins-Pinge MC, Garcia MR, Zoccal DB, Crestani CC, & Pinge-Filho P (2007). Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats. *Auton Neurosci* **131**(1-2), 65-9.

McElroy ND & Zimmerman BG (1989). Characterization of intrarenal arterial adrenergic receptors in renovascular hypertension. *Hypertension* **13**, 851-858.

McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, Mcallen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FAO, & Chai SY (2003). The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 901-918.

Melaragno MG, & Fink GD (1996). Slow pressor effect of angiotensin II in normotensive rats with renal artery stenosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **23**, 140-144.

Menani JV, Machado BH, Krieger EM, & Salgado HC (1988). Tachycardia during the onset of one-kidney, one-clip renal hypertension: role of the renin–angiotensin system and AV3V tissue. *Brain Res* **19**, 446 (2), 295–302.

Meng S, Cason GW, Gannon AW, Racusen LC, & Manning RD Jr (2003). Oxidative stress in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension* **41**(6), 1346-52.

Michelini LC & Bonagamba LG (1988). Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. *Hypertension* **11**(2 Pt 2), 175-9.

Michelini LC, Oliveira M, & Santos M (1992). Baroreceptor reflex control of heart rate during development of coarctation hypertension. *Hypertension* **19**(suppl II), II-159 –II-163.

Mitchell KD & Navar LG (1995). Intrarenal actions of Angiotensin II in the pathogenesis of experimental hypertension. In: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, edited by J.H. Laragh and B. M. Brenner. New York: Raven, 1437- 1450.

Miyajima E, Yamada Y, Yoshida Y, Matsukawa T, Shionoiri H, Tochikubo O, Ishii M (1991). Muscle sympathetic nerve activity in renovascular hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension* **17**, 1057–1062.

Mizutani T & Layon AJ (1996). Clinical applications of nitric oxide. *Chest* **110**, 506-624.

Modlinger P, Chabrashvili T, Gill PS, Mendonca M, Harrison DG, Griendling KK, Li M, Raggio J, Wellstein A, Chen Y, Welch WJ, & Wilcox CS (2006). RNA silencing in vivo reveals role of p22phox in rat angiotensin slow pressor response. *Hypertension* **47**, 238 –244.

Monahan KD (2007). Effect of aging on baroreflex function in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**(1), R3-R12. Review.

Moncada S & Higgs A (1993). Mechanisms of disease: the L-argininenitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**, 2002-2012.

Montano N, Lombardi F, Gnecci-Ruscione T, Contini M, Finocchiaro ML, Baselli G, Porta A, Cerutti S, & Malliani A (1992). Spectral analysis of sympathetic discharge, R-R interval, and systolic arterial pressure in decerebrate cats. *J Auton Nerv Syst* **40**, 21–32.

Montano N, Cogliati C, Porta A, Pagani M, Malliani A, Narkyewicz C, Abboud FM, Birkett C, & Somers VK (1998). Central vagotonic effects of atropine modulate spectral oscillations of sympathetic nerve activity. *Circulation* **98**, 1394–1399.

Montano N, Cogliati C, Dias da Silva VJ, Gneccchi-Ruscione T, & Malliani A (2001). Sympathetic rhythms and cardiovascular oscillations. *Auton Neurosci* **90**(1-2), 29-34.

Moreira ED, Oliveira M, & Krieger EM (1988). Impaired baroreflex control of heart rate in high-renin renal hypertension. *J Hypertens* **6**, 619–625.

Moreira ED, Ida F, Oliveira VLL, & Krieger EM (1992). Early depression of baroreceptor sensitivity during onset of hypertension. *Hypertension* **19**(suppl II), II-198 –II-201.

Morimoto S, Sasaki S, Miki S, Kawa T, Nakamura K, Itoh H, Nakata T, Takeda K, Nakagawa M, & Fushiki S (2000). Nitric oxide is an excitatory modulator in the rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Hypertens* **13**, 1125–1134.

Muratani H, Averill DB, & Ferrario CM (1991). Effect of angiotensin II in ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* **260**, R977–R984.

Mussalo H, Vanninen E, Aheimo RIK, & Laitinen T (2003). Short-term blood pressure variability in renovascular hypertension and in severe and mild essential hypertension. *Clin Sci* **105**, 609–614.

Nafz B, Seelinger E, Persson PB (2001). Nitric oxide and the role of blood pressure variability to the kidney. *Acta Physiol Scand* **173**, 45–49.

Nakada T, Kubota Y, Suzuki H, Sasagawa I, Watanabe M, & Ishigooka M (1996). Suppression of sympathetic nervous system attenuates the development of two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension. *J Urol* **156**, 1480-1484.

Navar LG, Zou L, Thun AV, Wang CT, Iming JD, & Mitchell KD (1998). Unraveling the mystery of Goldblatt hypertension. *News Physiol Sci* **13**, 170-176.

Nishikawa Y, Tatsumi K, Matsura T, Yamamoto A, Nadamoto T, & Urabe K (2003). Effects of vitamin C on high blood pressure induced by salt in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **49**(5), 301-9.

Nishimura M, Milsted A, Block CH, Brosnihan KB, & Ferrario CM (1992). Tissue renin-angiotensin systems in renal hypertension. *Hypertension* **20**, 158–167.

Nobre F, Silva CA, Coelho EB, Salgado HC, & Fazan R (2006). Antihypertensive agents have different ability to modulate arterial pressure and heart rate variability in 2K1C rats. *Am. J. Hypertens* **19**(10), 1079–1083.

Offer T, Russo A, & Samuni A (2000). The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics. *FASEB J* **14**, 1215–1223.

Ohkawa H, Ohishi N, & Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**(2), 351-8.

Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, Abreu NP, Boim MA, Martins PJ, D'Almeida V, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR (2008). Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. *Am J Hypertens* **21**(1), 98-104.

Oosting J, Struijker-Boudier HA, & Janssen BJ (1997). Validation of a continuous baroreceptor reflex sensitivity index calculated from spontaneous fluctuations of blood pressure and pulse interval in rats *J Hypertens* **15**(4), 391-9.

Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, Sandrone G, Malfatto G, Dell'Orto S, Piccaluga E, Turiel M, Baselli G, Cerurri S, & Malliani A (1986). Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res* **59**, 178-193.

Parker P, Celler BG, Potter EK, & McCloskey DI (1984). Vagal stimulation and cardiac slowing. *J Auton Nerv Syst* **11**, 226-231.

Patel KP, Li Y-F, & Hirooka Y (2001). Role of nitric oxide in central sympathetic outflow. *Exp Biol Med* **226**, 814–824.

Paxinos G, & Watson C (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edn. New York, NY: Academic Press Inc.

Peach M (1977). Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. *Physiological Reviews* **57**, 313-370.



Persson PB (1996). Modulation of cardiovascular control of mechanisms and their interaction. *Physiol Rev* **76**, 193–244.

Peterson J, Burmeister MA, Tian X, Stupinski JA, Sharma VA, & Davisson RL (2007). Both Nox2- and Nox4-containing NAD(P)H oxidases are required for the full vasopressor effects of angiotensin-II (Ang-II) in the central nervous system. *FASEB J* **21**, 752.1.

Phillips MI & Sumners C (1998). Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regul Pept* **78**, 1–11.

Pilowsky PM & Goodchild AK (2002). Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on. *J Hypertens* **20**, 1675-1688.

Ploth DW (1983). Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney one-clip renal vascular hypertension. *Am J Physiol* **245**, 131-141.

Pollock DA (2005). Endothelin, angiotensin, and oxidative stress in hypertension. *Hypertension* **45**, 477-480.

Ponchon P & Elghozi JL (1996). Contribution of the renin–angiotensin and kallikrein–kinin systems to short-term variability of blood pressure in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* **297**, 61–70.

Potts PD, Hirooka Y, & Dampney RA (1999). Activation of brain neurons by circulating angiotensin II: direct effects and baroreceptor-mediated secondary effects. *Neuroscience* **90**, 581–594.

Prast H & Philippu A (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* **64**, 51-68.

Prewitt RL, Dobrian AD, & Schriver SD (2001). Role of Angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. *Hypertension* **38**, 361-366.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK , & Harrison DG (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increased vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* **97**(8), 1916-1923.

Rice M (2000). Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* **23**, 209-216.

Sakai S & Dampney RAL (1990). Tonic cardiovascular effects of angiotensina II in the ventrolateral medulla. *Hypertension* **15**, 274-283.

Sakima A, Yamazato M, Sesoko S, Muratani H, & Fukiyama K (2000). Cardiovascular and sympathetic effects of L-glutamate and glycine injected into the rostral ventrolateral medulla of conscious rats. *Hypertens Res* **23**, 633-641.

Salgado HC & Krieger EM (1973). Reversibility of baroreceptor adaptation in chronic hypertension. *Clin Sci Mol Med Suppl* **45**(1), 123s-6.

Samuni A, Mitchell JB, DeGraff W, Krishna CM, Samuni U, & Russo A (1991). Nitroxide SOD-mimics: modes of action. *Free Radic Res Commun* 12–13 Pt **1**, 187–194.

Santos CM, Pontieri V, Leomil Neto M, & Michelini LC (1995). Losartan improves baroreflex control of heart rate of coarcted hypertensive rats. *Am J Physiol* **269**, H812–H818.

Santos RAS & Sampaio WO (2002). Sistema renina-angiotensina-Aspectos fisiológicos. *Hipertensão* **5**(2):, 47-51.

Sasaki S & Dampney RAL (1990). Tonic cardiovascular effects of angiotensin II in the ventrolateral medulla. *Hypertension* **15**, 274–283.

Schmieder RE (2005). Mechanisms for the clinical benefits of angiotensin II receptor blockers. *Am J Hypertens* **18**, 720-730.

Schnackenberg CG, Welch WJ, & Wilcox CS (1998). Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* **32**, 59–64.

Schnackenberg CG & Wilcox CS (1999). Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f2 $\alpha$ . *Hypertension* **33**(1 Pt 2), 424–428.

Sherman DL, Keaney JF Jr, Biegelsen ES, Duffy SJ, Coffman JD, & Vita JA (2000). Pharmacological concentrations of ascorbic acid are required for the beneficial effect on endothelial vasomotor function in hypertension. *Hypertension* **35**(4), 936-41.

Silva AQ, Santos RA, & Fontes MA (2005). Blockade of endogenous angiotensin (1-7) in the hypothalamic paraventricular nucleus reduces renal sympathetic tone. *Hypertension* **46** (2), 341-348.

Silva LCS, Fontes MAP, Campagnole-Santos MJ, Khosla MC, Campos RR, Guertzenstein PG, & Santos RAS (1993). Cardiovascular effects produced by micro-injection of angiotensin-(1–7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. *Brain Res* **613**, 321–325.

Souza HC, Martins-Pinge MC, Dias da Silva VJ, Borghi-Silva A, Gastaldi AC, Blanco JH, & Tezini GC (2008). Heart rate and arterial pressure variability in the experimental renovascular hypertension model in rats. *Auton Neurosci* **139**(1-2), 38-45.

Stein RD, Weaver LC, & Yardley CP (1989). Ventrolateral medullary neurones: effects on magnitude and rhythm of discharge of mesenteric and renal nerves in cats. *J Physiol* **408**, 571-586.

Stocker SD, Keith KJ, & Toney GM (2004). Acute inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus decreases renal sympathetic nerve activity and arterial blood pressure in water-deprived rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R719-R25.

Strack AM, Sawyer WB, Hughes JB, Platt KB, & Loewy AD (1989). A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Res* **491**, 156-162.

Sved AF & Gordon FJ (1994). Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. *NIPS* **9**, 243-5.

Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A & Salvetti A (1998). Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilatation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* **97**(22), 2222-2229.

Tagawa T & Dampney RAL (1999). AT1 receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. *Hypertension* **34**, 1301-1307.

Ting HH, Timimi FK, Haley EA, Roddy MA, Ganz P, & Creager MA (1997). Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation* **95**(12), 2617-22.

Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, & Schiffrin EL (2002). Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* **90**, 1205–1213.

Tseng CJ, Liu HY, Lin HC, Ger LP, Tung CS, & Yen MH (1996). Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. *Hypertension* **27**, 36–42.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2006). *Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão* **9**(4), 121-157.

Virtanen R, Jula A, Kuusela T, Helenius H & Voipio-Pulkki LM (2003). Reduced heart rate variability in hypertension: associations with lifestyle factors and plasma renin activity. *J Hum Hypertens* **17**, 171-179.

Waki H, Kasparov S, Wong LF, Murphy D, Shimizu T, & Paton JFR (2003). Chronic inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity in nucleus tractus solitarii enhances baroreceptor reflex in conscious rats. *J Physiol* **546**, 233–242.

Waki H, Katahira K, Polson JW, Kasparov S, Murphy D, & Paton JFR (2006). Automation of analysis of cardiovascular autonomic function from chronic measurements of arterial pressure in conscious rats. *Exp Physiol* **91**, 201–213.

Wang DS, Xie HH, Shen FM, Cai GJ, & Su DF (2005). Blood pressure variability, cardiac baroreflex sensitivity and organ damage in experimentally hypertensive rats.

*Clin Exp Pharmacol Physiol* **32**(7), 545–552.

Welch WJ, Mendonça M, Aslam S, & Wilcox CS (2003). Roles of oxidative stress and AT-1 receptors in renal hemodynamics and oxygenation in the post clipped 2K-1C kidney. *Hypertension* **41**(part 2), 692-696.

Wible JHJR, Dimicco JA & Luft Fc (1989). Hypothalamic GABA and sympathetic regulation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **14**, 623-628.

Wilkinson IB, Megson IL, Maccallum H, Sogo N, Cockcroft JR, & Webb DJ (1999). Oral vitamin C reduces arterial stiffness and platelet aggregation in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* **34**(5), 690-3.

World Health Organization & International Society of Hypertension (2003). 2003 World Health Organization (WHO) / International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* **21**, 1983-1992.

Wright JW & Harding JW (1994). Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev* **18**, 21-53.

Wu R, Millette E, Wu L, & de Champlain J (2001). Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* **19**, 741–748.

Xu H, Fink GD, Chen A, Watts S, & Galligan JJ (2001). Nitric oxide-independent

effects of tempol on sympathetic nerve activity and blood pressure in normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **81**(2), H975-80.

Xu H, Fink GD, & Galligan JJ (2002). Nitric oxide-independent effects of tempol on sympathetic nerve activity and blood pressure in DOCA-salt rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H885-H892.

Xu H, Fink GD, & Galligan JJ (2004). Tempol lowers blood pressure and sympathetic nerve activity but not vascular O<sub>2</sub>- in DOCA-salt rats. *Hypertension* **43**, 329–334.

Yang Z & Coote JH (1998). Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus on cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat. *J Physiol* **513**, 521-530.

Yang B, Larson DF, & Watson RR (2004). Modulation of iNOS activity in aged-related cardiac dysfunction. *Life Sci* **75**, 655– 667.

Ye S, Mozayeni P, Gamburd M, Zhong H, & Campese VM (2000). Interleukin-1 $\beta$  and neurogenic control of blood pressure in normal rats and rats with chronic renal failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H2786-H2796.

Ye S, Zhong H, Yanamadala S, & Campese VM (2006). Oxidative stress mediates the stimulation of sympathetic nerve activity in the phenol renal injury model of hypertension. *Hypertension* **48**(2), 309-15.



Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Etayo JC, & Diez J (2000). Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **35**, 1055–1061.

Zanzinger J, Czachurski J, & Seller H (1995). Inhibition of basal and reflex mediated sympathetic activity in the RVLM by nitric oxide. *Am J Physiol* **268**, R958–R962.

Zanzinger J (1999). Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular function. *Cardiovasc Res* **43**, 639–649.

Zanzinger J & Czachurski J (2000). Chronic oxidative stress in the RVLM modulates sympathetic control of circulation in pigs. *Eur J Physiol* **439**, 489-494.

Zhang K, Mayhan WG, & Patel KP (1997). Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **273**, R864–R872.

Zhu M, Gelband Ch, Posner P, & Sumners C (1999). Angiotensin II decreases neuronal delayed rectifier potassium current: role of calcium / calmodulin – dependent protein kinase II. *Neurophysiology* **82**, 1560-1568.

Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, & Davisson RL (2002). Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* **91**, 1038–1045.

Zimmerman MC, Lazartigues E, Sharma RV, & Davisson RL (2004a). Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res* **95**, 210–216.

Zimmerman MC, Dunlay RP, Lazartigues E, Zhang Y, Sharama RV, Engelhardt JF, & Davisson RL (2004b). Requirement for Rac 1-dependent NADPH oxidase in the cardiovascular and dipsogenic actions of angiotensin II in the brain. *Circ Res* **95**, 532–539.

Zimmerman MC, Sharma RV, & Davisson RL (2005). Superoxide mediates angiotensin II-induced influx of extracellular calcium in neural cells. *Hypertension* **45**(4), 717-23.

Zwacka RM, Dudus L, Epperly MW, Greenberger JS, & Engelhardt JF (1998). Redox gene therapy protects human IB-3 lung epithelial cells against ionizing radiation-induced apoptosis. *Hum Gene Ther* **9**, 1381–1386.

## ANEXOS

### **1. Artigos publicados**

1.1. Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, Abreu NP, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR (2008). Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. *Am J Hypertens* **21**(1), 98-104.

1.2. Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Carillo BA, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR (2009). Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. **22**(5), 484-92.

1.3. Campos RR, Carillo BA, Oliveira-Sales EB, Silva AM, Silva NF, Bergamaschi CT (2008). Brainstem mechanisms regulating the sympathetic vasomotor tone. *Braz J Med Biol Res*. **41**(7), 557-62.

### **2. Artigos submetidos para publicação**

2.1. Oliveira-Sales EB, Colombari DSA, Davisson RL, Kasparov S, Campos RR, Paton JFR (2009). Chronic superoxide signaling in the rostral ventrolateral medulla is essential for Goldblatt hypertension. *Circulation Research*

2.2. Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR (2009). Over expression of AT-1 receptor and iNOS in the RVLM is essential to sympathetic hyperactivity and hypertension in the 2K-1C Wistar rats model.

*Hypertension*

### **3. Artigos sendo preparados para publicação**

3.1. Oliveira-Sales EB, Toward MT, Campos RR, Paton JFR (2009). Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in conscious rats. *Neurosci Methods*.

3.2. Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR (2009). Effects of vitamin C chronic treatment on blood pressure, sympathetic activity and gene expression into RVLM and PVN in renovascular hypertension.

*Autonomic neuroscience*

### **4. Capítulo de livro publicado**

4.1. Campos RR, Oliveira-Sales EB, Bergamaschi CT. Regulação Neuro-humoral do Sistema Cardiovascular. In: Serrano Jr CV Jr, Timerman A, Stefanini E, ed. Tratado de Cardiologia SOCESP. 2ª ed. São Paulo, SP: Editora Manole. 2009:113-124.