

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

“Diferentes espécies reativas e neurotransmissores modulam os efeitos hipotensores da Ang II e Ang-(1-7) na CVLM em ratos com hipertensão renovascular 2R1C”

Graziele Galdino de Sousa

**Ouro Preto - MG
2014**

Graziele Galdino de Sousa

**Diferentes espécies reativas e neurotransmissores
modulam os efeitos hipotensores da Ang II e Ang-(1-7) na
CVLM em ratos com hipertensão renovascular 2R1C**

Orientadora: Andréia Carvalho Alzamora

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de concentração Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

S725d

Sousa, Grazielle Galdino de .

Diferentes espécies reativas e neurotransmissores modulam os efeitos hipotensores da Ang II e Ang-(1-7) na CVLM em ratos com hipertensão renovascular 2R1C [manuscrito] / Grazielle Galdino de Sousa. - 2014. 78f.: il.: color; grafs.

Orientador: Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Reações Química - Reatividade (Química). 2. Angiotensina - Ang II. 3. Angiotensina - Ang-(1-7). 4. Caudal Ventrolateral Medulla (CVLM). 5. Hipertensão Renovascular - 2R1C. I. Carvalho Alzamora, Andréia. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 577.12

**Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Diferentes espécies reativas e neurotransmissores modulam os efeitos hipotensores da Ang-(1-7) e Ang II na CVLM de ratos com hipertensão renovascular 2R1C”

Aos dez dias do mês de abril de 2014, às 9:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Graziele Galdino de Sousa**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram porAPROVAR..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:



Prof.ª Dr.ª Andréia Carvalho Alzamora
Presidente (UFOP)



Prof.ª Dr.ª Andrea Siqueira Haibara
Examinadora (UFMG)

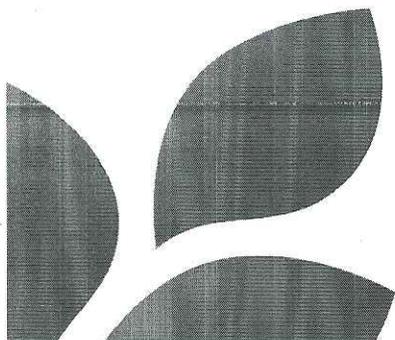


Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 10/04/2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol



Trabalho desenvolvido no **Laboratório de Hipertensão** da Universidade Federal de Ouro Preto com auxílio financeiro da CAPES, REDE TOXIFAR-INCT-FAPEMIG-CNPQ, PROPP-NUPEB-UFOP.

“Lutar sempre, vencer nem sempre, desistir jamais!”
Prof. Dr. Elísio Alberto Evangelista – ICEB – UFOP

*Dedico este trabalho à minha família e ao meu
namorado Uberdan Castro*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

A Deus e a Nossa Senhora das Graças por me ampararem nos momentos difíceis, por me darem força para superar as dificuldades, por mostrarem o caminho nas horas incertas e inseguras e por colocarem pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria chegado até aqui!

*A minha orientadora, **Andréia Alzamora**, por ter me dado à oportunidade de trabalhar em sua equipe desde o meu segundo período de graduação, há exatos 6 anos atrás, permitindo assim a execução do presente estudo. Agradeço por confiar no meu trabalho e por me incentivar a sempre ir mais longe. Agradeço por ter contribuído muito para a minha formação acadêmica e pessoal através de seus ensinamentos e conselhos. Obrigada por realizar o meu sonho de ser pesquisadora. Admiro muito a sua ética, sinceridade e profissionalismo. Muito obrigada!*

*Ao Prof. Dr. **Robson Santos** e à Prof^ª Dr^ª. **Maria José Campagnole-Santos** do Laboratório de Hipertensão (LH) da Universidade Federal de Minas Gerais pela grande colaboração no desenvolvimento desse trabalho, pelas explicações, considerações e sugestões feitas e por disponibilizarem o uso do LH para enriquecer e desenvolver parte do presente estudo. À **aluna Gisele Etelvino** do LH pela paciência, dedicação, cuidado e enorme ajuda nos experimentos com microscopia confocal.*

*À Prof^ª. Dr^ª. **Raquel do Pilar Machado** pela simpatia e exemplo de vida que é para mim.*

*Ao Prof. Dr. **Mauro César Isoldi** pelos conselhos, convivência e momentos descontraídos.*

*À Prof^ª. Dr^ª. **Lisandra Brandino** e ao Prof. Dr. **Leonardo Cardoso** pela convivência e ajuda em situações cotidianas.*

*Ao meu pai **Antonio**, pelo exemplo que é para mim, meu porto seguro, por tudo que me ensinou, pelos valores, por todo o sacrifício que teve para me criar e me educar, por me mostrar o caminho certo a seguir, pelo apoio e suporte incondicional. Se hoje estou aqui, com mais essa conquista, você é o grande responsável. Obrigada pai! À **minha mãe de coração Luciana**, pela amizade, compreensão, dedicação, cuidado e carinho*

incondicional. Aos meus irmãos Iasmym, Iury e Marcos Vinicius pelo imenso amor e por tornarem a minha vida mais alegre e feliz. Aos meus familiares pela força e torcida, em especial, a tia Cláudia pela enorme ajuda no início dos meus estudos.

Ao meu namorado, Uberdan, não tenho palavras para agradecer tudo que já fez e faz por mim. Muito obrigada! Obrigada pela co-orientação, pela dedicação e paciência que teve ao me ensinar as técnicas cirúrgicas e procedimentos utilizados no presente estudo. Sem você eu não teria conseguido! Agradeço muito pelo apoio e força incondicional, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida, por me incentivar e me ajudar a conquistar os meus sonhos e por nunca me deixar desistir nos momentos difíceis. Aos seus pais, Marly e Clodoveu, pelas orações, força e carinho.

Aos meus amigos, Caio, Carol e Leandro pela irmandade, carinho e momentos divertidos.

Aos meus colegas do Laboratório de Hipertensão, Claudiane, Luiz, Aline, Raphaela, Walesca, Gerônimo, Thalisson, Marcela, Renato, Paula, Milla, Jaqueline, Rosália pelo companheirismo e ajuda em situações cotidianas. Aos que não estão mais presentes no laboratório Carol, Everton, Rodrigo, Raquel, Rosana e Thelma agradeço pela eterna amizade.

A ex-técnica do Laboratório de Hipertensão, Andréa Barbosa, agora aluna de mestrado, pela pessoa incrível que é, pela amizade, pelo tanto que me ajudou, por resolver todos os problemas do laboratório e por mantê-lo sempre organizado dando condições para a realização do presente estudo.

Aos financiadores deste trabalho: REDE TOXIFAR-INCT-FAPEMIG-CNPQ, CAPES, PROPP-NUPEB-UFOP.

A Universidade Federal de Ouro Preto, por ter me dado à oportunidade de executar este trabalho.

Finalmente, agradeço aos animais experimentais que com inocência sacrificam suas vidas pela ciência e pelo bem de nossa existência.

RESUMO

A hipertensão está associada com uma disfunção do sistema renina-angiotensina (SRA) e aumento do estresse oxidativo no bulbo ventrolateral caudal (CVLM). Estudos mostraram que a microinjeção de angiotensina (Ang) Ang II e Ang-(1-7) na CVLM induzem efeitos hipotensores similares em ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C. Em adição, tem sido descrito que o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) participa dos efeitos da Ang II, enquanto que o óxido nítrico (NO) modula as ações da Ang-(1-7) em regiões periféricas e centrais e que os neurotransmissores aminoácidos participam dos efeitos das angiotensinas em áreas centrais. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar se diferentes espécies reativas (ER) como $O_2^{\cdot-}$ e NO e neurotransmissores como glutamato e GABA estariam envolvidos nos efeitos hipotensores induzidos pelas microinjeções de Ang II e Ang-(1-7) na CVLM em ratos 2R1C. Após 28 dias da cirurgia SHAM e 2R1C, ratos Fischer foram anestesiados (uretana, 1,2 g/kg, ip), posicionados em um aparelho estereotáxico para procedimento de microinjeção de drogas na CVLM e instrumentados para registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Ang II (40 pmol) ou Ang-(1-7) (40 pmol) foram microinjetadas na CVLM antes e 5, 15 e 30 minutos (min) após a microinjeção de L-NAME (inibidor não específico da óxido nítrico síntase, NOS, 10 nmol) ou vitamina C (VIT C, antioxidante ácido ascórbico, 10 nmol) ou bicuculina (BIC, antagonista do receptor GABAA, 10 pmol) ou ácido quinurênico (KYN, antagonista dos receptores ionotrópicos do glutamato, 5 nmol) em ratos SHAM e 2R1C. A microinjeção de Ang II e Ang-(1-7) na CVLM induziu efeito hipotensor similar em ratos SHAM e 2R1C. A microinjeção de L-NAME na CVLM produziu queda similar na PAM e FC em ratos SHAM e 2R1C. Enquanto, a microinjeção de VIT C na CVLM produziu queda na PAM e FC somente em ratos 2R1C. A microinjeção de BIC na CVLM produziu queda na PAM e FC em ratos SHAM e 2R1C. No entanto, o efeito hipotensor induzido pela microinjeção de BIC na CVLM foi maior nos animais 2R1C comparado aos animais SHAM. Já, a microinjeção de KYN na CVLM produziu aumento na PAM e FC em ratos SHAM e 2R1C. Em adição, a microinjeção de L-NAME na CVLM aumentou o efeito hipotensor da Ang-(1-7) por até 45 min em ratos SHAM e por apenas 5 min em ratos 2R1C e não alterou o efeito hipotensor da Ang II na CVLM em ratos SHAM e 2R1C. Ao contrário, a VIT C aboliu por até 15 min o efeito hipotensor da Ang II na CVLM em ratos SHAM e 2R1C e não alterou o efeito hipotensor da Ang-(1-7) na CVLM em ambos os grupos. Além disso, a BIC diminui o efeito hipotensor da Ang-(1-7) por até 30 min em ratos SHAM e por apenas 5 min em ratos 2R1C e não alterou o efeito hipotensor da Ang II na CVLM em ratos SHAM e 2R1C. Já, o KYN aumentou o efeito hipotensor da Ang II por até 15 min em ratos SHAM e 2R1C e não alterou o efeito hipotensor da Ang-(1-7) na CVLM em ambos os grupos. Nossos dados em conjunto mostram a participação do $O_2^{\cdot-}$ e do GABA na CVLM na hipertensão renovascular 2R1C. Além disso, os efeitos hipotensores similares induzidos pela Ang II e Ang-(1-7) na CVLM ocorrem através de mecanismos distintos, sendo que, o NO e o GABA participam predominantemente do efeito hipotensor da Ang-(1-7), enquanto o $O_2^{\cdot-}$ e o glutamato participam predominantemente do efeito hipotensor da Ang II na CVLM em ratos normotensos e hipertensos 2R1C. Esses dados mostram que diferentes vias e/ou mediadores intracelulares estão envolvidos nos efeitos induzidos pela Ang II e Ang-(1-7) na CVLM.

ABSTRACT

Hypertension is associated with a dysfunction of the renin-angiotensin system (RAS) and increased oxidative stress in the caudal ventrolateral medulla (CVLM). Studies showed that microinjection of angiotensin (Ang) Ang II and Ang-(1-7) in the CVLM induce hypotensive effects similar in SHAM normotensive and with 2K1C renovascular hypertension rats. In addition, it has been reported that superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) participates in the effects of Ang II, whereas nitric oxide (NO) modulates the actions of Ang-(1-7) in peripheral and central regions and that the amino acid neurotransmitters participate in the effects of angiotensins in the central areas. Thereby, the objective of the present study was to evaluate whether different reactive species (RS) as $O_2^{\cdot-}$ and NO and neurotransmitters as glutamate and GABA were involved in the hypotensives effects induced by microinjections of Ang II and Ang-(1-7) in the CVLM in 2K1C rats. 28 days after surgery 2K1C and SHAM, Fischer rats were anesthetized (urethane, 1.2 g/kg, ip), positioned in a stereotaxic apparatus for procedure of drugs microinjection in CVLM and instrumented to record mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). Ang II (40 pmol) or Ang-(1-7) (40 pmol) were microinjected in the CVLM before and 5, 15 and 30 minutes (min) after microinjection of L-NAME (non-specific inhibitor of nitric oxide synthase, NOS, 10 nmol) or vitamin C (VIT C, ascorbic acid antioxidant, 10 nmol) or bicuculline (BIC, GABAA receptor antagonist, 10 pmol) or kynurenic acid (KYN, ionotropic glutamatergic receptor antagonist, 5 nmol) in SHAM and 2K1C rats. CVLM microinjection of Ang II and Ang-(1-7) induced similar hypotensive effect in SHAM and 2K1C rats. CVLM microinjection of L-NAME produced similar fall in MAP and HR in SHAM and 2K1C rats, while CVLM microinjection of VIT C produced fall in MAP and HR only in 2K1C rats. CVLM microinjection of BIC produced fall in MAP and HR in SHAM and 2K1C rats. However, the hypotensive effect induced by microinjection of BIC in the CVLM was higher in 2K1C animals compared to SHAM animals. Already, the CVLM microinjection of KYN produced an increase in MAP and HR in SHAM and 2K1C rats. In addition, CVLM microinjection of L-NAME increased the hypotensive effect of Ang-(1-7) up to 45 min in SHAM rats and up to 5 min in 2K1C rats and did not alter the hypotensive effect induced by CVLM microinjection of Ang II in SHAM and 2K1C rats. In contrast, VIT C abolished up to 15 minutes the hypotensive effect of Ang II in the CVLM in 2K1C and SHAM rats and did not change the hypotensive effect of Ang-(1-7) in the CVLM in both groups. Furthermore, the BIC decreases the hypotensive effect of Ang-(1-7) up to 30 min in SHAM rats and up to 5 min in 2K1C rats and did not alter the hypotensive effect of Ang II in the CVLM in SHAM and 2K1C rats. Already, KYN increased hypotensive effect of Ang II up to 15 min in SHAM and 2K1C rats and did not change the hypotensive effect of Ang-(1-7) in the CVLM in both groups. Our data show the participation of the $O_2^{\cdot-}$ and GABA in the CVLM in 2K1C renovascular hypertension. Moreover, similar hypotensives effects induced by Ang II and Ang-(1-7) in the CVLM occur through distinct mechanisms, being that, NO and GABA predominantly participate hypotensive effect of Ang-(1-7), while the $O_2^{\cdot-}$ and glutamate predominantly participate in the hypotensive effect of Ang II in the CVLM in normotensive and 2K1C hypertensive rats. These data show that different pathways and/or intracellular mediators are involved in the effects induced by Ang II and Ang-(1-7) in the CVLM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Geração e metabolismo de ROS.....	19
Figura 2: Geração de superóxido pela CoQ na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.....	20
Figura 3: Via clássica da síntese de NO pela NOS.....	21
Figura 4: Protocolo experimental I.....	34
Figura 5: Protocolo experimental I	34
Figura 6: Protocolo experimental II.....	35
Figura 7: Avaliação direta da PAM e FC basais de ratos SHAM e 2R1C.....	36
Figura 8: Peso úmido relativo dos rins esquerdo e direito dos ratos SHAM e 2R1C.....	37
Figura 9: Avaliação do peso úmido relativo do coração e componentes cardíacos de ratos SHAM e 2R1C.....	38
Figura 10: Alterações na PAM e FC produzidas pelas microinjeções Ang II, Ang-(1-7), L-NAME, VIT C, BIC e KYN na CVLM em ratos SHAM e 2R1C.....	41
Figura 11: Alterações na PAM produzidas pelas microinjeções de Ang-(1-7) ou Ang II antes e após a microinjeção de L-NAME na CVLM em ratos SHAM e 2R1C.....	43
Figura 12: Alterações na PAM produzidas pelas microinjeções de Ang-(1-7) ou Ang II antes e após a microinjeção de VIT C na CVLM em ratos SHAM e 2R1C.....	45
Figura 13: Alterações na PAM produzidas pelas microinjeções de Ang-(1-7) ou Ang II antes e após a microinjeção de BIC na CVLM em ratos SHAM e 2R1C	47
Figura 14: Alterações na PAM produzidas pelas microinjeções de Ang-(1-7) ou Ang II antes e após a microinjeção de KYN na CVLM em ratos SHAM e 2R1C.....	49
Figura 15: Fotografia da superfície ventral do bulbo ilustrando a localização das microinjeções na CVLM.....	51
Figura 16: Esquema da localização das microinjeções realizadas na CVLM.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ - delta, variação

Δ FC – variação da frequência cardíaca

Δ PAM – variação da pressão arterial média

μ m- micrômetro

1R1C – 1 rim, 1 clipe (modelo experimental de hipertensão de Goldblatt)

2R1C – 2 rins, 1 clipe (modelo experimental de hipertensão de Goldblatt)

A779- antagonista de receptor Mas

ACSF- fluido cerebrospinal artificial

Akt- proteína quinase B

AMPA- receptor α -amino-3-hidroxila-5-metil-4-isoxazol-propionato ionotrópico do glutamato

Ang I – angiotensina I

Ang II – angiotensina II

Ang-(1-7) – angiotensina-(1-7)

Ânion superóxido – $O_2^{\cdot-}$

ANOVA – análise de variância

ANSR – atividade nervosa simpática renal

AT- átrios

AT1 – receptor do tipo 1 da angiotensina II

AT1a – receptor do tipo 1a da angiotensina II

AT1b – receptor do tipo 1b da angiotensina II

AT2 – receptor do tipo 2 da angiotensina II

BAECs- células endoteliais aórticas bovinas

BIC – antagonista de receptor GABA_A

BK – bradicinina

bpm- batimentos por minuto

Ca²⁺ - íon cálcio

Candersatan- antagonista do receptor AT₁ da Ang II

cGMP – guanosina monofosfato cíclico

CHO-Mas- células ovarianas de hamsters chineses transfectadas com receptor Mas

Cl⁻ - íon cloreto

cm – centímetro

CO- coração

CoQ- coenzima Q

CoQH⁻ - forma reduzida de um elétron da CoQ

Cu/Zn-SOD- superóxido dismutase citoplasmática dependente de cobre e zinco

Cu⁺ - íon cuproso

CV 11974- antagonista do receptor AT₁ da Ang II

CVLM- bulbo ventrolateral caudal

DAF-FM DA- 4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato – marcador fluorescente para NO

DHE- dihidroetídio - marcador fluorescente para O₂⁻

dl-PAG- substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

DPI- cloreto de difenileno-iodônio- inibidor da NADPH oxidase

ECA – enzima conversora de angiotensina I

ECA2 – enzima conversora de angiotensina II

eNOS – enzima óxido nítrico sintase endotelial

EPM – erro padrão da média

ER- espécies reativas

FC – frequência cardíaca

Fe²⁺ - íon ferroso

g – grama

GABA – ácido γ-aminobutírico, neurotransmissor inibitório do sistema nervoso.

GABAA – receptor de GABA tipo A

GABAB - receptor de GABA tipo B

GABAC – receptor de GABA tipo C

GABA-T – GABA-transaminase

GAD – descarboxilase do ácido glutâmico - do inglês *glutamic acid decarboxylase*

GPx- glutathione peroxidase

H₂O₂- peróxido de hidrogênio

HAEC- células endoteliais aórticas humanas
HPLC- cromatografia líquida de alta eficiência
ip – intraperitoneal
ICV- infusão intracerebroventricular
IL-6- interleucina 6
IL-β- interleucina β
IML – coluna celular intermediolateral da medula espinhal
iNOS – enzima óxido nítrico sintase induzível
IO- núcleo olivar inferior
K⁺ - cátion potássio
Kg – quilograma
KYN - ácido quinurênico – do inglês kynurenic acid – antagonista de receptores ionotrópicos do glutamato
L- litro
L-arginina- precursor de NO
LNA – N^G-nitro-L-arginina, inibidor não específico das isoformas de óxido nítrico sintase
L-NAME – nitro-L-arginina-metil-éster, inibidor não específico das isoformas de óxido nítrico sintase
L-NMMA – N^G-monometil-L-arginina, inibidor não específico das isoformas de óxido nítrico sintase
Losartan- antagonista de receptor AT₁ da Ang II
Mas – receptor da angiotensina-(1-7)
mg – miligrama
min – minuto
mL – mililitro
mm – milímetro
mmHg- milímetro de mercúrio
Mn-SOD- superóxido dismutase mitocondrial dependente de manganês
mRNA- RNA mensageiro
mtNOS – enzima óxido nítrico sintase mitocondrial
NA – núcleo ambíguo

NaCl – cloreto de sódio

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogênio

NADPH oxidase- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NaOH- hidróxido de sódio

NE- norepinefrina

nL – nanolitro

NMDA – receptor N-metil-d-aspartato ionotrópico do glutamato

nNOS – enzima óxido nítrico sintase neuronal

NO⁻ – ânion nitroxil

NO – óxido nítrico

NO⁺ – cátion nitrosônio

NO₂ – dióxido de nitrogênio

NOS – óxido nítrico síntase

NRCMs – miócitos cardíacos de rato neonatal

NTS – núcleo do trato solitário

nXII – núcleo do hipoglosso

O₂ – oxigênio

ODQ – 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, inibidor de guanilato ciclase solúvel

OH⁻ – radical hidroxil

ONOO⁻ – peroxinitrito

p38 MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno

PA – pressão arterial

PAM- pressão arterial média

PAP – pressão arterial pulsátil

PBS- solução tampão fosfato salino – do inglês *phosphate buffered saline*

PD123,319- antagonista do receptor AT₂ da Ang II

PE-10- polietileno

PIC- citocinas pró-inflamatórias

PM – peso molecular

PRX- peroxirredoxina

PVN- núcleo paraventricular do hipotálamo

Py- trato piramidal
RNS- espécies reativas de nitrogênio
ROS- espécies reativas de oxigênio
RPV – resistência periférica vascular
RVLM- bulbo ventrolateral rostral
SB203580- inibidor da p38 MAPK
SFO- órgão subfornical
SHAM – animal controle normotenso submetido à cirurgia fictícia
SHR – linhagem de ratos espontaneamente hipertensos
SHR-SP- linhagem de ratos espontaneamente hipertensos *stroke-prone*
SIH- ratos com hipertensão induzida por estresse
SMTC- S-metil-L-tiocitrulina – inibidor da nNOS.
SNA – sistema nervoso autônomo
SNC – sistema nervoso central
SNP – sistema nervoso parassimpático
SNS- sistema nervoso simpático
SOD- superóxido dismutase
SRA – sistema renina angiotensina
SSADH – semialdeído succínico desidrogenase
Tempol- mimético da superóxido dismutase (SOD)
TNF- α - fator de necrose tumoral alpha
UI – unidades internacionais
VD- ventrículo direito
VE- ventrículo esquerdo
VIT C- antioxidante ácido ascórbico
VLM – bulbo ventrolateral
WKY- ratos Wistar-Kyoto
Wortmanina- inibidor seletivo da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)
 μ g – micrograma
 μ L – microlitro

ÍNDICE

1. Introdução.....	18
2. Objetivos.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3. Materiais e Métodos.....	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Produção da Hipertensão Arterial Renovascular (2R1C)	27
3.3 Drogas e Preparo de Soluções.....	28
3.3.1 Drogas e Soluções.....	28
3.3.2 Preparo das Drogas Microinjetadas.....	29
3.4 Confecção e Implantação das Cânulas Vasculares.....	30
3.5 Traqueostomia.....	31
3.6 Avaliação Direta da Pressão Arterial.....	31
3.7 Procedimentos para Exposição do Bulbo.....	31
3.8 Procedimento de Microinjeção no Bulbo Ventrolateral Caudal.....	32
3.9 Análise Histológica do Bulbo.....	32
3.10 Análise do Peso dos Órgãos.....	33
3.11 Análise Estatística.....	33
3.12 Protocolos Experimentais.....	33
<i>Protocolo I:</i> Avaliação do efeito produzido pela microinjeção de L-NAME ou Vitamina C após as microinjeções de Ang II ou Ang-(1-7) na CVLM sobre a PAM e FC	33
<i>Protocolo II:</i> Avaliação do efeito produzido pela microinjeção de Bicuculina ou Ácido Quinurênico após as microinjeções de Ang II ou Ang-(1-7) na CVLM sobre a PAM e FC.....	35
4. Resultados.....	35
4.1 Parâmetros para Caracterização da Hipertensão Renovascular 2R1C.....	35
4.1.1 Avaliação dos Parâmetros Cardiovasculares.....	35
4.1.2 Avaliação do Peso Úmido dos Rins.....	37

4.1.3 Avaliação do Peso Úmido do Coração e Componentes Cardíacos de Ratos Normotensos SHAM e com Hipertensão 2R1C.....	38
4.2 Efeitos Produzidos pelas Microinjeções na CVLM.....	39
4.3 Efeitos Produzidos pelas Microinjeções na CVLM de Ang II ou Ang-(1-7) após as Microinjeções de L-NAME ou Vitamina C.....	42
4.4 Efeitos Produzidos pelas Microinjeções na CVLM de Ang II ou Ang-(1-7) após as Microinjeções de Bicuculina ou Ácido Quinurênico.....	46
4.5 Avaliação Histológica da CVLM.....	50
5. Discussão.....	52
6. Sumário.....	65
7. Conclusão.....	66
8. Perspectivas.....	66
9. Referências.....	68

1-INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é uma doença crônica e fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e doenças renais crônicas, que podem levar a morte, sendo um grave problema de saúde pública [177]. As doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 17 milhões de mortes por ano, quase um terço do total [178]. Destas, a hipertensão é responsável por 9.4 milhões de mortes no mundo por ano [1] devido às suas complicações como acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio [178]. O tratamento dessa doença está associado a uma redução de 40% do risco de acidente vascular cerebral e 15% de infarto do miocárdio [2].

O estresse oxidativo resultante da produção aumentada de espécies reativas (ER) e/ou redução dos mecanismos antioxidantes [3] é importante na patogênese de doenças cardiovasculares, tais como hipertensão, insuficiência cardíaca, aterosclerose, diabetes, e hipertrofia cardíaca [4]. Estudos mostram que os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*) como, ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e óxido nítrico (NO), respectivamente, podem estar alterados em áreas centrais relacionadas com o controle cardiovascular como núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) [5], núcleo do trato solitário (NTS) [6], bulbo ventrolateral rostral (RVLM) [7] e bulbo ventrolateral caudal (CVLM) [8].

O $O_2^{\cdot-}$ e NO são os primeiros radicais gerados nas células e ambos $O_2^{\cdot-}$ e NO são reativos e podem rapidamente reagir para formar uma série de outras ROS e RNS [9]. Por meio de vários processos enzimáticos e não-enzimáticos que ocorrem rotineiramente nas células, o oxigênio (O_2) recebe um elétron para formar ROS. As ROS são compostos contendo O_2 que são radicais livres altamente reativos ou compostos que se convertem prontamente nesses radicais livres de O_2 na célula. As ROS formadas pela redução do O_2 são o radical $O_2^{\cdot-}$, o não-radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}) [179].

Como ilustrado na Figura 1, o $O_2^{\cdot-}$ é formado pela redução da molécula de oxigênio (O_2) por um único elétron [10] por via não enzimática a partir da coenzima Q (CoQ) na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Figura 2) ou por enzimas como citocromo P450 [179], nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), xantina oxidase, óxido nítrico síntase (NOS) e lipoxigenase [11] (Figura 1). $O_2^{\cdot-}$ pode ser convertido pela superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez, pode ser

reduzido a água pelas enzimas catalase, glutiona peroxidase (GPx) e peroxirredoxinas (PRX). Na presença de metais de transição (Fe^{2+} , Cu^+) o H_2O_2 pode ser convertido espontaneamente a radical hidroxil (OH^\cdot) que é altamente tóxico. É importante ressaltar que o O_2^\cdot pode reagir rapidamente com o NO levando a produção do forte oxidante peroxinitrito (ONOO^-) (Figura 1).

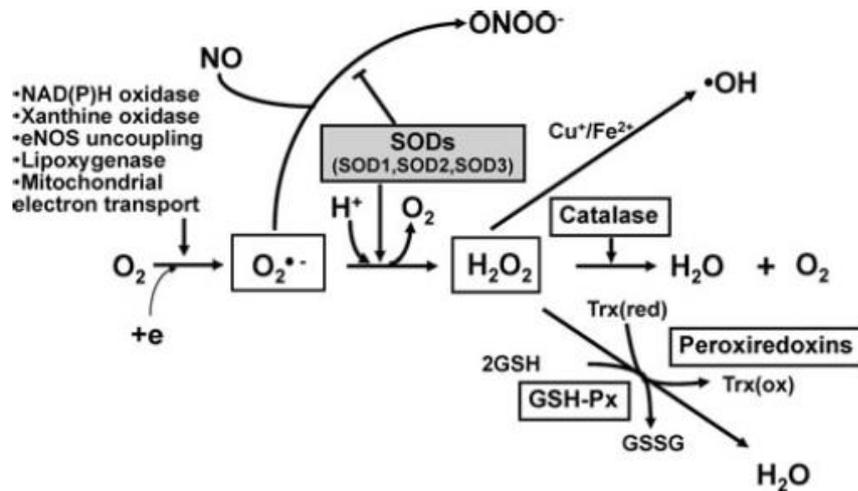


Figura 1: Geração e metabolismo de ROS. O_2^\cdot é produzido pelas enzimas NADPH oxidase, xantina oxidase, NOS e lipoxigenase. O_2^\cdot é convertido pela superóxido dismutase (SOD) a H_2O_2 , que por sua vez, é reduzido a água pelas enzimas catalase, GPx e PRX. Na presença de Fe^{2+} e Cu^+ , o H_2O_2 é convertido a OH^\cdot . O O_2^\cdot pode reagir rapidamente com o NO levando a ONOO^- [11].

A Figura 2 mostra a produção de superóxido por via não enzimática a partir da CoQ na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

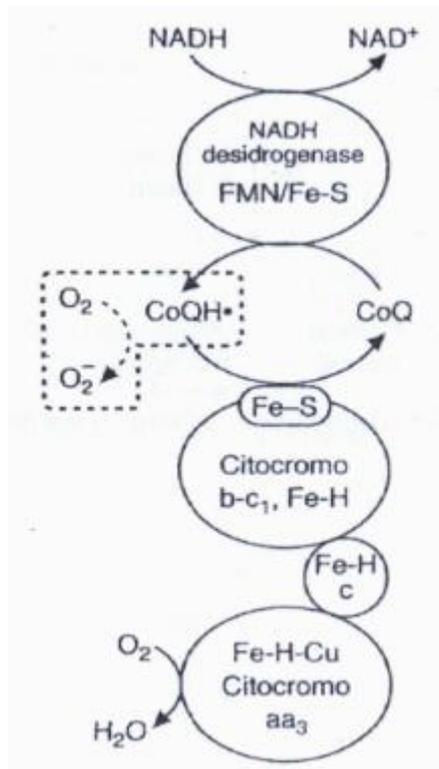


Figura 2: Geração de superóxido pela CoQ na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. A forma reduzida de um elétron da CoQ (CoQH[•]) está livre dentro da membrana e pode, acidentalmente, transferir um elétron ao O₂ dissolvido formando, desse modo, O₂^{•-} [179].

O O₂^{•-} tem sido descrito como um modulador da atividade do Sistema Nervoso Simpático (SNS) em animais hipertensos [12, 13]. Estudos mostram que níveis elevados de O₂^{•-} podem contribuir para o aumento da atividade do SNS e para hipertensão. Adicionalmente, vários estudos têm demonstrado que vitaminas antioxidantes, como Vitamina C, miméticos da superóxido dismutase, como tempol e inibidores da NADPH oxidase, como apocinina, periféricamente [14, 15] ou em áreas centrais como a RVLM [13, 16] e PVN [13] atenua ou previne o desenvolvimento da hipertensão em animais espontaneamente hipertensos *Stroke-Prone* (SHR-SP) [16] e com hipertensão renovascular [14, 15].

Os baixos níveis de ROS (por exemplo, O₂^{•-} e H₂O₂) são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo a sinalização intracelular, a defesa contra microorganismos e função celular [17, 18]. Em contraste, altas doses e/ou remoção inadequada de ROS, especialmente O₂^{•-}, resulta em estresse oxidativo que tem sido implicado na patogênese de muitas doenças cardiovasculares como já mencionado.

As RNS são vários compostos derivados do NO, incluindo o ânion nitroxil (NO⁻), o cátion nitrosônio (NO⁺), os óxidos de nitrogênio (como por exemplo o NO), os S-nitrosotióis

e os complexos de ferro dinitrosil [19]. O NO é caracteristicamente uma molécula gasosa difusível, com meia vida curta e altamente reativa [20]. O envolvimento do NO em diversos processos fisiológicos e patológicos tem motivado estudos em diversas morbidades, dentre elas a hipertensão arterial [21].

Essa molécula é sintetizada principalmente a partir do aminoácido semi-essencial L-arginina em uma reação catalisada pela enzima NOS para produzir o NO e citrulina em um processo que requer nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH) e o O₂ [22]. A Figura 3 indica a clássica reação química de formação do NO, em que a L-arginina é transformada em um intermediário do NO, a NG-hidroxi-L-arginina com a presença de NADPH e cálcio (Ca²⁺) sendo necessário mais NADPH e O₂ para a formação de L-citrulina e NO.

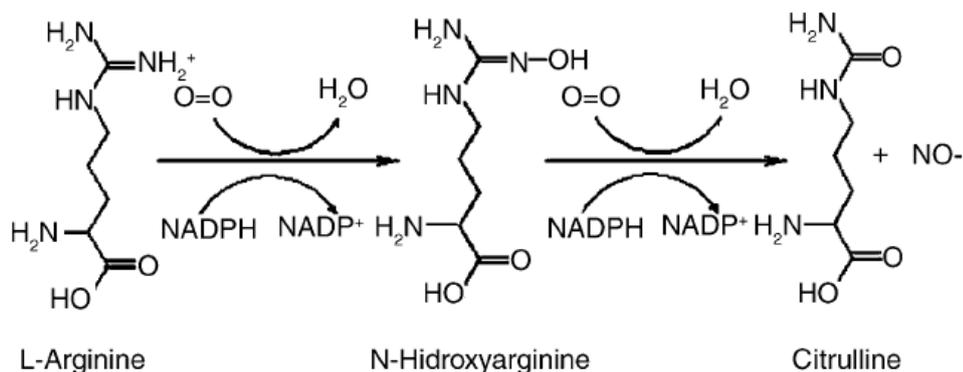


Figura 3: Reação clássica da síntese de NO pela NOS. A L-arginina na presença de NADPH e O₂ é oxidada a N-hidroxi-arginina, que é re-oxidada a citrulina produzindo NO [184].

A síntese enzimática de citrulina e NO pode ser inibida por análogos da L-arginina, tais como N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginina (LNA) e N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Esses inibidores são amplamente utilizados em pesquisas, uma vez que promovem a substituição do substrato natural, L-arginina, pelos análogos que irão inibir a produção de NO e seus efeitos subsequentes [23].

Existem formas alternativas da produção de NO através de reações específicas como sua liberação a partir do H₂O₂ e L-arginina por via não enzimática [24] ou pela redução de nitritos ou outras reações de redução em processos de isquemia [25]. No entanto, a maioria absoluta do NO é produzida enzimaticamente em tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, plaquetas, células endoteliais e musculares lisas, células parênquimais, além de neurônios por uma família de isoenzimas da família do citocromo P450-like, pelas NOSs [26].

Existem quatro membros da família da NOS: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS), NOS induzível (iNOS) e NOS mitocondrial (mtNOS).

A nNOS é uma isoforma dependente de Ca^{2+} intracelular, ocorrendo sua inativação abaixo de uma determinada concentração deste mineral [27]. A eNOS foi originalmente identificada no endotélio vascular e sua ação regula a resistência vascular. Sua atividade também é Ca^{2+} -calmodulina dependente e no sistema nervoso central (SNC) está predominantemente presente no endotélio dos vasos cerebrais, em populações de neurônios [28] e em células da glia [29]. A iNOS é expressa após a estimulação de macrófagos, astrócitos, micróglia, e outras células em processos imunológicos e inflamatórios, nestas situações a produção de NO não é dependente do Ca^{2+} , sendo alta e dura horas ou dias [30, 31]. No SNC, a iNOS é encontrada em células da glia e sua indução está associada à resposta imune inespecífica do SNC em condições patológicas [32]. A mtNOS é uma isoforma da nNOS presente no interior da membrana da mitocôndria [33]. A função da mtNOS na mitocôndria parece estar relacionada a regulação do consumo de O_2 através da inibição da citocromo oxidase C [34]. A modulação do consumo de O_2 através do NO mitocondrial é transitória e reversível porque o NO é gerado em pequenas quantidades.

Em baixas concentrações, o NO, age fisiologicamente como um neurotransmissor e um hormônio que causa vasodilatação. Entretanto, em altas concentrações, combina-se com o O_2 ou com o $\text{O}_2^{\cdot -}$ para formar espécies tóxicas e reativas adicionais que contêm nitrogênio e oxigênio, tais como o ONOO^- e o dióxido de nitrogênio (NO_2) [179].

De fato, o NO já foi descrito atuando como neurotransmissor e neuromodulador de mecanismos fundamentais de controle do SNS e sistema nervoso parassimpático (SNP) em importantes centros cardiovasculares, tais como PVN [35], NTS [36], RVLM [36, 37] e CVLM [37]. Estes núcleos centrais fazem parte de um importante circuito relacionado ao controle de funções cardiovasculares [38].

A RVLM é tipicamente conhecida como uma área pressora [39] por conter neurônios pré-motores simpáticos responsáveis pela manutenção da excitação tônica de neurônios pré-ganglionares simpáticos envolvidos na regulação cardiovascular, além de estar envolvida na manutenção do tônus vasomotor basal [40]. A estimulação da RVLM aumenta a atividade do SNS e a pressão arterial (PA), enquanto a inibição de neurônios da RVLM diminui a atividade do SNS e a PA, demonstrando que essa região é tonicamente ativa [40, 41]. Como uma área final para a modulação da via simpatoexcitatória dos neurônios pré-ganglionares simpáticos na coluna celular intermediolateral da medula espinal (IML), a RVLM recebe e integra os sinais neurais de várias áreas do SNC [42], tais como NTS, PVN [43] e CVLM [44-46].

A CVLM é caracterizada como sendo uma região depressora por conter uma projeção neuronal ascendente inibitória para a RVLM [47, 48] e por conter uma projeção excitatória para o núcleo ambíguo (NA) que estimula o SNP [49]. A estimulação da CVLM provoca hipotensão, com conseqüente vasodilatação de diversos territórios vasculares, incluindo os leitos mesentérico, da musculatura esquelética e renal [40, 45, 50]. A atividade tônica da CVLM é mantida através do balanço de sinapses excitatórias glutamatérgicas e inibitórias gabaérgicas, que determina o grau de excitabilidade do neurônio ascendente inibitório gabaérgico da CVLM para a RVLM, determinando assim, a atividade neuronal da RVLM e consequentemente a atividade do SNS. A inibição dos neurônios simpato-excitatórios na RVLM induzida pelo neurônio gabaérgico da CVLM [44-46] leva a uma diminuição da atividade do SNS e a uma conseqüente redução da PA [51-56]. A inibição da atividade neuronal da CVLM pelo bloqueio de seus receptores, ou mesmo, a destruição mecânica da região, aumenta significativamente a atividade neuronal da RVLM, a atividade do SNS e a PA [51, 52, 57, 58].

A contribuição da CVLM para gênese e manutenção da hipertensão ainda não está completamente estabelecida [59-61]. Estudos da literatura mostraram que durante a hipertensão ocorre uma hiperatividade de neurônios da RVLM [62-65]. Além disso, em animais geneticamente hipertensos (SHR) e com hipertensão renovascular, a inibição gabaérgica promovida pela CVLM sobre neurônios excitatórios da RVLM parece estar atenuada [66-68], o que poderia explicar o aumento da atividade do SNS observada nesses modelos de hipertensão [66, 69, 70].

A hipertensão arterial pode ser produzida experimentalmente através da estenose da artéria renal, perinefrite, compressão renal ou coarctação da aorta em animais com um ou dois rins. Alguns modelos de hipertensão renovascular foram descritos por Goldblatt e colaboradores (1934) [71], que demonstraram a participação do rim como agente primário no surgimento da hipertensão. Em seus modelos animais, desenvolveram a hipertensão renovascular, um rim, um clipe (1R1C) e dois rins, um clipe (2R1C) [72].

O modelo de hipertensão 2R1C é aquele em que se faz a constrição da artéria de um dos rins, enquanto o rim contra lateral é mantido intacto [73-76]. O modelo é caracterizado por uma redução no fluxo sanguíneo do rim que está com sua artéria clipada. Essa redução do fluxo sanguíneo renal ativa o sistema renina-angiotensina (SRA) e eleva os níveis de Angiotensina II (Ang II) [77]. Os altos níveis circulantes de Ang II possuem efeitos vasculares diretos como o aumento da resistência periférica vascular (RPV), o que contribui para a elevação da PA [77]. Com o progressivo aumento da PA sistêmica e da pressão de

perfusão ocorre aumento do fluxo sanguíneo para o rim contra lateral não clipado, o que depleta seus níveis de renina. No entanto, por mecanismos ainda não totalmente compreendidos, o rim contra lateral não-estenótico, apresenta altos níveis de Ang II e por isso, retém sódio e água mesmo com níveis depletados de renina. Essa resposta diferenciada do rim não-estenótico é conhecida como o “mistério de Goldblatt” e é responsável pela manutenção da alta hipertensão arterial do modelo 2R1C [78].

O desenvolvimento inicial da hipertensão 2R1C nas primeiras semanas é produzido pela ativação do SRA. Na visão clássica desse sistema, as angiotensinas começam a ser formadas através da hidrólise do angiotensinogênio pela enzima renina para formar o decapeptídeo, angiotensina I (Ang I). A remoção de dois aminoácidos da extremidade carboxi-terminal pela enzima conversora de angiotensina (ECA) resulta na formação do principal efetor do SRA, a Ang II. Este peptídeo atua principalmente através de dois subtipos de receptores, o receptor 1 da Ang II (AT₁) e o receptor 2 da Ang II (AT₂) [79, 80]. Dois subtipos do receptor AT₁ foram identificados em ratos e camundongos, os receptores AT_{1A} e AT_{1B} [81]. O receptor AT₁ medeia tanto os efeitos fisiológicos clássicos da Ang II, como regulação da PA, do balanço hidroeletrolítico e dos comportamentos associados à sede e ingestão de sódio, quanto efeitos patológicos, como hipertrofia cardíaca patológica e hipertensão [82-84]. Já a ligação da Ang II ao seu receptor AT₂ produz efeitos que têm sido caracterizados como contrareguladores aos efeitos mediados pelo receptor AT₁, tanto em curto, como em longo prazo [85-87] tendo um papel protetor contra a hipertensão. Essa ligação produz respostas fisiológicas associadas à regulação da PA, natriurese, temperatura corporal, reprodução, desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, reparo de tecidos, morte celular programada [88-91] e efeito anti-proliferativo e vasodilatador no SNC [92].

A fragmentação do octapeptídeo Ang II, através da remoção da fenilalanina de sua porção carboxi-terminal, resulta na formação direta da Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. Esta conversão é eficientemente catalisada pela enzima conversora de Angiotensina II (ECA2), um análogo da ECA [93, 94]. A Ang-(1-7) também pode ser formada indiretamente a partir da Ang I através das atuações da ECA2, ECA e de várias enzimas como a proliendopetidase nas células vasculares [95], endopeptidase neutral na circulação e rins [96] e oligopeptidases [97]. Vários estudos mostraram que a Ang-(1-7) possui efeitos, na maioria das vezes, opostos aos produzidos pela Ang II [98-100]. Nos vasos, além de potencializar a ação vasodilatadora da bradicinina (BK) [101-105] ainda inibe o crescimento de células musculares lisas [106-109]. Estudos têm mostrado que estes efeitos anti-hipertensivos da Ang-(1-7) estão associados à liberação de NO [99, 104, 110].

A hiperatividade dos componentes do SRA e do estresse oxidativo contribui para o aumento da atividade do SNS e para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial [14, 111]. A maioria dos estudos a respeito das ações cardiovasculares do $O_2^{\bullet-}$ e do NO no bulbo ventrolateral (VLM), que é composto pela RVLM e CVLM, tiveram como foco a RVLM e com isso pouco se sabe das ações cardiovasculares do $O_2^{\bullet-}$ e do NO na CVLM e principalmente do seu envolvimento com o SRA durante a hipertensão. Em adição, estudos [61, 112, 113] mostraram que durante a hipertensão ocorre uma disfunção no SRA e um aumento do estresse oxidativo na CVLM [8], o que é responsável por elevados níveis de $O_2^{\bullet-}$, que por sua vez, pode alterar a biodisponibilidade do NO [114].

Em trabalhos anteriores [115-117] e em estudos prévios de nosso laboratório [61, 112] foi mostrado que as microinjeções de Ang II e Ang-(1-7) na CVLM produzem efeitos hipotensores similares em ratos normotensos SHAM, SHR e com hipertensão renovascular 2R1C. No entanto, Alzamora e colaboradores (2002) [116] mostraram em ratos normotensos que apesar da Ang II e da Ang-(1-7) na CVLM produzirem efeitos hipotensores semelhantes, esses peptídeos angiotensinérgicos atuam através de mecanismos periféricos diferentes, sendo que a Ang-(1-7) age preferencialmente através da via nitroxidérgica, enquanto a Ang II atua através da via adrenérgica.

Além disso, sabe-se que os efeitos fisiológicos apresentados por estes peptídeos envolvem receptores diferentes e acredita-se que espécies reativas alteradas pelo estresse oxidativo que ocorre na CVLM, durante a hipertensão, possam modular de maneira diferente a ação das angiotensinas centrais. Visto que, estudos da literatura mostraram que os efeitos da Ang II estão envolvidos com o $O_2^{\bullet-}$ em culturas de células do músculo liso vascular [118] e no SNC [119, 120], enquanto que ações da Ang-(1-7) envolvem a participação do NO periféricamente [121, 122] e em regiões centrais [123, 124].

Paralelamente, evidências indicam que os neurotransmissores aminoácidos estão envolvidos com os efeitos cardiovasculares das angiotensinas em áreas centrais como CVLM [125], RVLM [126], PVN [127] e núcleo estriado [128]. Estudo prévio da literatura [125] mostrou que a Ang-(1-7) modula a liberação de glutamato (um aminoácido excitatório) e taurina (um aminoácido inibitório) na CVLM em ratos normotensos. Outros estudos da literatura [126, 129] fornecem evidências de que os efeitos da Ang II sobre a atividade cardiovascular na RVLM e no PVN envolvem mudanças na liberação de neurotransmissores aminoácidos nas mesmas áreas. No entanto, ainda é desconhecido se existe uma relação entre a Ang II e os neurotransmissores aminoácidos na CVLM. Em adição, estudos [130, 131] mostram que os neurotransmissores glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA, um

aminoácido inibitório) desempenham um importante papel na regulação da atividade cardiovascular tônica da CVLM.

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório no SNC. Esse aminoácido inibitório é gerado a partir do ácido glutâmico pela ação da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD do inglês *glutamic acid decarboxylase*) [132] e é metabolizado pelas enzimas GABA-transaminase (GABA-T) e semialdeído succínico desidrogenase (SSADH). O GABA atua sobre receptores GABAA, GABAB e GABAC. Os receptores GABAA são ionotrópicos (canais de Cl⁻ dependentes de ligantes) e seletivamente bloqueados pela bicuculina (BIC). Esse receptor está localizado nas terminações pré e pós-sinápticas. Os receptores GABAB são essencialmente pré-sinápticos, metabotrópicos (ativam os sistemas de segundos mensageiros e canais iônicos de Ca²⁺ e K⁺), insensíveis a bicuculina e são estimulados pelo baclofeno. Já, os receptores GABAC são ionotrópicos e insensíveis a ambos bicuculina e baclofeno [132].

Por outro lado, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC. O glutamato é gerado a partir da glutamina através da atuação da enzima glutaminase ou a partir do α -cetoglutarato pela ação da enzima GABA transaminase. Existem dois grupos principais de receptores ionotrópicos para o glutamato, caracterizados por responder seletivamente a determinados agonistas. Um grupo é formado pelos receptores do tipo NMDA, que respondem seletivamente ao N-metil-d-aspartato, e o outro grupo é formado pelos receptores AMPA/cainato, que respondem seletivamente aos agonistas α -amino-3-hidroxila-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) e ao ácido caínico, respectivamente [180]. A sinapse glutamatérgica pode ser inibida pelo ácido quinurênico (KYN do inglês *kynurenic acid*), uma vez que essa droga promove o bloqueio de receptores ionotrópicos do glutamato.

Baseando-se nessas evidências, a hipótese do presente estudo foi que ER como o O₂⁻ e o NO e neurotransmissores aminoácidos como o glutamato e o GABA poderiam estar envolvidos de forma diferente nos efeitos hipotensores induzidos pelas Ang II e Ang-(1-7) na CVLM, participando de alguma forma na gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar se diferentes ER como o O₂⁻ e o NO e neurotransmissores aminoácidos como o glutamato e o GABA estariam envolvidos nos efeitos hipotensores induzidos pelas microinjeções de Ang II e Ang-(1-7) na CVLM em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

2- OBJETIVOS:

2.1 Objetivo Geral:

O objetivo geral do estudo foi avaliar se diferentes ER como $O_2^{\cdot-}$ e NO e neurotransmissores aminoácidos como glutamato e GABA estariam envolvidos nos efeitos hipotensores induzidos pelas microinjeções de Ang II e Ang-(1-7) na CVLM em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

2.2 Objetivos Específicos:

- 1- Avaliar o efeito da microinjeção do inibidor da NOS, L-NAME, ou do antioxidante ácido ascórbico, vitamina C (VIT C), na CVLM sobre a PA e FC em ratos SHAM e 2R1C;
- 2- Avaliar o efeito da microinjeção de BIC (antagonista de receptor GABAA) ou KYN (antagonista de receptores ionotrópicos do glutamato) na CVLM sobre a PA e FC em ratos SHAM e 2R1C;
- 3- Avaliar o efeito da microinjeção de L-NAME ou VIT C sobre o efeito hipotensor induzido pela Ang II ou Ang-(1-7) na CVLM em ratos SHAM e 2R1C;
- 4- Avaliar o efeito da microinjeção de BIC ou KYN sobre o efeito hipotensor induzido pela Ang II ou Ang-(1-7) na CVLM em ratos SHAM e 2R1C.

3-METODOLOGIA E MATERIAIS UTILIZADOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Fischer provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental (ENUT) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de Ética da UFOP de acordo com os ofícios (CEUA nº 022/2007 e Cep nº 2013/13).

3.2 Produção da Hipertensão Arterial Renovascular (2R1C)

Para a produção do modelo experimental de hipertensão foi utilizada a técnica cirúrgica dois rins, um clipe (2R1C), desenvolvida por Goldblatt e colaboradores (1934) [71]. Os ratos (150-200g) foram submetidos ao jejum de 12 horas, com livre acesso à água. No dia da cirurgia, sob anestesia de quetamina e xilasina (50 mg/ kg e 5 mg/ kg, ip, respectivamente)

os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica, e submetidos à tricotomia e assepsia da região abdominal com álcool iodado 2%. Em seguida foi feita uma laparotomia mediana de 4 a 6 cm abaixo do processo xifóide para visualização e isolamento da artéria renal esquerda. Foram colocados retratores bilateralmente na incisão cirúrgica e as alças intestinais foram retraídas. Em seguida, a artéria renal esquerda foi isolada com o auxílio de pinças e cotonetes e um clipe de prata (contendo 5% de liga de cobre e ótimo grau de dureza) com 8 mm de comprimento e 2 mm de largura, em forma de U, foi colocado em torno da artéria renal. O grau de constrição interna do clipe foi previamente fixado a 0,20 mm através do uso de um calibrador. O valor de constrição da artéria renal de 0,20 mm foi definido através de experimentos preliminares em que foi observado um índice de pressão arterial média (PAM) > 130 mmHg, após 28 dias da cirurgia.

Outros animais foram submetidos à cirurgia fictícia (SHAM), que consistiu na realização de todos os procedimentos acima, exceto a colocação do clipe de prata em torno da artéria renal. Estes animais foram utilizados como controle. Em todos os animais o abdômen foi suturado com pontos contínuos, envolvendo a camada muscular e pontos separados na pele. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, uma dose única de antibiótico (0,01mL/ 100g de peso corporal pentabiótico veterinário/ Fort DODGE) foi administrada em todos os animais para evitar infecções pós-cirúrgicas.

3.3 Drogas e Preparo de Soluções

3.3.1 Drogas e Soluções

- **Angiotensina II:** {Peso molecular (PM): 1046,18} Adquirido de Bachem Chemical Company (St. Louis, MO, USA).
- **Angiotensina-(1-7):** {PM: 898,10} Adquirido de Bachem Chemical Company (St. Louis, MO, USA).
- **L-NAME (inibidor não específico das isoformas da NOS):** {PM: 270,0} Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).
- **Vitamina C (antioxidante ácido ascórbico):** {PM: 176,12} Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- **Bicuculina (antagonista de receptor GABAA):** {PM: 509,3} Fluka Analytical
- **Ácido Quinurênico (antagonista de receptores ionotrópicos do glutamato):** {PM: 207,19} Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

- **Anestésicos:** - **Uretana** (PM: 89,09), adquirida de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).
 - **Xilazina**, adquirida da Syntec do Brasil Ltda.
 - **Quetamina**, adquirida da Syntec do Brasil Ltda.
- **Heparina sódica:** 25.000 UI/ 5mL adquirida de Roche Primare Care.
- **Pentabiótico (antibiótico):** adquirido de Fort DODGE.

3.3.2 Preparo das Drogas Microinjetadas nos Experimentos

Preparo da Angiotensina II e Angiotensina-(1-7)

A Ang II e Ang-(1-7) foram dissolvidas em solução fisiológica estéril de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) na concentração de 2 mg/ mL, imediatamente aliquotadas (10 µL), e acondicionadas em microtubos de polietileno tipo “Eppendorf” a -20°C. No dia do experimento, diluiu-se o conteúdo de um microtubo a 40 µL de solução fisiológica de NaCl. A quantidade microinjetada de Ang II e Ang-(1-7) foi de 40 pmol em 100 nL. A concentração e quantidade dos peptídeos microinjetados foram escolhidas de acordo com estudos prévios da literatura [61, 112, 116, 117].

Preparo do L-NAME

O L-NAME foi dissolvido em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) na concentração de 0,135 mg/ µL, imediatamente aliquotado (5 µL), e acondicionado em microtubos de polietileno tipo “Eppendorf” a -20°C. No dia do experimento, diluiu-se o conteúdo de um microtubo a 20 µL de solução fisiológica de NaCl. A quantidade microinjetada de L-NAME foi de 10 nmol em 100 nL. A concentração e quantidade da droga a ser microinjetada foram escolhidas de acordo com estudos prévios da literatura [133-135].

Preparo da Vitamina C

A vitamina C foi dissolvida em solução tampão fosfato salino (PBS do inglês *Phosphate buffered saline*) na concentração de 0,08806 mg/ µL, imediatamente aliquotada (10 µL), e acondicionada em microtubos de polietileno tipo “Eppendorf” a -20°C. No dia do experimento, diluiu-se o conteúdo de um microtubo a 40 µL de PBS. A quantidade

microinjetada de vitamina C foi de 10 nmol em 100 nL. A concentração e quantidade da droga a ser microinjetada foram escolhidas de acordo com estudos prévios da literatura [13, 14].

Preparo da Bicuculina

A bicuculina foi dissolvida em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) na concentração de 0,002 mg/ μ L, imediatamente aliqotada (5 μ L), e acondicionada em microtubos de polietileno tipo “Eppendorf” a -20°C. No dia do experimento, diluiu-se o conteúdo de um microtubo a 195 μ L de solução fisiológica de NaCl. A quantidade microinjetada de bicuculina foi de 10 pmol em 100 nL. A concentração e quantidade da droga a ser microinjetada foram escolhidas de acordo com estudos prévios da literatura [136, 137].

Preparo do Ácido Quinurênico

O ácido quinurênico (KYN) foi dissolvido em PBS na concentração de 0,0559 mg/ μ L, equivalente ao volume final de 894 μ L. Para não precipitar o KYN foi primeiramente diluído em hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, equivalente a 261,6 μ L de NaOH, e então diluído em PBS até completar o volume final. Posteriormente, essa solução foi imediatamente aliqotada (10 μ L), e acondicionada em microtubos de polietileno tipo “Eppendorf” a -20°C. No dia do experimento, diluiu-se o conteúdo de um microtubo a 90 μ L de PBS. A quantidade microinjetada de KYN foi de 5 nmol em 50 nL. A concentração da droga a ser microinjetada foi escolhida de acordo com estudo prévio da literatura [69].

3.4 Confeção e Implantação das Cânulas Vasculares

Na confeção das cânulas foram utilizados tubos de polietileno (PE-10) de 4 cm para cânula arterial e de 2 cm para a cânula de veia, soldados a tubos de polietileno (PE-50) de 15 cm por aquecimento. Antes da canulação, o interior das cânulas foi preenchido com solução fisiológica heparinizada (NaCl, 0,9%) e a extremidade PE-50 de cada cânula foi obstruída com pino de metal. Os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica realizando-se uma pequena incisão na face ventral da pata traseira direita, separando a musculatura para localização do feixe vaso-nervoso femoral. A artéria e veia femorais foram dissecadas e expostas. A extremidade PE-10 das cânulas foram introduzidas na aorta

abdominal, via artéria femural, para registro dos parâmetros cardiovasculares e na veia cava inferior, através da veia femural, para administração de drogas. Para este procedimento e para os demais apresentados a seguir, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/ Kg) por via intraperitoneal (ip).

3.5 Traqueostomia

Os animais foram colocados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal e submetidos a uma incisão mediana na região cervical anterior. A musculatura foi divulsionada e a traquéia exposta. Em seguida uma cânula de polietileno (PE 90) foi introduzida na traquéia com a finalidade de manter as vias aéreas patentes durante o experimento.

3.6 Avaliação Direta da Pressão Arterial

A PA foi monitorada através de um transdutor de pressão modelo Gould conectado a um amplificador (PM-1000, CWE). O sinal de pressão arterial pulsátil (PAP) foi derivado para um cardiômetro (PM-1000, CWE) para se obter a FC. A PAP e FC foram continuamente amostradas por um sistema de conversão analógico/ digital de 12 bits (POWERLAB 4/ 25) a uma frequência de 800 Hz e armazenados em disco rígido (PC). Posteriormente, o sinal foi processado por um software (Chart 5 for Windows) para se obter a PAM, as características temporais e as alterações máximas dos parâmetros desejados. Simultaneamente, a PAM e FC foram calculadas a partir de pulsos de PA. Essas variáveis foram apresentadas simultaneamente em canais diferentes do monitor e armazenadas em disco rígido do computador. Antes da conexão da cânula arterial ao transdutor de pressão, a mesma foi heparinizada (heparina sódica 25.000 UI/ 5mL) a fim de se evitar a formação de coágulos durante o registro dos parâmetros cardiovasculares.

3.7 Procedimentos para Exposição do Bulbo

Os animais foram colocados em decúbito ventral em um aparelho estereotáxico (David Kopf modelo DKI 900) para realização da cirurgia de exposição do bulbo. A inclinação da cabeça foi mantida em uma angulação de aproximadamente 30° e a -11 mm abaixo da linha interaural com auxílio das barras auriculares e peça bucal do aparelho. Uma incisão mediana foi feita na região cervical posterior, separando-se a musculatura. A seguir, procedia-se uma

craniotomia occipital, seccionava-se a membrana atlanto-occipital e as meninges (dura-máter e aracnóidea), expondo-se a superfície dorsal do tronco cerebral.

3.8 Procedimento de Microinjeção no Bulbo Ventrolateral

As microinjeções foram feitas utilizando-se uma micropipeta de vidro de três pontas, confeccionadas em um aparelho para elaboração de micropipetas de vidro “*Gass Puller*”. Na extremidade de cada ponta foram adaptados cateteres de polietileno (P90) e posteriormente o conjunto foi devidamente fixado ao micromanipulador ou haste do estereotáxico. As microinjeções foram realizadas pela pressão de ar exercida manualmente por uma seringa de plástico conectada a extremidade distal de cada P90. O volume de cada microinjeção das drogas foi de 100 nL. Exceto o volume da microinjeção de KYN que foi de 50 nL. Para controlar os efeitos de volume e/ou pressão exercida pela microinjeção das drogas, o volume de veículo (100 nL, NaCl 0,9%) foi também microinjetado. As drogas foram microinjetadas unilateralmente na área caudal do bulbo ventrolateral (CVLM) esquerda, tendo o óbex como ponto de referência antero-posterior e lateral esquerdo de acordo com as seguintes coordenadas: **CVLM** – 0,7 mm rostral e 1,8 mm lateral esquerdo ao óbex. A inserção da micropipeta aconteceu através da posição dorsal do bulbo e atravessou todo o bulbo até a micropipeta alcançar a superfície ventral do bulbo. Dessa forma, as microinjeções do presente estudo, ocorreram nas projeções neuronais da CVLM para a área ventral do bulbo e não no próprio núcleo ou na projeção neuronal inibitória ascendente da CVLM para a RVLM. A profundidade foi determinada a partir do momento em que a ponta da micropipeta de vidro tocou a superfície ventral ao bulbo. A confirmação fisiológica do posicionamento correto da micropipeta de vidro na CVLM foi obtida através da observação de uma queda transitória da PAM em torno de 11 mmHg. Nas microinjeções em que não se observou esse efeito fisiológico, os ratos foram descartados.

3.9 Análise Histológica do Bulbo

Ao fim de cada experimento, o animal foi sacrificado por decapitação através da guilhotina para animais de experimentação de pequeno porte. Os cérebros foram removidos e fixados em paraformaldeído 4%. Os tecidos foram seccionados na espessura 50 µm através da utilização de um criostato (Leica CM 1850). As secções do bulbo foram dispostas em lâminas de vidro previamente gelatinadas. Após secagem (24 horas), as lâminas foram coradas através

da técnica de coloração pelo vermelho neutro. A localização do sítio das microinjeções nos cortes histológicos foi realizada com auxílio de microscópio e tinha como referência os diagramas do atlas de Paxinos e Watson, 1986 [181]. Posteriormente, os cortes mais representativos de cada grupo foram visualizados em uma lupa (Leica MZ6) e em seguida fotografados. Os animais em que o sítio de microinjeção não coincidiam com a CVLM tinham seus registros cardiovasculares eliminados da análise.

3.10 Análise do Peso dos Órgãos

Após os experimentos, os rins (direito e esquerdo) foram retirados e pesados após secagem rápida com papel filtro (peso úmido). Foi realizada a relação entre o peso úmido dos órgãos e o peso corporal do rato (g/100g peso do rato). O coração dos animais também foi coletado para análise do peso úmido total e peso de átrios e ventrículos em relação ao peso corporal do rato (g/100g peso do rato).

3.11 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Comparações entre antes e depois das microinjeções de drogas no mesmo animal foram feitas pelo teste “t” de Student pareado. Para observações entre animais diferentes foi utilizado o teste “t” de Student não pareado. Comparações entre grupos diferentes foram realizadas por ANOVA “one-way” seguido do teste de Newman-Keuls. As análises foram realizadas através do software *Graphpad Prism* (versão 4.00). Foram consideradas diferenças significativas para $p < 0,05$.

3.12 Protocolos Experimentais

Protocolo I: Avaliação do efeito produzido pela microinjeção de L-NAME ou Vitamina C após as microinjeções de Ang II ou Ang-(1-7) na CVLM sobre a PAM e FC

Após o início do registro da PAM e FC, por cerca de dez minutos (min) (estabilização), posicionou-se a micropipeta de vidro na CVLM. Esperou-se, mais dez min para realização da microinjeção de Ang II (40 pmol) ou Ang-(1-7) (40 pmol). Em seguida, microinjetou-se o inibidor da óxido nítrico síntese, L-NAME (10 nmol), ou o antioxidante

ácido ascórbico, vitamina C (VIT C, 10 nmol), na CVLM. Na intenção de verificar se o L-NAME ou VIT C na CVLM seria capaz de alterar os efeitos hipotensores da Ang II ou Ang-(1-7), aos 5, 15 e 30 min após a microinjeção do L-NAME, repetiu-se as microinjeções dos peptídeos angiotensinérgicos. Com o intuito de descobrir por quanto tempo a microinjeção de L-NAME seria capaz de interferir no efeito hipotensor da Ang-(1-7), em outros grupos de animais, a microinjeção de Ang-(1-7) foi repetida aos 45 e 60 min após a microinjeção de L-NAME na CVLM em ratos SHAM e 2R1C. Ao final do experimento a salina foi microinjetada na CVLM e utilizada como controle. As microinjeções de Ang II ou Ang-(1-7) foram feitas na CVLM de ratos SHAM e 2R1C. Foram utilizados grupos diferentes de ratos para os estudos de microinjeção de L-NAME e VIT C. Essas etapas experimentais estão sumarizadas nas Figuras 4 e 5 abaixo:

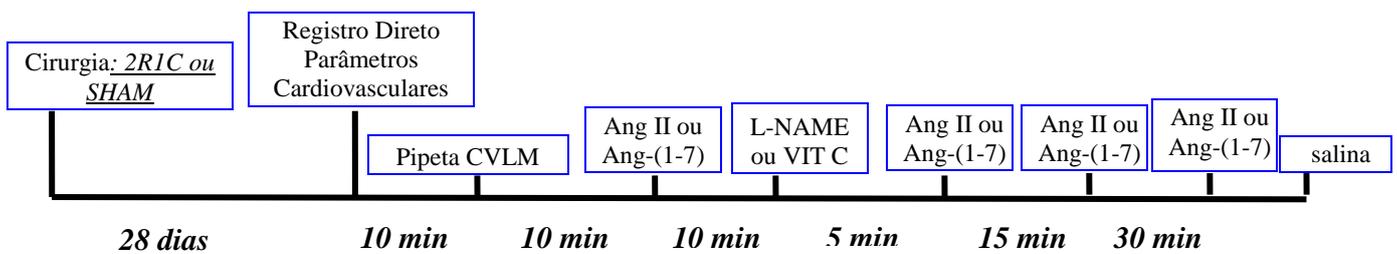


Figura 4: Protocolo experimental para a avaliação dos efeitos na PAM e FC produzidos pelas microinjeções de Ang II ou Ang-(1-7) antes e 5, 15 e 30 min após a microinjeção de L-NAME ou VIT C na CVLM em ratos SHAM e 2R1C.

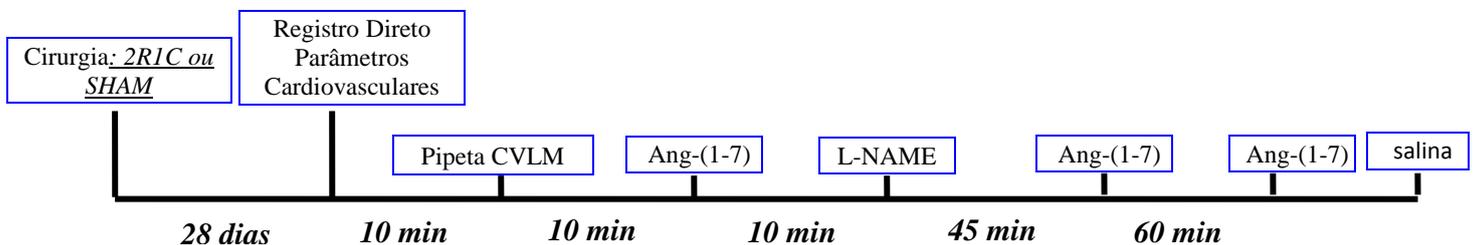


Figura 5: Protocolo experimental para a avaliação dos efeitos na PAM e FC produzidos pela microinjeção de Ang-(1-7) antes e 45 e 60 min após a microinjeção de L-NAME na CVLM em ratos SHAM e 2R1C.

Protocolo II: Avaliação do efeito produzido pela microinjeção de Bicuculina ou Ácido Quinurênico após as microinjeções de Ang II ou Ang-(1-7) na CVLM sobre a PAM e FC

Após o início do registro da PAM e FC, por cerca de dez min (estabilização), posicionou-se a micropipeta de vidro na CVLM. Esperou-se, mais dez min para realização das microinjeções de Ang II (40 pmol) ou Ang-(1-7) (40 pmol). Em seguida, microinjetou-se o antagonista de receptor GABAA, BIC (10 pmol), ou antagonista de receptores ionotrópicos do glutamato, KYN (5 nmol), na CVLM. Na intenção de verificar se a BIC ou o KYN na CVLM seria capaz de alterar os efeitos hipotensores da Ang II ou Ang-(1-7), aos 5, 15 e 30 min após a microinjeção da BIC ou do KYN, repetiu-se as microinjeções dos peptídeos angiotensinérgicos. Ao final do experimento a salina foi microinjetada na CVLM e utilizada como controle. As microinjeções de Ang II ou Ang-(1-7) foram feitas na CVLM de ratos SHAM e 2R1C. Foram utilizados grupos diferentes de ratos para os estudos de microinjeção de BIC e KYN. Essas etapas experimentais estão sumarizadas na Figura 6 abaixo:

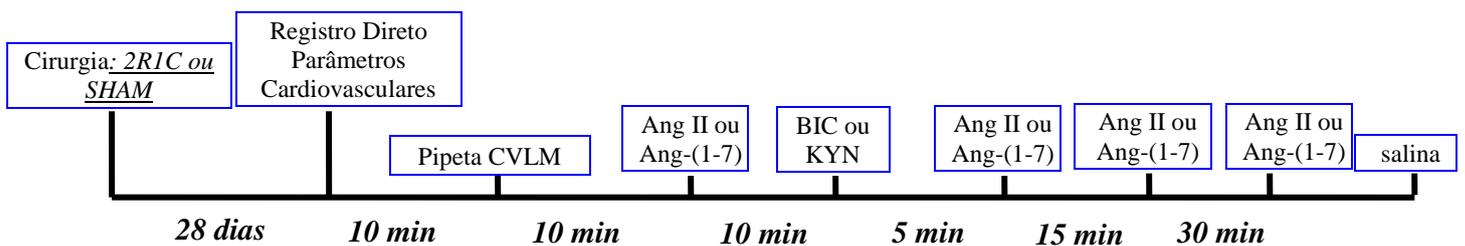


Figura 6: Protocolo experimental para a avaliação dos efeitos sobre a PAM e FC produzidos pelas microinjeções de Ang II ou Ang-(1-7) antes e 5, 15 e 30 min após a microinjeção de BIC ou KYN na CVLM em ratos SHAM e 2R1C.

4- RESULTADOS

4.1. Parâmetros para Caracterização da Hipertensão Renovascular 2R1C

4.1.1 Avaliação dos Parâmetros Cardiovasculares

A Figura 7 refere-se aos valores de PAM e FC basal de todos os grupos experimentais. A avaliação da PAM basal de ratos anestesiados mostrou, como esperado, que os ratos com hipertensão renovascular 2R1C apresentaram PAM basal ($142,4 \pm 3,5$ mmHg, $n=53$) superior

($p < 0,05$) comparado aos animais normotensos SHAM ($107,9 \pm 1,3$ mmHg, $n=53$) e não foram observadas alterações ($p > 0,05$) da FC nos animais 2R1C ($367,4 \pm 5,4$ bpm, $n=53$) em relação aos animais normotensos SHAM ($373,9 \pm 4,2$ bpm, $n=53$). Esses dados confirmam o sucesso da técnica de indução de hipertensão utilizada no presente estudo (Figura 7).

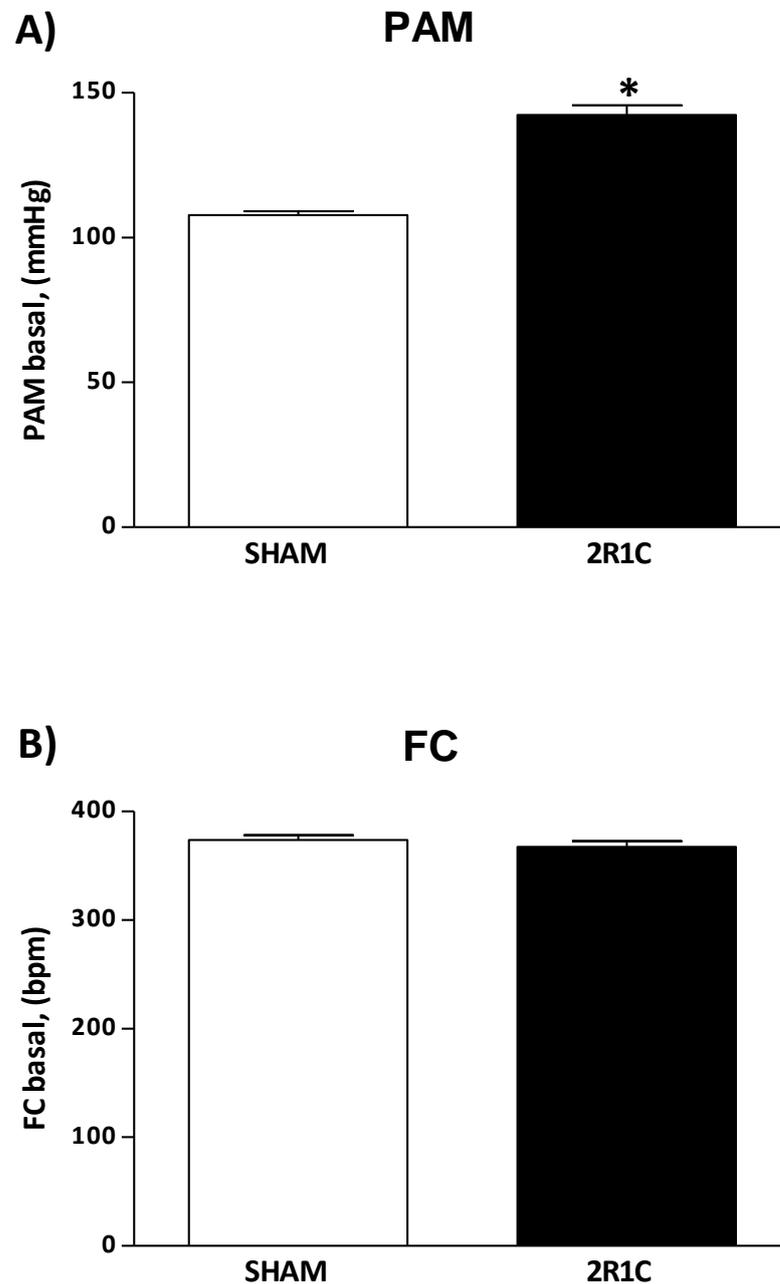


Figura 7: Avaliação da pressão arterial média basal (PAM basal, mmHg; painel A) e frequência cardíaca basal (FC basal, bpm; painel B) em ratos normotensos SHAM ($n=53$) e com hipertensão renovascular 2R1C ($n=53$). * $p < 0,05$ em comparação ao grupo SHAM (teste “t” de *Student* para observações não pareadas).

4.1.2 Avaliação do Peso Úmido dos Rins

Com a intenção de avaliar se a estenose da artéria renal (rim clipado) poderia ser um parâmetro para confirmar a hipertensão renovascular, foi avaliado o peso úmido dos rins dos animais SHAM e dos animais submetidos à cirurgia 2R1C.

A Figura 8 mostra que o peso úmido relativo dos rins esquerdos (clipados) dos animais 2R1C ($0,27 \pm 0,03g$, $n=10$) foi menor ($p<0,05$) do que o peso úmido relativo dos rins esquerdos dos animais SHAM ($0,35 \pm 0,01g$, $n=10$). Por outro lado, o peso úmido relativo dos rins direitos (contra laterais) dos animais com hipertensão renovascular 2R1C ($0,54 \pm 0,06g$, $n=10$) foi maior ($p<0,05$) do que o peso úmido relativo dos rins direitos dos animais SHAM ($0,36 \pm 0,01g$, $n=10$).

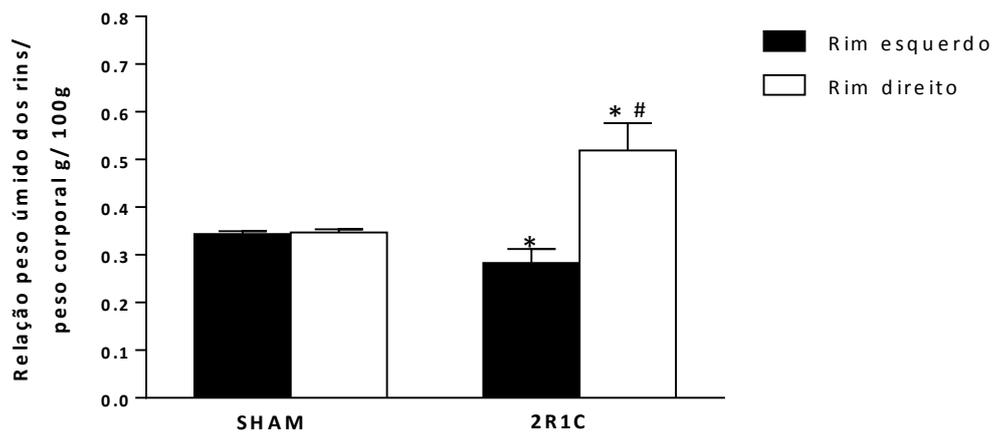


Figura 8: Peso úmido relativo (g/ 100g de peso corporal) dos rins esquerdo e direito dos ratos normotensos SHAM ($n=10$) e com hipertensão renovascular 2R1C ($n=10$). * $p<0,05$ em comparação aos respectivos rins dos ratos SHAM ($n=10$). # $p<0,05$ em relação ao respectivo rim esquerdo dos animais (teste “t” de *Student* para observações não pareadas).

4.1.3 Avaliação do Peso Úmido do Coração e Componentes Cardíacos

No presente estudo foi analisado o peso úmido relativo do coração, átrios e ventrículos direito e esquerdo com o intuito de avaliarmos o efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre o coração. A Figura 9 mostra que o peso dos átrios dos ratos 2R1C ($0,04 \pm 0,006$; $n=10$) não foi diferente ($p>0,05$) do peso dos átrios dos ratos normotensos SHAM ($0,03 \pm 0,005$; $n=10$). Da mesma forma, não foram encontradas diferenças ($p>0,05$) entre o peso úmido do ventrículo direito de animais 2R1C ($0,05 \pm 0,004$; $n=10$) e dos ratos SHAM ($0,06 \pm 0,005$; $n=10$).

Já o peso úmido relativo do coração dos animais com hipertensão 2R1C ($0,43 \pm 0,03$; $n=10$) foi maior ($p<0,05$) quando comparado ao peso úmido relativo do coração dos animais normotensos SHAM ($0,29 \pm 0,01$; $n=10$). Esse aumento foi causado possivelmente devido à hipertrofia do ventrículo esquerdo, que apresentou aumento ($p<0,05$) de peso úmido relativo em ratos com hipertensão renovascular 2R1C ($0,33 \pm 0,02$; $n=10$) comparado ao peso úmido relativo do ventrículo esquerdo dos ratos normotensos SHAM ($0,19 \pm 0,01$; $n=10$) (Figura 9).

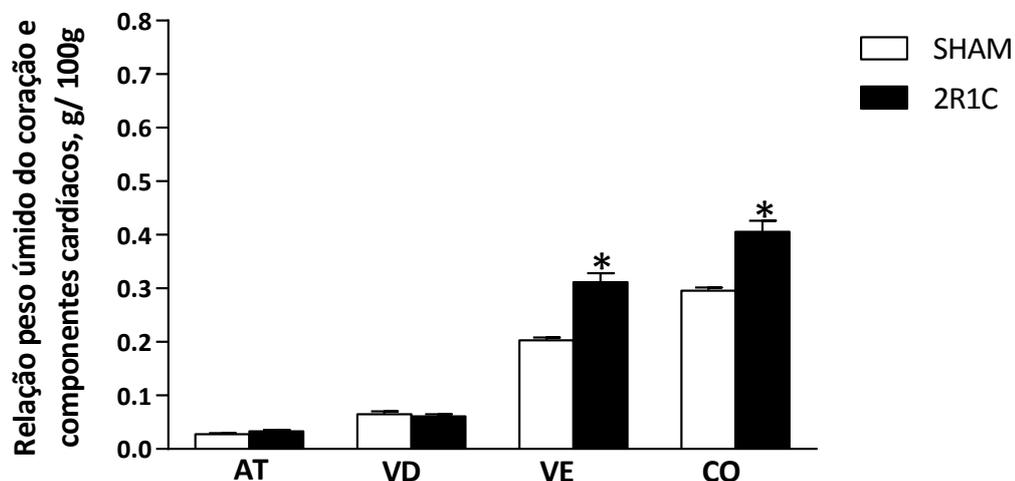


Figura 9: Avaliação do peso úmido relativo dos átrios (AT), ventrículo direito (VD), ventrículo esquerdo (VE) e coração (CO) de ratos com hipertensão renovascular 2R1C ($n=10$) e ratos normotensos SHAM ($n=10$). * $p<0,05$ em comparação aos respectivos pesos úmidos relativos dos animais SHAM (ANOVA seguido de *Newman-Keuls*).

4.2 Efeitos Produzidos pelas Microinjeções na CVLM de Angiotensinas, L-NAME, Vitamina C, Bicuculina e Ácido Quinurênico

Com o objetivo de avaliar o efeito da microinjeção de Ang II ou Ang-(1-7) na CVLM sobre a PAM e FC, a Ang II ou Ang-(1-7), foram microinjetadas na CVLM de ratos normotensos SHAM (n=10-11) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=7-13). A figura 10 mostra que a microinjeção de Ang-(1-7) na CVLM produziu queda ($p < 0,05$) na PAM tanto em animais SHAM ($-11,0 \pm 0,8$ mmHg, n=11 vs $-4,6 \pm 0,3$ mmHg, salina; n=22 - Figura 10A), quanto nos animais 2R1C ($-11,2 \pm 0,8$ mmHg, n=13 vs $-4,7 \pm 0,4$ mmHg, salina; n=26 - Figura 10A). Em adição, a Ang II também induziu uma queda ($p < 0,05$) na PAM em ratos SHAM ($-12,6 \pm 1,0$ mmHg, n=10 vs $-4,6 \pm 0,3$ mmHg, salina; n=22 - Figura 10A) similar ao observado nos ratos 2R1C ($-13,5 \pm 1,3$ mmHg, n=7 vs $-4,7 \pm 0,4$ mmHg, salina; n=26 - Figura 10A). O efeito hipotensor induzido pelos peptídeos angiotensinérgicos não foi acompanhado por alterações ($p > 0,05$) na FC em ambos os grupos de animais, SHAM ou 2R1C (Figura 10B).

Com o objetivo de avaliar o efeito da inibição do óxido nítrico (NO) ou da eliminação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) na CVLM, sobre a PAM e FC, o L-NAME (inibidor não específico das isoformas de NOS; 10 nmol) ou a VIT C (agente antioxidante ácido ascórbico; 10 nmol), foram microinjetados na CVLM de ratos normotensos SHAM (n=9-12) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=11-13). A figura 10 mostra que a microinjeção de L-NAME na CVLM produziu queda ($p < 0,05$) na PAM e na FC tanto em animais SHAM ($-14,6 \pm 1,6$ mmHg, n=12 vs $-4,6 \pm 0,3$ mmHg, salina; n=22 e $-31,8 \pm 6,2$ bpm, n=9 vs $-1,3 \pm 0,7$ mmHg, salina; n=22; respectivamente - Figura 10A e 10B) quanto nos animais 2R1C ($-17,3 \pm 2,2$ mmHg, n=13 vs $-4,7 \pm 0,4$ mmHg, salina; n=26 e $-24,5 \pm 4,2$ bpm, n=13 vs $-1,1 \pm 0,6$ mmHg, salina; n=27; respectivamente - Figura 10A e 10B). No entanto, a microinjeção de VIT C na CVLM produziu queda ($p < 0,05$) na PAM e na FC somente em animais 2R1C ($-18,2 \pm 2,2$ mmHg, n=11 vs $-4,7 \pm 0,4$ mmHg, salina; n=26 e $-40,5 \pm 7,3$ bpm, n=12 vs $-1,1 \pm 0,6$ mmHg, salina; n=27; respectivamente - Figura 10A e 10B).

Com o objetivo de avaliar o efeito da inibição de sinapses gabaérgicas inibitórias ou da inibição de sinapses glutamatérgicas excitatórias na CVLM sobre a PAM e FC, a BIC (antagonista de receptor GABAA; 10 pmol) ou o KYN (antagonista de receptores ionotrópicos do glutamato; 5 nmol) foram microinjetados na CVLM de ratos normotensos SHAM (n=11-16) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=10-13). Como mostra a figura 10,

a microinjeção de BIC na CVLM produziu queda ($p < 0,05$) na PAM e FC tanto em animais SHAM ($-14,3 \pm 1,6$ mmHg, $n=11$ vs $-4,6 \pm 0,3$ mmHg, salina; $n=22$ e $-39,6 \pm 6,2$ bpm, $n=11$ vs $-1,3 \pm 0,7$ mmHg, salina; $n=22$; respectivamente - Figura 10A e 10B) quanto nos animais 2R1C ($-20,6 \pm 2,6$ mmHg, $n=10$ vs $-4,7 \pm 0,4$ mmHg, salina; $n=26$ e $-41,1 \pm 3,0$ bpm, $n=12$ vs $-1,1 \pm 0,6$ mmHg, salina; $n=27$; respectivamente - Figura 10A e 10B). No entanto, o efeito hipotensor induzido pela microinjeção de BIC na CVLM foi maior ($p < 0,05$) nos animais 2R1C ($-20,6 \pm 2,6$ mmHg, $n=10$ - Figura 10A) comparado aos animais SHAM ($-14,3 \pm 1,6$ mmHg, $n=11$ - Figura 10A). Já a microinjeção de KYN na CVLM produziu aumento ($p < 0,05$) na PAM e na FC em animais SHAM ($11,2 \pm 1,3$ mmHg, $n=14$ vs $-4,6 \pm 0,3$ mmHg, salina; $n=22$ e $13,8 \pm 6,8$ bpm, $n=16$ vs $-1,3 \pm 0,7$ mmHg, salina; $n=22$; respectivamente - Figura 10A e 10B) e em animais 2R1C ($10,8 \pm 1,0$ mmHg, $n=13$ vs $-4,7 \pm 0,4$ mmHg, salina; $n=26$ e $15,1 \pm 5,3$ bpm, $n=12$ vs $-1,1 \pm 0,6$ mmHg, salina; $n=27$; respectivamente - Figura 10A e 10B).

Microinjeções na CVLM

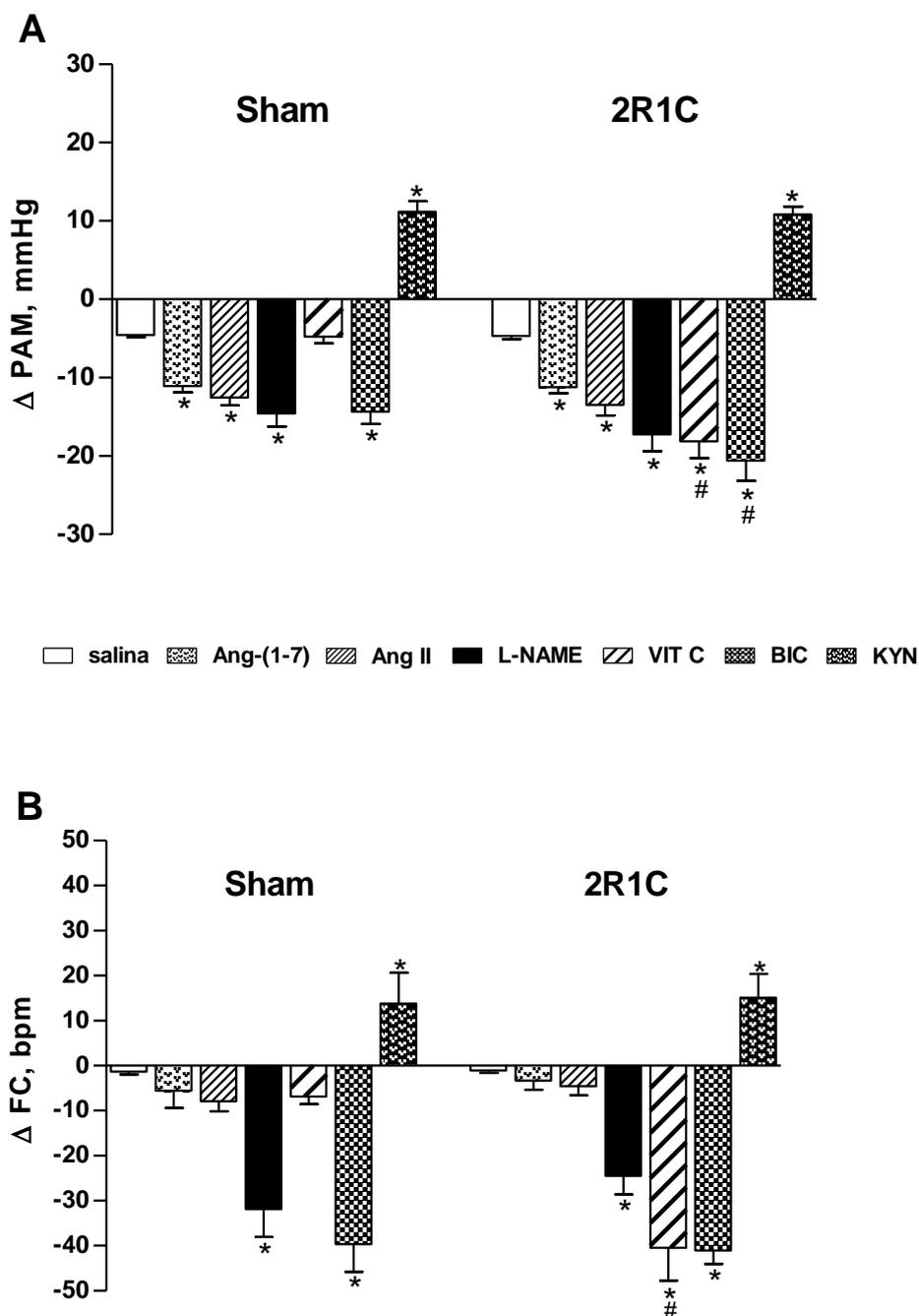


Figura 10: Alterações na PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) produzidas pelas microinjeções de Ang-(1-7) (40 pmol), Ang II (40 pmol), L-NAME (10 nmol), VIT C (10 nmol), BIC (10 pmol), KYN (5 nmol/ 50 nL) ou salina (100 nL) na CVLM em ratos normotensos SHAM (n=9-22) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=7-27). *P<0,05 em comparação à microinjeção de salina e #P<0,05 em comparação aos animais SHAM (ANOVA seguido de *Newman-Keuls*).

4.3 Efeitos Produzidos pelas Microinjeções na CVLM de Ang II ou Ang-(1-7) após as Microinjeções de L-NAME ou Vitamina C

Com o objetivo de analisar se o L-NAME na CVLM seria efetivo em alterar os efeitos hipotensores induzidos pela Ang II ou Ang-(1-7), avaliamos o efeito sobre a PAM e FC produzidos pelas microinjeções de Ang II (40 pmol) ou Ang-(1-7) (40 pmol) antes e 5, 15 e 30 min após a microinjeção de L-NAME (10 nmol) na CVLM de ratos SHAM (n=5-6) e de ratos com hipertensão renovascular 2R1C (n=7-8). Em adição, com o intuito de descobrir por quanto tempo a microinjeção de L-NAME foi capaz de interferir no efeito depressor induzido pela Ang-(1-7), em outros grupos de animais, a microinjeção de Ang-(1-7) foi repetida aos 45 e 60 min após a microinjeção de L-NAME na CVLM em ratos SHAM (n=6) e 2R1C (n=5-8).

Como mostra a Figura 11, a microinjeção de L-NAME na CVLM aumentou ($p < 0,05$) o efeito hipotensor da Ang-(1-7) por até 45 min em ratos SHAM ($-15,4 \pm 1,6$, após 45 min L-NAME vs $-9,8 \pm 0,6$ antes L-NAME, n=6 - Figura 11A). No entanto, a microinjeção de L-NAME na CVLM aumentou ($p < 0,05$) o efeito hipotensor induzido pela Ang-(1-7) por apenas 5 min em ratos 2R1C ($-16,1 \pm 2,9$, após 5 min L-NAME vs $-11,2 \pm 1,4$ antes L-NAME, n=7 - Figura 11A). Ao contrário, a microinjeção de L-NAME na CVLM não alterou ($p > 0,05$) o efeito hipotensor induzido pela Ang II por até 30 min em animais SHAM ($-15,8 \pm 2,4$, após 30 min do L-NAME vs $-14,5 \pm 1,3$ antes L-NAME, n=5 - Figura 11B) e 2R1C ($-18,7 \pm 2,1$, após 30 min do L-NAME vs $-18,0 \pm 1,0$, antes L-NAME, n=7 - Figura 11B). Não foram observadas alterações ($p > 0,05$) na FC em todos os grupos (dados não mostrados).

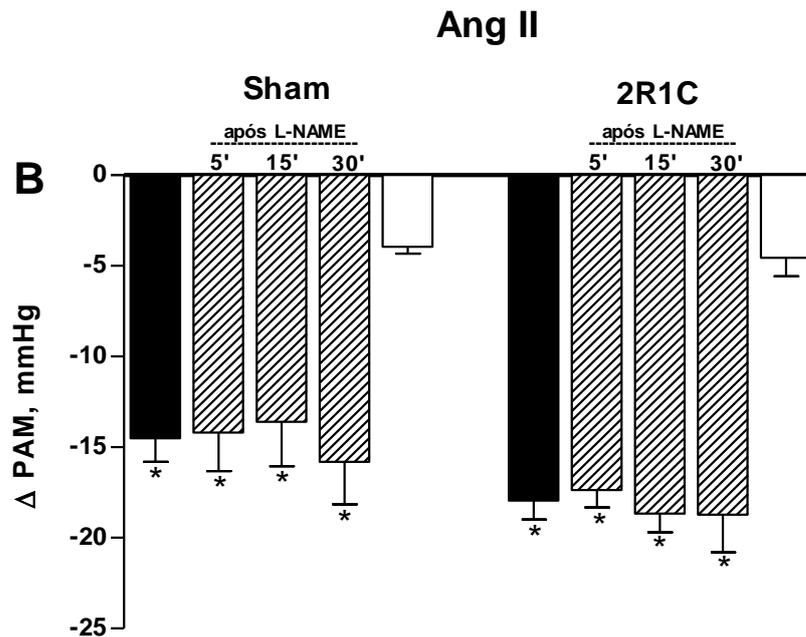
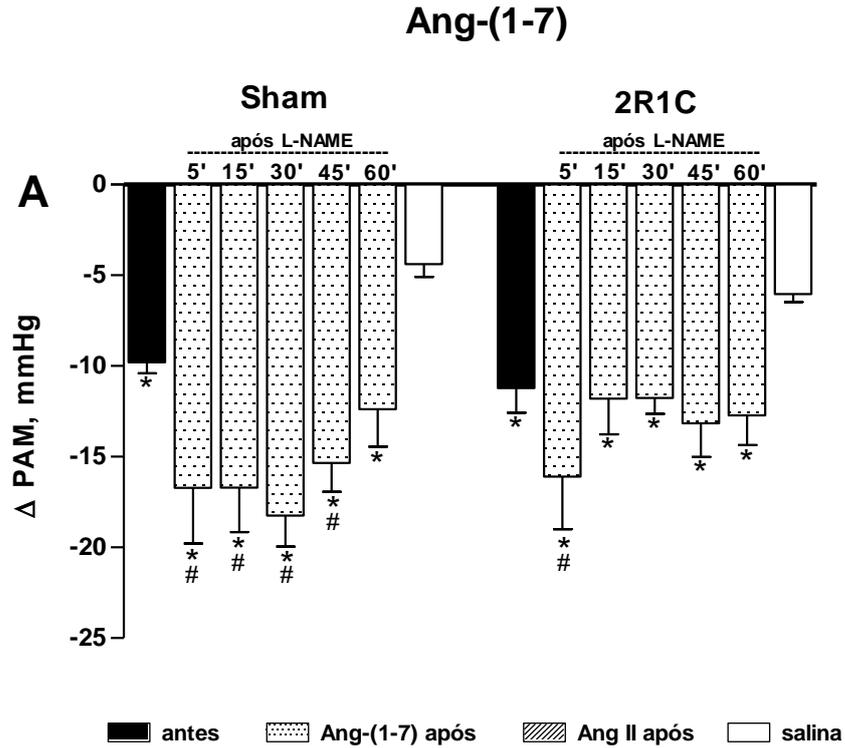


Figura 11: Alterações na PAM (Δ PAM, mmHg) produzidas pelas microinjeções de Ang-(1-7) (40 pmol; painel A) ou Ang II (40 pmol; painel B), antes e 5, 15, 30, 45 e 60 min após a microinjeção de L-NAME (10 nmol) na CVLM em ratos normotensos SHAM (n=5-6) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=5-8). *P<0,05 em comparação à microinjeção de salina (100 nL) e #P<0,05 em comparação à microinjeção de Ang-(1-7) antes do L-NAME (ANOVA seguido de *Newman-Keuls*).

Com o intuito de analisar se a VIT C na CVLM interferia com o efeito hipotensor induzido pela Ang II ou Ang-(1-7), avaliamos o efeito sobre a PAM e FC produzidos pelas microinjeções de Ang II (40 pmol) ou Ang-(1-7) (40 pmol) antes e 5, 15 e 30 min após a microinjeção de VIT C (10 nmol) na CVLM de ratos SHAM (n=5) e de ratos com hipertensão renovascular 2R1C (n=5-6).

Como mostra a figura 12, a microinjeção de VIT C na CVLM aboliu ($p < 0,05$) o efeito hipotensor da Ang II por até 15 min em ratos SHAM ($-4,8 \pm 2,0$, após 15 min VIT C vs $-10,6 \pm 0,9$, antes VIT C, n=5 - Figura 12B) e 2R1C ($-8,3 \pm 3,3$, após 15 min VIT C vs $-15,4 \pm 3,2$, antes VIT C, n=5 - Figura 12B). No entanto, a microinjeção de VIT C na CVLM não alterou ($p > 0,05$) o efeito hipotensor induzido pela Ang-(1-7) por até 30 min em animais SHAM ($-12,3 \pm 1,4$, após 30 min VIT C vs $-12,6 \pm 1,5$, antes VIT C, n=5 - Figura 12A) e 2R1C ($-12,3 \pm 0,8$, após 30 min VIT C vs $-11,2 \pm 0,7$, antes VIT C, n=6 - Figura 12A). Não foram observadas alterações ($p > 0,05$) na FC em todos os grupos (dados não mostrados).

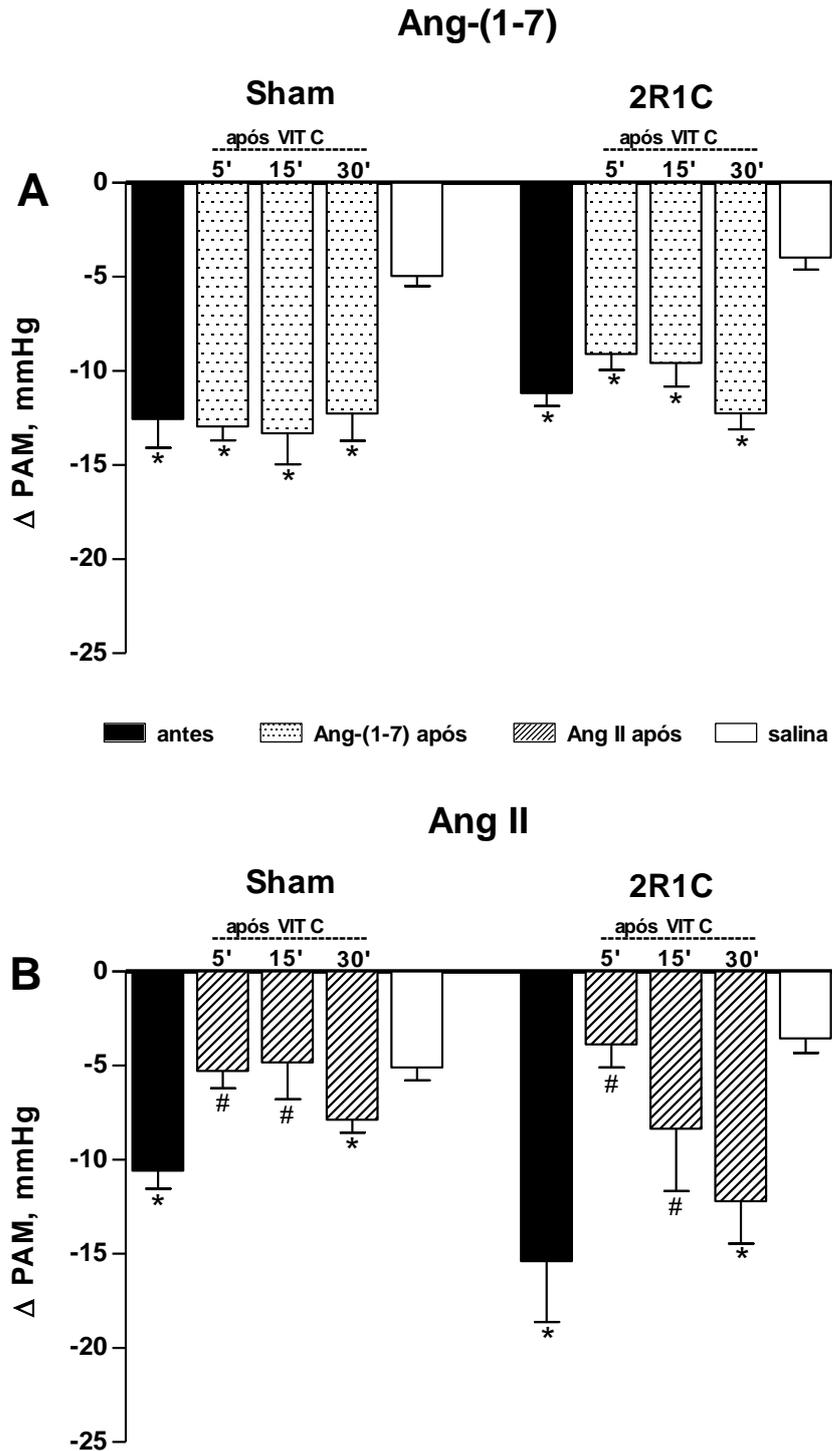


Figura 12: Alterações na PAM (Δ PAM, mmHg) produzidas pelas microinjeções de Ang-(1-7) (40 pmol; painel A) ou Ang II (40 pmol; painel B) antes e 5, 15 e 30 min após a microinjeção de VIT C (10 nmol) na CVLM em ratos normotensos SHAM (n=5) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=5-6). *p<0,05 em comparação à microinjeção de salina (100 nL) e #p<0,05 em comparação à microinjeção de Ang II antes da VIT C (ANOVA seguido de *Newman-Keuls*).

4.4 Efeitos Produzidos pelas Microinjeções na CVLM de Ang II ou Ang-(1-7) após as Microinjeções de Bicuculina ou Ácido Quinurênico

Com o objetivo de avaliar se a inibição de sinapses gabaérgicas inibitórias, produzida pela microinjeção de BIC, poderia alterar os efeitos hipotensores induzidos pela Ang II ou Ang-(1-7), avaliamos o efeito sobre a PAM e FC produzidos pelas microinjeções de Ang II (40 pmol) ou Ang-(1-7) (40 pmol) antes e 5, 15 e 30 min após a microinjeção de BIC (10 pmol) na CVLM de ratos SHAM (n=4-6) e de ratos com hipertensão renovascular 2R1C (n=4-5).

A figura 13 mostra que a microinjeção de BIC na CVLM diminuiu ($p < 0,05$) o efeito hipotensor da Ang-(1-7) por até 30 min em animais SHAM ($-10,3 \pm 1,7$, após 30 min da BIC vs $-18,7 \pm 1,3$ antes BIC, n=5 - Figura 13A). No entanto, a microinjeção de BIC na CVLM diminuiu ($p < 0,05$) o efeito hipotensor induzido pela Ang-(1-7) por apenas 5 min em animais 2R1C ($-5,6 \pm 3,3$, após 5 min da BIC vs $-15,7 \pm 1,6$ antes BIC, n=5 - Figura 13A). Em contrapartida, a microinjeção de BIC na CVLM não alterou ($p > 0,05$) o efeito hipotensor induzido pela Ang II por até 30 min em animais SHAM ($-9,0 \pm 1,8$, após 30 min da BIC vs $-9,3 \pm 1,4$, antes BIC, n=6 - Figura 13B) e 2R1C ($-9,7 \pm 1,3$, após 30 min da BIC vs $-14,2 \pm 2,2$, antes BIC, n=5 - Figura 13B). Não foram observadas alterações ($p > 0,05$) na FC em todos os grupos (dados não mostrados).

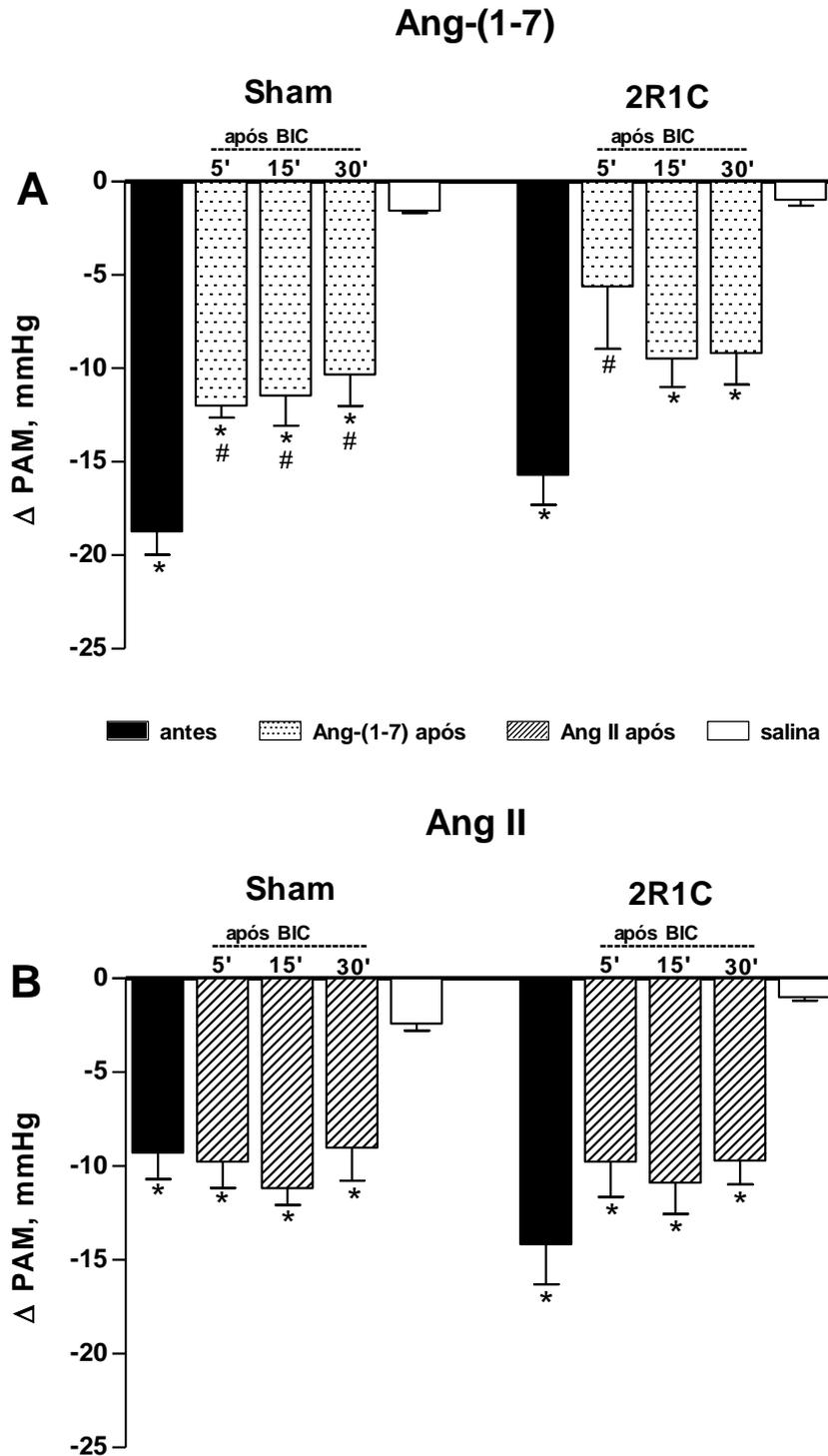


Figura 13: Alterações na PAM (Δ PAM, mmHg) produzidas pelas microinjeções de Ang-(1-7) (40 pmol; painel A) ou Ang II (40 pmol; painel B) antes e 5, 15 e 30 min após a microinjeção de BIC (10 pmol) na CVLM em ratos normotensos SHAM (n=4-6) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=4-5). *p<0,05 em comparação à microinjeção de salina (100 nL) e #p<0,05 em comparação à microinjeção de Ang-(1-7) antes da BIC (ANOVA seguido de *Newman-Keuls*).

Com o objetivo de analisar se a inibição de sinapses glutamatérgicas excitatórias, produzida pela microinjeção de KYN (5 nmol/ 50 nL), seria efetiva em alterar o efeito hipotensor induzido pela Ang II ou Ang-(1-7), avaliamos o efeito sobre a PAM e FC produzidos pelas microinjeções de Ang II (40 pmol) ou Ang-(1-7) (40 pmol) antes e 5, 15 e 30 min após a microinjeção de KYN na CVLM de ratos SHAM (n=4-9) e de ratos com hipertensão renovascular 2R1C (n=4-7).

Como mostra a figura 14, a microinjeção de KYN na CVLM aumentou ($p < 0,05$) o efeito hipotensor da Ang II por até 15 min tanto em animais SHAM ($-15,1 \pm 2,2$, após 15 min do KYN vs $-9,7 \pm 0,7$, antes KYN, n=9 - Figura 14B) quanto nos animais 2R1C ($-18,0 \pm 2,2$, após 15 min do KYN vs $-9,2 \pm 1,3$, antes KYN, n=5 - Figura 14B) em comparação às microinjeções de Ang II antes do KYN. No entanto, a microinjeção de KYN na CVLM não alterou ($p > 0,05$) o efeito hipotensor da Ang-(1-7) por até 30 min em animais SHAM ($-12,3 \pm 2,4$, após 30 min do KYN vs $-14,5 \pm 1,8$, antes KYN, n=5 - Figura 14A) e 2R1C ($-11,7 \pm 2,3$, após 30 min do KYN vs $-13,6 \pm 1,5$, antes KYN, n=5 - Figura 14A). Não foram observadas alterações ($p > 0,05$) na FC em todos os grupos (dados não mostrados).

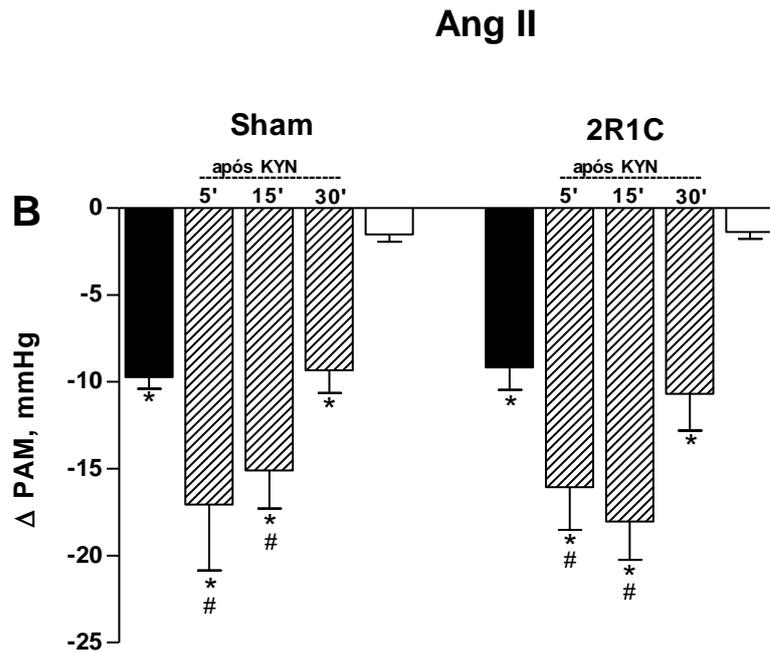
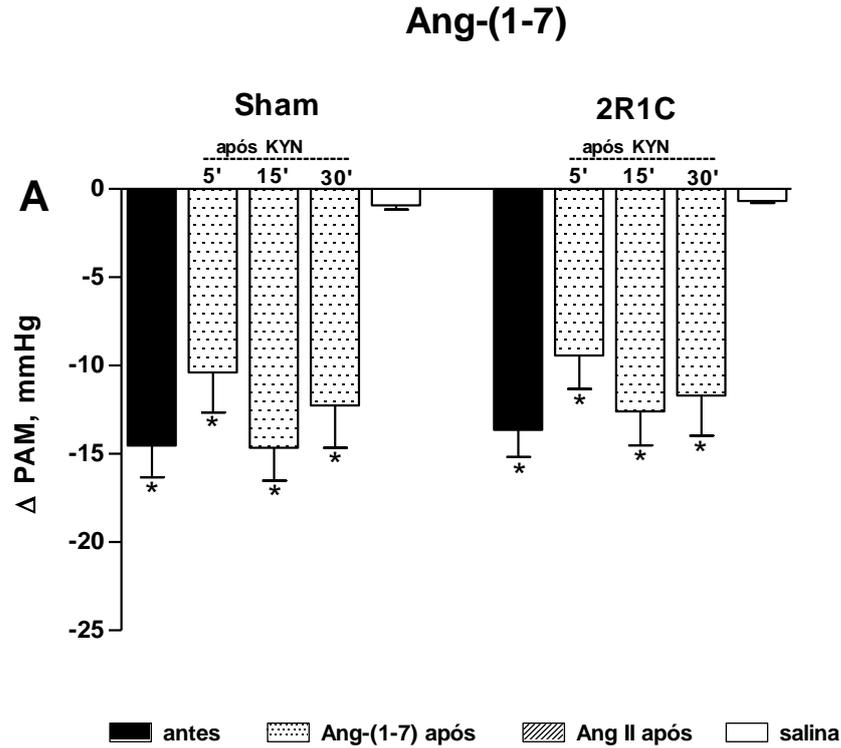


Figura 14: Alterações na PAM (Δ PAM, mmHg) produzidas pelas microinjeções de Ang-(1-7) (40 pmol; painel A) ou Ang II (40 pmol; painel B), antes e 5, 15 e 30 min após a microinjeção de KYN (5 nmol/ 50 nL) na CVLM em ratos normotensos SHAM (n=4-9) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=4-7). *p<0,05 em comparação à microinjeção de salina (100 nL) e #p<0,05 em comparação à microinjeção de Ang II antes do KYN (ANOVA seguido de *Newman-Keuls*).

4.5 Avaliação Histológica da CVLM

A Figura 15 apresenta uma fotografia e um esquema da superfície ventral do bulbo (painel A) ilustrando o posicionamento típico (antero-posterior e latero-lateral) das microinjeções na CVLM. O painel B mostra uma fotografia de um corte histológico típico da CVLM ilustrando a localização do centro das microinjeções na CVLM e a lesão provocada pela micropipeta de vidro e um diagrama de corte frontal do bulbo do atlas de Paxinos e Watson, 1986 [181].

A análise dos cortes histológicos dos animais deste estudo mostra que as microinjeções realizadas no presente estudo apresentam-se confinadas à porção ventral dos núcleos reticular lateral e estão correlacionadas aos esquemas 71 a 73 do Atlas de Paxinos e Watson, 1986 [181].

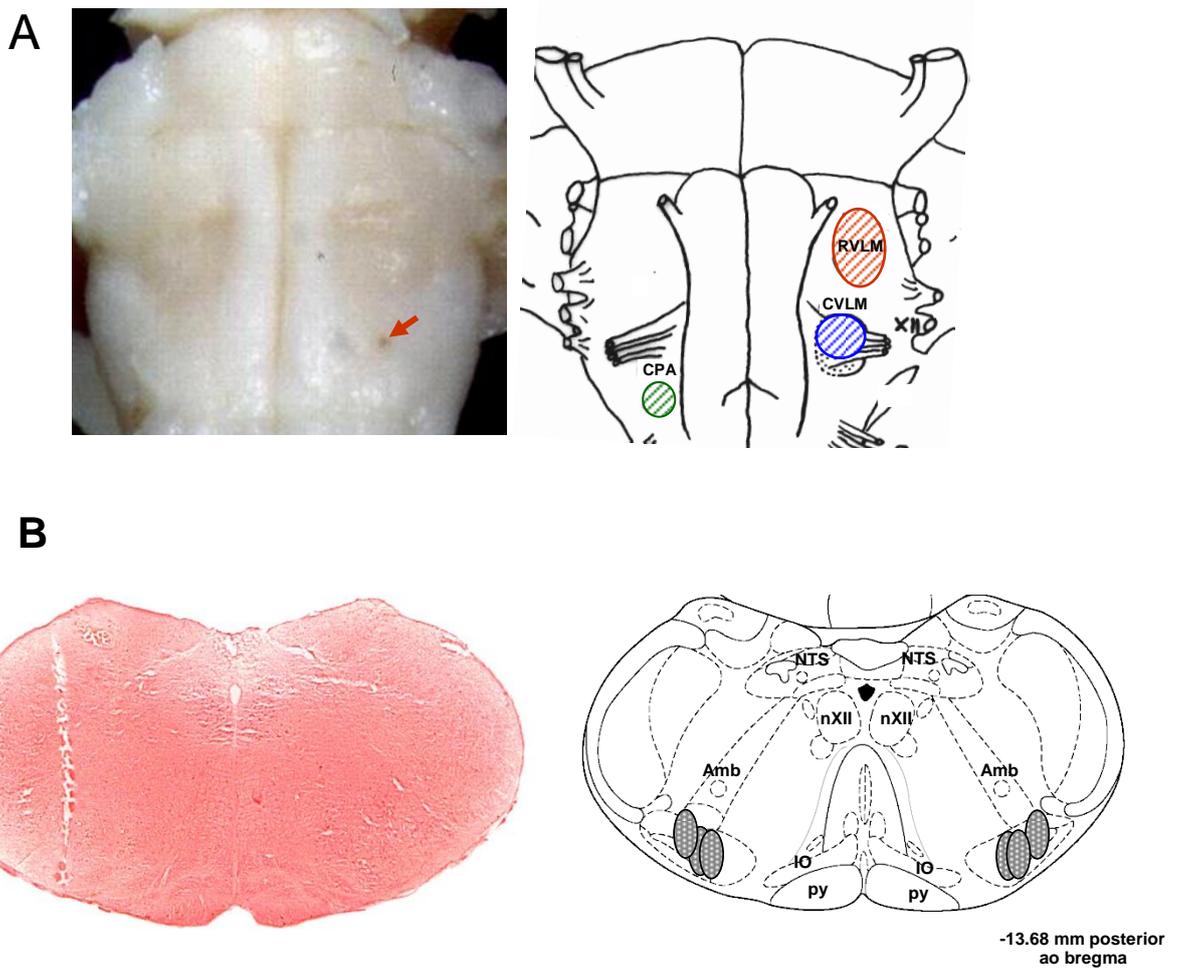


Figura 15: Painei **A:** fotografia da superfície ventral do bulbo ilustrando o posicionamento típico (seta vermelha) das microinjeções na CVLM. A direita da foto, diagrama da superfície ventral do bulbo ilustrando a localização das diferentes áreas de controle cardiovascular. Painei **B:** fotografia de um corte frontal do bulbo ilustrando o centro da microinjeção em um animal. A direita da foto, cópia do diagrama de corte frontal do bulbo extraído do Atlas de Paxinos e Watson (1986) [181], mostrando a localização do centro de todas as microinjeções do presente estudo (círculos cinza). Amb= núcleo ambíguo; IO= núcleo olivar inferior; NTS= núcleo do trato solitário; nXII= núcleo do hipoglosso; Py= trato piramidal.

5. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo foram que o L-NAME aumentou o efeito hipotensor da Ang-(1-7) por até 45 min em ratos SHAM e por apenas 5 min em ratos 2R1C e não alterou o efeito hipotensor induzido pela microinjeção de Ang II na CVLM de ratos SHAM e 2R1C. Em contraste, a VIT C aboliu por até 15 min o efeito hipotensor da Ang II na CVLM de ratos SHAM e 2R1C e não alterou o efeito hipotensor da Ang-(1-7) na CVLM de ambos os grupos. Além disso, a BIC diminuiu o efeito hipotensor da Ang-(1-7) por até 30 min em ratos SHAM e por apenas 5 min em ratos 2R1C e não alterou o efeito hipotensor induzido pela microinjeção de Ang II na CVLM de ratos SHAM e 2R1C. Já, o KYN aumentou o efeito hipotensor da Ang II por até 15 min em ratos SHAM e 2R1C e não alterou o efeito hipotensor da Ang-(1-7) na CVLM de ambos os grupos. Esses dados em conjunto, sugerem que os efeitos hipotensores similares induzidos pela Ang II e Ang-(1-7) na CVLM ocorrem através de diferentes espécies reativas (ER) e neurotransmissores aminoácidos, sendo que, $O_2^{\bullet-}$ e o glutamato participam predominantemente do efeito hipotensor induzido pela Ang II enquanto o NO e o GABA estão envolvidos predominantemente no efeito hipotensor induzido pela Ang-(1-7).

Alguns aspectos metodológicos devem ser considerados na interpretação de nossos resultados. Respostas cardiovasculares centrais podem ser modificadas pela anestesia. No entanto, o anestésico uretana, empregado no presente estudo, é muito utilizado em experimentos com animais, principalmente por causa de sua ação anestésica de longa duração e propriedades relaxantes sobre a musculatura esquelética [138]. A uretana produz depressão tanto das respostas pressoras como depressoras decorrentes da estimulação do sistema nervoso autônomo (SNA) [139]. Assim, o efeito anestésico da uretana não é seletivo, isto é, tanto as respostas pressoras como as depressoras são afetadas de maneira semelhante [140]. Em experimentos com animais acordados não ocorre essa atenuação das respostas do SNA induzidas pelos anestésicos. Porém, a implantação crônica de cânulas metálicas para realização de microinjeções em áreas do SNC, que ocorre em animais acordados, torna-se uma limitação, uma vez que provocam uma lesão mecânica mais extensa no tecido a ser estudado quando comparado ao reduzido dano produzido pelas micropipetas de vidro usadas em nossos experimentos [141, 142]. As micropipetas de vidro utilizadas no presente estudo possuem um diâmetro que variam entre 100 a 150 μm produzindo um dano mínimo às áreas circunvizinhas à microinjeção, o que conseqüentemente minimiza o efeito do extravasamento de drogas para outros núcleos centrais. Além disso, o estresse emocional imposto ao animal é

minimizado pela anestesia e isto diminui a influência de estímulos eferentes que interferem nos circuitos bulbares envolvidos no controle barorreflexo [46, 143].

Em adição, como descrito na metodologia, a inserção da micropipeta aconteceu através da posição dorsal do bulbo e atravessou todo o bulbo até a micropipeta alcançar a superfície ventral do bulbo (Figura 16). Dessa forma, as microinjeções do presente estudo, ocorreram nas projeções neuronais da CVLM para a área ventral do bulbo e não no próprio núcleo ou na projeção neuronal inibitória ascendente da CVLM para a RVLM. A CVLM possui duas populações distintas de interneurônios: gabaérgicos e glutamatérgicos. O balanço da atividade de interneurônios gabaérgicos e glutamatérgicos é responsável pelo grau da atividade do neurônio inibitório gabaérgico ascendente da CVLM para a RVLM, determinando assim, a atividade neuronal da RVLM e conseqüentemente a atividade do SNS (Figura 16).

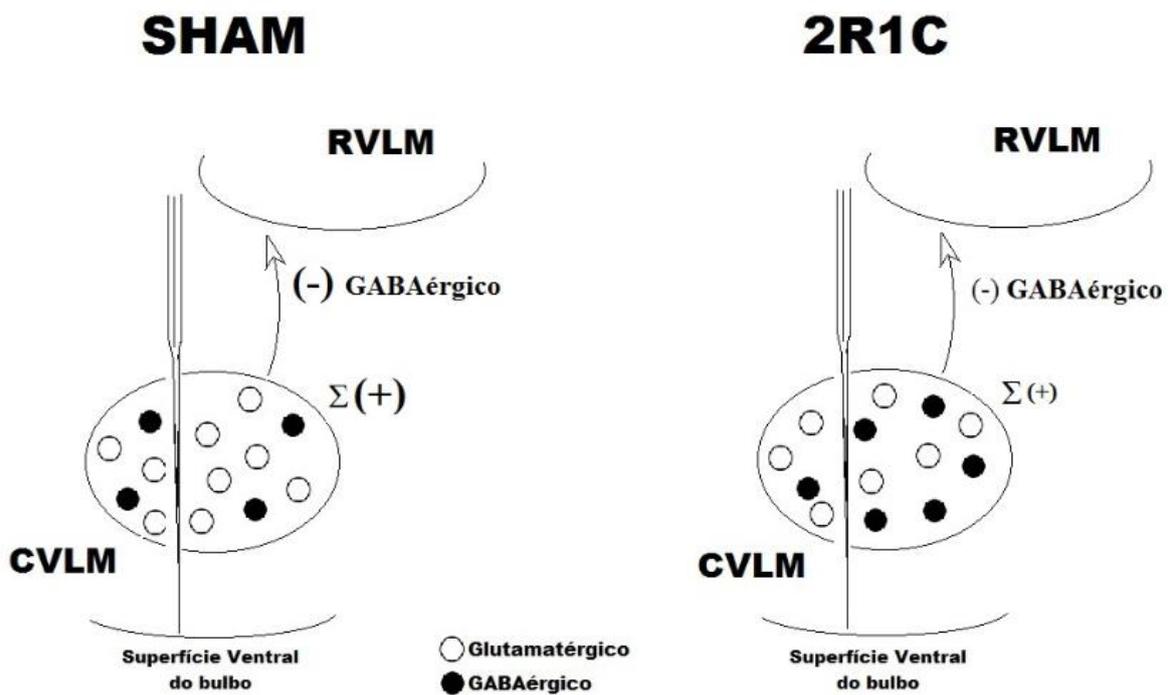


Figura 16: Esquema da localização das microinjeções realizadas na CVLM ilustrando que as microinjeções do presente estudo foram realizadas nas projeções ventrais dos interneurônios glutamatérgicos (○ círculo branco) e gabaérgicos (● círculo preto) da CVLM. Os efeitos cardiovasculares induzidos pelas microinjeções seria o resultado do somatório (Σ) da atuação dos interneurônios (○ glutamatérgicos) e dos interneurônios (● gabaérgicos) sobre a via gabaérgica inibitória ascendente para a RVLM em ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C.

A importância clínica de se estudar a hipertensão é devido a essa patologia estar diretamente relacionada ao surgimento de doenças cerebrovasculares, doença isquêmica do miocárdio, falência renal e cardíaca [182]. Estima-se que exista cerca de um bilhão de indivíduos hipertensos no mundo, sendo a hipertensão arterial responsável por aproximadamente 7,1 milhões de óbitos por ano [144]. A elevada atividade simpática cardíaca que ocorre nessa doença, ainda torna os pacientes mais susceptíveis à arritmia ventricular e morte súbita, o que piora ainda mais o prognóstico dos mesmos [145]. Além disso, a hipertensão arterial pode ser o resultado de uma hiperatividade de neurônios da RVLM [62, 65] e/ou uma inabilidade da CVLM em limitar a elevada atividade dos neurônios da RVLM [60, 66]. Estas considerações justificam os estudos que são realizados com o objetivo de melhor elucidar o desenvolvimento e a manutenção dessa patologia, além de nos permitir entender os mecanismos centrais que regulam a PA.

A mensuração da PAM após quatro semanas da cirurgia 2R1C mostrou, como esperado, que os ratos hipertensos 2R1C apresentaram aumento significativo da PAM e não apresentaram alterações significativas em relação à FC comparado aos ratos SHAM. Esses resultados estão de acordo com estudos da literatura [146-149] e com dados anteriores de nosso laboratório [61, 112] que utilizaram o mesmo modelo animal de hipertensão.

Durante a fase inicial da hipertensão 2R1C, aproximadamente uma a quatro semanas após a cirurgia, o desenvolvimento da hipertensão é dependente da atividade da renina e dos níveis elevados de Ang II plasmáticos [148, 149]. As elevações dos níveis plasmáticos de renina e Ang II no modelo de hipertensão 2R1C são produzidas pelo clipe de prata colocado na artéria renal, que promove uma redução do fluxo sanguíneo para o rim clipado, um aumento do fluxo de sangue para o rim não clipado e consequentemente ativação do SRA periférico [78] e central [149]. Na fase crônica da hipertensão 2R1C, a partir da quarta semana após a cirurgia, as concentrações plasmáticas da renina e os níveis de Ang II se normalizam apesar da manutenção dos níveis elevados de PA. Nesta fase, o responsável pela manutenção da hipertensão é o aumento dos componentes do SRA em tecidos periféricos [148, 150, 151] e centrais como bulbo e hipotálamo [149], o que fortalece o conceito de SRA tecidual e tem sido utilizado para explicar a efetividade do bloqueio agudo do SRA por drogas na fase crônica da hipertensão 2R1C [152].

A avaliação do peso dos rins (clipados e não clipados) em nosso estudo foi usada como um parâmetro para caracterização do modelo de hipertensão 2R1C. A redução observada do peso do rim clipado (rim esquerdo) foi devido à estenose da artéria renal e consequentemente, diminuição do fluxo sanguíneo para esse rim. Por outro lado, o rim contra

lateral (rim direito, não clipado) dos animais 2R1C apresentou uma elevação de peso, possivelmente devido a uma hiperfunção compensatória [77]. Este resultado está de acordo com estudos anteriores realizados em nosso laboratório [61, 112, 153]. Os animais do nosso estudo que apresentaram comprometimento estrutural do órgão, ou seja, pontos visíveis de isquemia foram descartados, pois uma intensa constrição da artéria renal pode levar a um comprometimento funcional do rim, não característico do modelo de hipertensão 2R1C.

A avaliação do peso do coração, em nosso estudo, mostrou que houve um aumento do peso relativo desse órgão dos animais 2R1C comparado ao grupo SHAM. Esse aumento de peso do miocárdio foi atribuído à hipertrofia ventricular esquerda ocorrida nos animais 2R1C, visto que não foram observadas diferenças significativas de peso relativo do ventrículo direito e átrios dos ratos 2R1C comparado aos animais SHAM. Esses dados estão de acordo com estudos da literatura que mostraram que a hipertrofia cardíaca pode acontecer como uma resposta adaptativa fisiológica (atividade física) ou patológica (doenças valvulares, hipertensão ou obesidade) ao aumento do trabalho cardíaco [154].

No presente estudo, mostramos que a microinjeção do L-NAME (inibidor da síntese de NO) na CVLM produziu queda na PA e bradicardia em animais SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C. Esse dado sugere que a inibição dos níveis basais de NO na CVLM, induzida pela microinjeção de L-NAME, possa estar causando um aumento da atividade inibitória da CVLM sobre a RVLM e conseqüentemente, uma redução na atividade do SNS. Esses dados estão de acordo com estudo recente de nosso laboratório [8] que mostrou que a microinjeção de L-NAME na CVLM produz efeito depressor similar ao encontrado no presente estudo. Outros trabalhos da literatura [37, 134, 155] também mostraram que as microinjeções de drogas inibidoras da produção do NO na CVLM apresentaram efeitos depressores. De fato, Shapoval e colaboradores (1991) [37] mostraram que a microinjeção de L-NMMA, um inibidor não seletivo das isoformas de NOS, na CVLM em gatos anestesiados produziu diminuição na PA e na atividade do SNS. Resultados semelhantes foram encontrados por Yang e colaboradores (1996) e Lage e colaboradores (1999) [134, 155] que mostraram que as microinjeções do L-NAME e L-NNA (inibidores não seletivos das isoformas de NOS) na CVLM produziram hipotensão em ratos normotensos. Esses dados em conjunto, sugerem que o NO na CVLM reduza a inibição da CVLM sobre a RVLM, levando conseqüentemente, a um aumento da PA.

Nossos dados também mostraram que a microinjeção do agente antioxidante ácido ascórbico, VIT C, causou efeito hipotensor e bradicárdico somente em animais com hipertensão renovascular 2R1C e não em animais normotensos SHAM. Esses dados estão de

acordo com dados anteriores de nosso laboratório [8] e com os estudos da literatura [13, 14] que mostraram que a administração central de drogas antioxidantes, como VIT C ou tempol (mimético da superóxido dismutase – SOD), diminui a PA, a FC e a atividade nervosa simpática renal (ANSR) em ratos 2R1C e não em animais normotensos SHAM. Esses nossos dados sugerem que o $O_2^{\bullet-}$ na CVLM reduza a atividade inibitória da CVLM sobre a RVLM, aumenta a atividade da RVLM, levando conseqüentemente, a um aumento da PA. Nossos resultados ainda mostram que ocorre na CVLM um aumento do estresse oxidativo durante estados hipertensivos e sugerem que o estresse oxidativo é um mecanismo adicional importante para o desenvolvimento e/ou manutenção dos altos níveis pressóricos em animais 2R1C.

De fato, estudos da literatura [7, 13] mostraram que durante a hipertensão ocorre um aumento do estresse oxidativo em regiões centrais do controle cardiovascular como a RVLM e PVN. Elevados níveis de ER como o $O_2^{\bullet-}$ pode alterar a biodisponibilidade do NO, pelo fato, do $O_2^{\bullet-}$ reagir rapidamente com o NO levando a produção de outro radical livre o peroxinitrito [114, 156]. A elevação dos níveis de $O_2^{\bullet-}$ em áreas centrais relacionadas ao controle cardiovascular como a RVLM [7], PVN [13] e a CVLM [8] tem sido descrita com um dos fatores responsáveis pelo aumento da atividade do SNS em modelos experimentais de hipertensão [7, 114].

No presente estudo, mostramos que a microinjeção de Ang II e Ang-(1-7) na CVLM produziram efeitos depressores similares em animais SHAM e 2R1C quando comparado à microinjeção de salina na CVLM. Esses dados estão de acordo com os estudos que mostraram que os efeitos depressores similares entre a Ang II e Ang-(1-7) quando microinjetadas na CVLM em ratos normotensos [115-117] e em ratos com hipertensão renovascular 2R1C [61, 112]. No entanto, Alzamora e colaboradores (2002) [116] mostraram que apesar da Ang-(1-7) e Ang II na CVLM induzirem efeitos hipotensores similares em ratos normotensos, esses peptídeos angiotensinérgicos atuam através de mecanismos periféricos diferentes, sendo que a Ang-(1-7) age preferencialmente através da via nitroxidérgica, enquanto a Ang II atua através da via adrenérgica.

Adicionalmente, foi mostrado no presente estudo que os efeitos dos peptídeos angiotensinérgicos ocorrem através de mecanismos centrais distintos envolvendo diferentes ER e neurotransmissores aminoácidos. Assim, a microinjeção de L-NAME aumentou o efeito depressor induzido pela Ang-(1-7), mas não alterou o efeito depressor induzido pela microinjeção de Ang II na CVLM. Esse resultado mostra que o NO participa predominantemente do efeito depressor induzido pela Ang-(1-7) tanto em animais SHAM

como em animais 2R1C. Esses dados estão de acordo com os estudos da literatura que mostraram que a Ang-(1-7) é capaz de estimular a produção de NO no endotélio vascular [157-160], no hipotálamo [161, 162], no ventrículo lateral direito [124] e na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (dl-PAG) [163].

Heitsch e colaboradores (2001) [157] mostraram que a Ang-(1-7) estimula a produção de NO em células endoteliais aórticas bovinas (BAECs). Essa liberação de NO induzida pela Ang-(1-7) foi atenuada em aproximadamente 60% quando as BAECs foram pré-incubadas por 20 min com L-NAME (inibidor da NOS). Em adição, Pinheiro e colaboradores (2004) [158] mostraram que a Ang-(1-7) aumentou a liberação de NO em células ovarianas de hamsters chineses transfectadas com receptor Mas (CHO-Mas). Esse efeito foi bloqueado pelo antagonista de receptor Mas, A779, mas não pelos antagonistas de receptores AT₁ e AT₂ da Ang II. Esses resultados em conjunto mostram que a Ang-(1-7) é capaz de ativar a NOS endotelial via receptor Mas.

Gironacci e colaboradores (2000) [161] avaliaram o papel do NO como um possível mediador do efeito da Ang-(1-7) na liberação de norepinefrina (NE) neuronal evocada pelo K⁺ em preparações do hipotálamo. Para tal propósito, investigaram o efeito da Ang-(1-7) na presença de L-NAME, um inibidor não específico da NOS, como já descrito. Nesse estudo [161], foi observado que a Ang-(1-7) (100 nmol) reduziu a liberação de NE induzida pelo K⁺ e que este efeito foi prevenido pelo L-NAME (10 µmol/L) e restaurado pela L-arginina (precursor do NO; 100 µmol/L), o que sugere que a Ang-(1-7) apresenta um efeito inibitório sobre a neurotransmissão noradrenérgica do hipotálamo por um mecanismo dependente de NO.

Sampaio e colaboradores (2007) [159] mostraram em CHO-Mas e em células endoteliais aórticas humanas (HAEC) que a Ang-(1-7) estimula a produção de NO através da fosforilação e desfosforilação dos dois sítios regulatórios da eNOS: excitatório (Ser1177) e inibitório (Thr495). A dupla fosforilação de Ser1177 e Thr495 determina o estado ativo da eNOS em células endoteliais. Em condições basais, o sítio inibitório (Thr495) está normalmente fosforilado e o sítio excitatório (Ser1177) está fracamente fosforilado. Nesse estudo [159], os autores relataram que a Ang-(1-7) (10⁻⁷ mol/L) estimulou a ativação da eNOS promovendo a fosforilação do sítio excitatório Ser1177 e a desfosforilação do sítio inibitório Thr485 dessa enzima. Em adição, foi observado que a Ang-(1-7) aumentou a produção de NO e a fosforilação da proteína quinase B (Akt). Esses efeitos foram abolidos pelo A779 (10⁻⁶ mol/L). Além disso, os autores mostraram que o inibidor seletivo da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (wortmanina; 10⁻⁵ mol/L) bloqueou a fosforilação do sítio

Ser1177 induzida pela Ang-(1-7) em células CHO-Mas e HAEC, sugerindo que a via Akt participa na ativação da eNOS estimulada pela Ang-(1-7). Esses dados demonstram que Ang-(1-7) via receptor Mas estimula a ativação da eNOS e a produção de NO em células endoteliais através da via dependente-Akt.

Em adição, Zhang e colaboradores (2008) [124] mostraram que a administração de Ang-(1-7) no ventrículo lateral direito em doses variadas (100 pmol/ 0,5µl e 10 nmol/ 0,5µl) estimula a produção de NO e a superexpressão de eNOS em tecidos isquêmicos resultantes da isquemia/refusão cerebral focal em ratos.

Gomes e colaboradores (2010) [160] mostraram que miócitos cardíacos de rato neonatal (NRCMs) tratados com Ang II (100 nmol/L por 36 horas) apresentaram aumento da área da superfície celular enquanto que o tratamento dessas células com Ang-(1-7) (100 nmol/L) reduziu a hipertrofia induzida pela Ang II. O A779 reverteu os efeitos anti-hipertrofos da Ang-(1-7) em células tratadas com Ang II. Para investigar se os efeitos da Ang-(1-7) sobre o remodelamento celular eram relacionados a alterações no NO, os autores quantificaram os níveis basais de NO em NRCMs marcadas com 4-amino-5-metilamino-2,7-diclorofluoresceína, um marcador fluorescente para NO. Observou-se uma maior produção de NO em NRCMs tratadas com Ang-(1-7) por 36 horas. Em adição, os efeitos anti-hipertrofos da Ang-(1-7) sobre cardiomiócitos tratados com Ang II foram prevenidos pelo L-NAME (1 µmol/L) e pelo inibidor da guanilato ciclase (*1H-1,2,4-oxadiazolo-4,2-aquinoxalin-1-one*, ODQ, 50 µmol/L) sugerindo que esses efeitos são mediados pelo NO/cGMP. Esses resultados indicam um importante papel do NO/cGMP como um mediador dos efeitos benéficos da Ang-(1-7) em células cardíacas.

Cerrato e colaboradores (2012) [162] mostraram em preparação isolada de hipotálamo que a Ang-(1-7) (1.0 µmol/L) diminuiu a atividade da NOS em ratos SHR no estado pré-hipertensivo (3 a 4 semanas), aumentou a atividade da NOS em ratos SHR com hipertensão estabelecida (13 a 14 semanas) e não alterou a atividade da NOS em ratos jovens ou adultos Wistar-Kyoto (WKY). Em adição, ainda nesse estudo [162], a Ang-(1-7) (50 ng) foi administrada na área hipotalâmica anterior, a PAM foi registrada e após 30, 60 e 180 min a expressão da nNOS foi avaliada por *Western-blot* em ratos WKY e SHR com 13 a 14 semanas de idade. Observou-se que a Ang-(1-7) diminuiu a PAM após 10 min da injeção somente em ratos SHR e esse efeito foi abolido pela pré-administração de L-NAME (10 µg), sugerindo que a geração de NO está envolvida no efeito hipotensor induzido pela Ang-(1-7). A expressão da nNOS aumentou após 180 min da injeção intrahipotalâmica em ratos WKY e

SHR. Esses resultados sugerem que a Ang-(1-7) aumenta a NOS hipotalâmica no estado hipertensivo como um mecanismo protetor e compensatório para controlar a hipertensão.

Xing e colaboradores (2012) [163] mostraram através do registro da atividade de disparo espontânea de neurônios da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (dl-PAG) realizado pela técnica *whole cell patch-clamp* que a Ang-(1-7) (100 nM) atenuou a taxa de disparo desses neurônios e que este efeito foi abolido na presença do antagonista do receptor Mas (A779, 10 µg) ou na presença de S-metil-L-tiocitrulina (SMTC, 1 µM), um inibidor da nNOS. Esses dados sugerem que a Ang-(1-7) exerce um papel inibitório na dl-PAG através de uma via de sinalização dependente do receptor Mas e do NO.

Esses dados da literatura juntamente com os do presente estudo sugerem que a Ang-(1-7) em miócitos cardíacos, células CHO-Mas, HAEC e em áreas centrais como hipotálamo e dl-PAG apresenta efeito inibitório dependente de NO. Nossos dados estão de acordo com esses achados, visto que a Ang-(1-7) na CVLM através do NO parece aumentar a atividade inibitória da via gabaérgica ascendente da CVLM para a RVLM. Além disso, nossos dados mostraram que em ratos hipertensos a inibição da CVLM sobre a RVLM deva ocorrer em menor extensão, uma vez que o L-NAME alterou o efeito hipotensor induzido pela Ang-(1-7) na CVLM por apenas 5 min em ratos 2R1C e por até 45 min em animais SHAM, sugerindo uma menor efetividade do bloqueio da produção de NO pelo L-NAME em animais com hipertensão 2R1C e portanto que a dose do L-NAME deveria ser maior em ratos 2R1C.

Esses resultados estão de acordo com outro estudo de nosso laboratório [183] que mostrou que o tempo de duração da bradicardia induzida pela microinjeção de L-NAME foi inferior em animais 2R1C (11,1 min ± 1,4; n=6) comparado aos animais SHAM (22,5 min ± 3,1; n=6). Similarmente, estudos prévios da literatura [164, 165] mostraram que a CVLM de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e com hipertensão renovascular 2R1C apresenta altos níveis de expressão da nNOS. Logo, o menor tempo de duração do efeito do L-NAME em animais 2R1C pode ter ocorrido devido aos altos níveis de NO presentes na CVLM durante a hipertensão, indicando a necessidade de se aumentar a concentração do L-NAME microinjetado na CVLM de ratos 2R1C para se ter uma inibição similar a ocorrida nos ratos SHAM.

Ao contrário de nossos resultados obtidos com L-NAME, a microinjeção de VIT C na CVLM aboliu o efeito depressor da Ang II por até 15 min tanto em ratos 2R1C como ratos SHAM e não alterou os efeitos hipotensores da Ang-(1-7) na CVLM em ratos 2R1C e SHAM. Esses dados estão de acordo com dados recentes da literatura que mostraram que a

resposta cardiovascular induzida pela Ang II foi abolida após aplicação de capturadores de $O_2^{\bullet-}$ ou miméticos da SOD no SNC [166], RVLM [7, 16], PVN [13] e NTS [6].

Estudos [118, 167] mostraram que a Ang II atuando através de seus receptores AT_1 , ativa a enzima NADPH oxidase resultando na produção de $O_2^{\bullet-}$, tanto periféricamente [118] como no SNC [120, 167]. De fato, a infusão intracerebroventricular (ICV) de Apocinina (inibidor da NADPH oxidase) e Tempol (mimético da SOD), antagonizaram o efeito pressor induzido pela Ang II no ventrículo cerebral lateral direito [167]. Em adição, Zimmerman e colaboradores (2002) [119] mostraram que a superexpressão da superóxido dismutase mitocondrial dependente de manganês (Mn-SOD) ou da superóxido dismutase citoplasmática dependente de cobre e zinco (Cu/Zn-SOD) via transferência de genes mediada por adenovírus ICV aboliram a resposta pressora induzida pela Ang II administrada intracerebroventricularmente em camundongos. Esse estudo [119] ainda mostrou que a Ang II estimulou a produção de $O_2^{\bullet-}$ em culturas de células da lâmina terminal, uma região que abrange o tecido circundante do terceiro ventrículo e inclui o órgão subfornical (SFO) e outras áreas ricas em AT_1 [168], sendo esse efeito abolido pelo antagonista de receptor AT_1 da Ang II (Losartan) ou pela Mn-SOD. Além disso, o referido grupo de pesquisadores também mostraram que a injeção ICV de Cu/ZnSOD preveniu a hipertensão induzida pela infusão sistêmica crônica de Ang II [169]. Esses dados indicam que o $O_2^{\bullet-}$ intracelular é uma importante molécula de sinalização das respostas fisiológicas da Ang II central.

Hirroka e colaboradores (2003) [170] mostraram que a infusão intra-arterial de Ang II (5 ng/ min) atenuou a vasodilatação induzida pela acetilcolina do antebraço humano *in vivo*, e que a co-infusão de VIT C (20 mg/ min) aboliu essa atenuação. Nesse estudo, a VIT C foi usada como um antioxidante para reduzir os efeitos da produção de $O_2^{\bullet-}$. Assim, esses resultados sugerem que a Ang II provavelmente atenua a vasodilatação dependente do endotélio via aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ em vasos do antebraço humano *in vivo*.

Chan e colaboradores (2005) [120] mostraram que a microinjeção de Ang II (50 pmol) na RVLM resultou em uma fosforilação dependente do receptor AT_1 da proteína quinase ativada por mitógeno (p38 MAPK) em ratos *Sprague-Dawley*, e que essa fosforilação foi atenuada pela aplicação na RVLM do inibidor da NADPH oxidase, cloreto de difenileno-iodônio (DPI) ou do mimético da superóxido dismutase (SOD), tempol (50 nmol). DPI também atenuou a produção de $O_2^{\bullet-}$ induzida pela Ang II na RVLM. Em adição, a resposta pressora induzida pela Ang II foi atenuada pelo DPI (1.5 nmol), tempol, ou pelo inibidor da p38 MAPK (SB203580, 500 nmol). Nesse estudo [120], também foi observado que a Ang II (0.5 μ mol/L) aumentou a frequência de correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas

sensíveis ao glutamato em neurônios da RVLM, e que este efeito foi abolido pelo SB203580. Esses resultados sugerem que na RVLM o $O_2^{\cdot-}$ derivado da NADPH oxidase medeia o efeito pressor induzido pela Ang II via ativação da p38 MAPK. Além disso, a via de sinalização da p38 MAPK pode mediar a resposta pressora induzida pela Ang II via aumento da liberação pré-sináptica de glutamato em neurônios da RVLM.

Adicionalmente, Oliveira-Sales e colaboradores (2009) [13] mostraram que o agente antioxidante ácido ascórbico (Vitamina C- VIT C), que potencialmente inativa o $O_2^{\cdot-}$, foi capaz de abolir o efeito pressor induzido pela microinjeção de Ang II na RVLM de ratos com hipertensão renovascular 2R1C. Nossos dados, de acordo com as evidências da literatura, sugerem que o mediador intracelular dos efeitos fisiológicos da Ang II é o $O_2^{\cdot-}$ e que a Ang II na CVLM através do $O_2^{\cdot-}$ aumenta a atividade inibitória da via gabaérgica ascendente da CVLM para a RVLM, levando conseqüentemente, a uma diminuição da PA.

No presente estudo, mostramos que a microinjeção de BIC (antagonista de receptor GABAA) na CVLM produziu uma queda na PA e bradicardia em animais SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C. Esse dado sugere que a inibição de sinapses dos interneurônios gabaérgicos inibitórios na CVLM, induzida pela microinjeção de BIC, possa estar causando um aumento da atividade inibitória da CVLM sobre a RVLM e conseqüentemente, uma redução na atividade do SNS. Esses dados estão de acordo com outros trabalhos da literatura [171, 172] que mostraram que a microinjeção de BIC na CVLM em gatos [37, 172] e em ratos *Sprague-Dawley* [171, 173] apresenta efeito depressor similar ao encontrado no presente estudo. Porém, no presente estudo mostramos ainda que o efeito hipotensor induzido pela microinjeção de BIC na CVLM foi maior nos animais 2R1C quando comparado aos animais SHAM, o que sugere que durante a hipertensão a CVLM apresenta mais interneurônios gabaérgicos e conseqüentemente maiores níveis de GABA, o que talvez possa ser um mecanismo adicional para explicar a aumentada atividade da RVLM observada durante a hipertensão.

Nossos dados confirmam que a microinjeção de BIC do presente estudo foi realizada em projeções de populações de interneurônios glutamatérgicos e gabaérgicos da CVLM e não diretamente na via neuronal inibitória gabaérgica ascendente da CVLM para a RVLM. Uma vez que, se a microinjeção de BIC tivesse sido realizada na via ascendente inibitória gabaérgica da CVLM para a RVLM, o resultado seria um aumento da PA e FC e não uma queda desses parâmetros como observado no presente estudo. Dessa forma, podemos inferir, que o efeito depressor e bradicárdico induzido pela microinjeção de BIC na CVLM foi resultado do balanço da atividade de interneurônios excitatórios e inibitórios da CVLM que

por sua vez influenciou a atividade inibitória da CVLM para a RVLM. Assim, nossos resultados sugerem que o bloqueio de receptores gabaérgicos de interneurônios gabaérgicos da CVLM induzido pela microinjeção de BIC, aumenta a atividade de interneurônios excitatórios, que por sua vez, aumenta a atividade da via neuronal inibitória gabaérgica da CVLM para a RVLM, o que diminui a atividade da RVLM e consequentemente a PA e a FC (veja Figura 16). De fato, estudos mostraram que a atividade neuronal inibitória da CVLM sobre a RVLM é determinada através de um balanço entre a atividade de sinapses excitatórias glutamatérgicas e inibitórias gabaérgicas, embora as fontes para esses sinais ainda permaneçam não totalmente compreendidas [130, 131].

Nossos dados também mostraram que a microinjeção de BIC na CVLM diminuiu o efeito hipotensor da Ang-(1-7) por até 30 min em animais SHAM. No entanto, a microinjeção de BIC na CVLM diminuiu o efeito hipotensor da Ang-(1-7) por apenas 5 min em animais 2R1C. Esses dados sugerem uma menor efetividade do bloqueio de sinapses gabaérgicas pela BIC, na concentração utilizada, em animais com hipertensão 2R1C. Em adição, o menor tempo de atenuação do efeito hipotensor da Ang-(1-7) em animais 2R1C reforça a ideia de que a CVLM de animais 2R1C apresenta maiores níveis de GABA em relação aos ratos SHAM. Por outro lado, nossos dados mostraram ainda que a microinjeção de BIC na CVLM não alterou o efeito hipotensor da Ang II por até 30 min em animais SHAM e 2R1C. Esses resultados mostram que sinapses gabaérgicas participam predominantemente do efeito depressor induzido pela Ang-(1-7) na CVLM e estão de acordo com estudos que mostraram que a administração da Ang-(1-7) é capaz de estimular a produção de GABA no núcleo estriado em ratos [128].

De fato, Stragier e colaboradores (2005) [128] mostraram que a Ang-(1-7) (100 μ M) administrada através de uma sonda de microdiálise por 1 hora no núcleo estriado de ratos WKY aumentou a concentração extracelular de dopamina e GABA, mas não teve nenhum efeito sobre a liberação de glutamato. Em adição, o efeito da Ang-(1-7) sobre a liberação de GABA não foi abolido pelo antagonista do receptor AT₁ (candesartan, 10 nM) e pelo antagonista do receptor AT₂ (PD123,319, 1 μ M). No entanto, a liberação de GABA induzida pela Ang-(1-7) foi abolida pelo antagonista do receptor Mas (A779, 0.1 μ M) e pelo inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME, 1mM). Além disso, tanto o A779 como o L-NAME não aboliram o efeito da Ang-(1-7) sobre a liberação de dopamina no núcleo estriado sugerindo que somente a liberação de GABA induzida pela Ang-(1-7) é mediada pelo receptor Mas e/ou está associada com a liberação de NO. Assim, de acordo com esse estudo, é possível que a Ang-(1-7) via receptor Mas induza aumento de NO, que então levaria ao aumento na

concentração extracelular de GABA no núcleo estriado de ratos WKY [128]. Esse dado da literatura, juntamente com os nossos, sugerem que o GABA e o NO sejam importantes mediadores do efeito induzido pela Ang-(1-7) na CVLM.

Ao contrário de nossos resultados obtidos com BIC, a microinjeção de KYN (antagonista de receptores ionotrópicos do glutamato) na CVLM causou um efeito hipertensor e taquicardia similar em animais SHAM e em animais 2R1C. Nossos dados estão de acordo com o estudo de Mandel e Schreihofner (2008) [69], uma vez que estes autores também mostraram que a microinjeção de KYN na CVLM produz efeito hipertensor em ratos *Sprague-Dawley*. Em adição, nossos dados mostram que a microinjeção de KYN na CVLM aumentou o efeito hipotensor da Ang II por até 15 min tanto em ratos 2R1C como em ratos SHAM e não alterou o efeito hipotensor induzido pela microinjeção de Ang-(1-7) na CVLM em ambos os grupos. Esses dados sugerem que sinapses glutamatérgicas participam preferencialmente do efeito depressor induzido pela Ang II na CVLM e estão de acordo com dados recentes da literatura que mostraram que a Ang II induz aumento na concentração de glutamato na RVLM de ratos normotensos e SHR [126] e em animais com hipertensão induzida por estresse [129] e no PVN de ratos infundidos com Ang II [127].

De fato, Zhu e colaboradores (1998) [126] mostraram que a microinjeção de Ang II em doses diferentes (20 e 100 pmol) na RVLM produziu um aumento na PAM e FC dependente da dose em ratos normotensos *Sprague-Dawley* e SHR. Os autores do referido estudo [126] também mostraram através de amostras de microdiálise da RVLM que a microinjeção de Ang II (20 e 100 pmol) nessa área produziu um aumento dependente da dose na liberação de glutamato 10 min após a administração do peptídeo em ambos os grupos. Os elevados níveis de glutamato retornaram ao basal após 30 e 50 min da administração de Ang II. Em contraste, a microinjeção do antagonista do receptor AT₁ da Ang II (CV 11974, 2.3 nmol) na RVLM reduziu a PAM e a FC, bem como, a liberação de glutamato, mas aumentou a liberação de neurotransmissores aminoácidos inibitórios (glicina, taurina e GABA). Em adição, foi observado que a microinjeção de KYN (2.7 nmol) ou BIC (0.5 nmol) atenuou os efeitos cardiovasculares induzidos pela Ang II (100 pmol) ou pelo CV 11974 (2.3 nmol), respectivamente, na RVLM em ratos normotensos e SHR, sugerindo que as mudanças nas atividades cardiovasculares induzidas pela Ang II ou pelo antagonista do receptor AT₁ são principalmente, ou pelo menos parcialmente, devido a mudanças na liberação de neurotransmissores aminoácidos na RVLM. Esses resultados sugerem que os efeitos cardiovasculares da Ang II na RVLM são mediados pela liberação de neurotransmissores aminoácidos. Assim, a estimulação do receptor AT₁ pela Ang II na RVLM aumentou a

liberação de neurotransmissor aminoácido excitatório, que produziu respostas pressoras e taquicárdicas, enquanto o antagonista do receptor AT_1 diminuiu a liberação de neurotransmissor aminoácido excitatório e aumentou a liberação de neurotransmissor aminoácido inibitório resultando em respostas depressoras e bradicárdicas.

Du e colaboradores (2013) [129] realizaram microdiálise na RVLM para avaliar o efeito da Ang II, Ang-(1-7) e de seus antagonistas específicos sobre a liberação de neurotransmissores na RVLM em ratos normotensos e com hipertensão induzida por estresse (SIH). Nesse estudo [129], foi mostrado que a Ang II (100 pmol) microinjetada na RVLM induziu uma resposta pressora, aumentou os níveis de glutamato e diminuiu a liberação de neurotransmissores inibitórios (taurina e GABA) em ratos normotensos e SIH. No entanto, os efeitos da Ang II foram maiores em animais SIH do que em animais normotensos. Em adição, o Losartan diminuiu a PAM, reduziu os níveis de glutamato e aumentou os níveis de taurina e GABA em SIH, mas não em ratos normotensos. Em contraste, a microinjeção de Ang-(1-7) (100 pmol) e do seu antagonista A779 (100 pmol) eliciou efeitos similares sobre a PAM e a liberação de aminoácidos em ambos os grupos. Esses resultados demonstraram que a ativação da via da Ang II, mas não a via da Ang-(1-7), na RVLM contribui para a hipertensão em ratos SIH por aumentar a liberação de neurotransmissor excitatório e suprimir a liberação de neurotransmissores inibitórios.

No estudo de Qi e colaboradores (2013) [127] a Ang II (200 ng/kg/min) foi continuamente infundida subcutaneamente via mini-bomba osmótica por 4 semanas. Simultaneamente, o Losartan (10 μ g/h) ou veículo (ACSF) foram infundidos via mini-bombas osmóticas no PVN em ratos. As concentrações teciduais de glutamato e GABA foram mensuradas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica. Nesse trabalho [127], foi mostrado que a infusão de Ang II aumentou a PAM, os níveis de glutamato, os níveis de norepinefrina (NE), a expressão do mRNA do receptor AT_1 e os níveis de citocinas pró-inflamatórias (PIC; TNF- α , IL-1 β e IL-6), e diminuiu os níveis de GABA no PVN em ratos *Sprague-Dawley* quando comparado aos animais submetidos a infusão de salina. Por outro lado, o tratamento com Losartan atenuou essas respostas hipertensivas induzidas pela Ang II. Esses achados sugerem que a ativação do SRA no PVN contribui para a resposta hipertensiva induzida pela Ang II via interação com PIC e neurotransmissores (glutamato, NE e GABA) no PVN. Esses dados da literatura juntamente com os do presente estudo sugerem que o glutamato é um importante mediador do efeito produzido pela Ang II. Adicionalmente, nossos resultados em conjunto, mostram evidências de que os efeitos hipotensores similares induzidos pela Ang II e Ang-(1-7) na CVLM ocorram

através de ER e neurotransmissores distintos, porém mais experimentos são necessários para elucidar esses dados.

6. SUMÁRIO

Em suma, nossos dados mostraram que:

- A Ang-(1-7) e Ang II na CVLM induziram efeitos hipotensores similares em ratos SHAM e 2R1C.
- O L-NAME (inibidor não específico da NOS) na CVLM induziu efeito hipotensor e bradicárdico similar em ratos SHAM e 2R1C.
- Enquanto, a VIT C (antioxidante ácido ascórbico) na CVLM induziu efeito hipotensor e bradicárdico somente em ratos 2R1C.
- A microinjeção de BIC (antagonista de receptor GABAA) na CVLM produziu queda na PAM e FC em ratos SHAM e 2R1C.
- No entanto, o efeito hipotensor induzido pela microinjeção de BIC na CVLM foi maior nos animais 2R1C comparado aos animais SHAM.
- Já, o KYN (antagonista de receptores ionotrópicos do glutamato) na CVLM induziu efeito hipertensor similar em ratos SHAM e 2R1C.
- Em adição, o L-NAME aumentou o efeito hipotensor da Ang-(1-7) por até 45 min em ratos SHAM e por apenas 5 min em ratos 2R1C e não alterou o efeito hipotensor induzido pela microinjeção de Ang II na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.
- Ao contrário, a VIT C aboliu por até 15 min o efeito hipotensor da Ang II na CVLM de ratos SHAM e 2R1C e não alterou o efeito hipotensor da Ang-(1-7) na CVLM de ambos os grupos.

- Além disso, a BIC diminuiu o efeito hipotensor da Ang-(1-7) por até 30 min em ratos SHAM e por apenas 5 min em ratos 2R1C e não alterou o efeito hipotensor induzido pela microinjeção de Ang II na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.
- Já, o KYN aumentou o efeito hipotensor da Ang II por até 15 min em ratos SHAM e 2R1C e não alterou o efeito hipotensor da Ang-(1-7) na CVLM de ambos os grupos.

7. CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo mostram que a microinjeção de VIT C na CVLM induziu efeito hipotensor e bradicárdico somente em ratos 2R1C e que a BIC induziu efeito hipotensor maior em ratos 2R1C comparado aos animais SHAM, sugerindo a participação do O_2^{\bullet} e do neurotransmissor GABA na CVLM na hipertensão renovascular 2R1C. Além disso, os efeitos hipotensores similares induzidos pela Ang II e Ang-(1-7) na CVLM ocorrem através de mecanismos distintos e envolvem diferentes ER e neurotransmissores, sendo que, o NO e o GABA participam predominantemente do efeito hipotensor induzido pela Ang-(1-7), enquanto o O_2^{\bullet} e o glutamato participam predominantemente do efeito hipotensor induzido pela Ang II na CVLM em animais normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C. Esses dados mostram que diferentes vias e/ou mediadores intracelulares estão envolvidos nos efeitos induzidos pela Ang II e Ang-(1-7) na CVLM.

8. PERSPECTIVAS

Estudos estão sendo conduzidos com o intuito de confirmar que o NO participa predominantemente do efeito hipotensor induzido pela Ang-(1-7) e que o O_2^{\bullet} participa predominantemente do efeito hipotensor induzido pela Ang II. Os níveis intracelulares de NO e O_2^{\bullet} serão determinados pela marcação fluorescente com 4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA, marcador fluorescente para NO) e dihidroetídio (DHE, marcador fluorescente para O_2^{\bullet}) como descrito previamente por Pajolla e colaboradores (2009) [174] e Nishi e colaboradores (2013) [175]. O DAF-FM DA é um marcador sensível ao NO que rapidamente se difunde para o interior das células e é essencialmente não fluorescente até reagir com NO para formar benzotrizole fluorescente [176], enquanto o corante DHE é oxidado a etídio fluorescente por O_2^{\bullet} e é comumente usado para monitorar os níveis intracelulares de O_2^{\bullet} [119].

Breviamente, os *slices* da CVLM de animais normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C serão incubados com DAF-FM DA ou DHE por 15 min a 37° C e protegidos da luz. Após 15 e 30 min será administrado Ang-(1-7) ou Ang II ou fluido cerebrospinal artificial (ACFS) no meio de cultura. Posteriormente, os *slices* serão lavados com ACFS, colocados em uma lâmina coberta com lamínula e imediatamente examinados pela microscopia confocal. A intensidade de fluorescência da CVLM será medida utilizando o programa ImageJ V1.45.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, Amann M, Anderson HR, Andrews KG, Aryee M, et al: **A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.** *Lancet* 2012, **380**:2224-2260.
2. Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA, Godwin J, Qizilbash N, Taylor JO, Hennekens CH: **Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context.** *Lancet* 1990, **335**:827-838.
3. Xia H, Suda S, Bindom S, Feng Y, Gurley SB, Seth D, Navar LG, Lazartigues E: **ACE2-mediated reduction of oxidative stress in the central nervous system is associated with improvement of autonomic function.** *PLoS One* 2011, **6**:e22682.
4. Majzunova M, Dovinova I, Barancik M, Chan JY: **Redox signaling in pathophysiology of hypertension.** *J Biomed Sci* 2013, **20**:69.
5. Han Y, Fan ZD, Yuan N, Xie GQ, Gao J, De W, Gao XY, Zhu GQ: **Superoxide anions in the paraventricular nucleus mediate the enhanced cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activity in renovascular hypertensive rats.** *J Appl Physiol (1985)* 2011, **110**:646-652.
6. Wang G, Anrather J, Huang J, Speth RC, Pickel VM, Iadecola C: **NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius.** *J Neurosci* 2004, **24**:5516-5524.
7. Tai MH, Wang LL, Wu KL, Chan JY: **Increased superoxide anion in rostral ventrolateral medulla contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats via interactions with nitric oxide.** *Free Radic Biol Med* 2005, **38**:450-462.
8. de Castro UG, de Sousa GG, Machado RoP, Isoldi MC, Silva ME, Nadu AP, Sousa LE, Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC: **Nitric oxide at the CVLM is involved in the attenuation of the reflex bradycardia in renovascular hypertensive rats.** *Nitric Oxide* 2012, **26**:118-125.
9. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K: **Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay.** *Biomed Res Int* 2014, **2014**:761264.
10. Harrison DG, Gongora MC: **Oxidative stress and hypertension.** *Med Clin North Am* 2009, **93**:621-635.
11. Fukai T, Ushio-Fukai M: **Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases.** *Antioxid Redox Signal* 2011, **15**:1583-1606.
12. Danson EJ, Paterson DJ: **Reactive oxygen species and autonomic regulation of cardiac excitability.** *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006, **17 Suppl 1**:S104-S112.
13. Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Carillo BA, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR: **Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension.** *Am J Hypertens* 2009, **22**:484-492.
14. Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, Abreu NP, Boim MA, Martins PJ, D'Almeida V, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR: **Oxidative stress contributes to renovascular hypertension.** *Am J Hypertens* 2008, **21**:98-104.
15. Costa CA, Amaral TA, Carvalho LC, Ognibene DT, da Silva AF, Moss MB, Valença SS, de Moura RS, Resende AC: **Antioxidant treatment with tempol and apocynin**

- prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension.** *Am J Hypertens* 2009, **22**:1242-1249.
16. Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A: **Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.** *Circulation* 2004, **109**:2357-2362.
 17. Ushio-Fukai M: **Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS.** *Antioxid Redox Signal* 2009, **11**:1289-1299.
 18. Lassègue B, Griendling KK: **NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, **30**:653-661.
 19. Martínez MC, Andriantsitohaina R: **Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease.** *Antioxid Redox Signal* 2009, **11**:669-702.
 20. Suhr F, Porten S, Hertrich T, Brixius K, Schmidt A, Platen P, Bloch W: **Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes.** *Nitric Oxide* 2009, **20**:95-103.
 21. Touyz RM: **Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?** *Hypertension* 2004, **44**:248-252.
 22. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS: **Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate.** *Biochemistry* 1988, **27**:8706-8711.
 23. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S: **Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo.** *Br J Pharmacol* 1990, **101**:746-752.
 24. Nagase S, Takemura K, Ueda A, Hirayama A, Aoyagi K, Kondoh M, Koyama A: **A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **233**:150-153.
 25. Maiese K, Boccone L: **Neuroprotection by peptide growth factors against anoxia and nitric oxide toxicity requires modulation of protein kinase C.** *J Cereb Blood Flow Metab* 1995, **15**:440-449.
 26. Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R: **Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans.** *J Physiol* 2004, **561**:1-25.
 27. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: **Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.** *Biochem J* 2001, **357**:593-615.
 28. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH: **Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:4214-4218.
 29. Wiencken AE, Casagrande VA: **Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex.** *Glia* 1999, **26**:280-290.
 30. Hartung HP, Jung S, Stoll G, Zielasek J, Schmidt B, Archelos JJ, Toyka KV: **Inflammatory mediators in demyelinating disorders of the CNS and PNS.** *J Neuroimmunol* 1992, **40**:197-210.
 31. Pender MP, Rist MJ: **Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia.** *Glia* 2001, **36**:137-144.
 32. Murphy S: **Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS.** *Glia* 2000, **29**:1-13.
 33. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C: **Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase.** *J Biol Chem* 2002, **277**:38079-38086.

34. Brown GC, Cooper CE: **Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase.** *FEBS Lett* 1994, **356**:295-298.
35. Horn T, Smith PM, McLaughlin BE, Bauce L, Marks GS, Pittman QJ, Ferguson AV: **Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications.** *Am J Physiol* 1994, **266**:R306-313.
36. Tseng CJ, Liu HY, Lin HC, Ger LP, Tung CS, Yen MH: **Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats.** *Hypertension* 1996, **27**:36-42.
37. Shapoval LN, Sagach VF, Pobegailo LS: **Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat.** *Neurosci Lett* 1991, **132**:47-50.
38. Guyenet PG: **The sympathetic control of blood pressure.** *Nat Rev Neurosci* 2006, **7**:335-346.
39. Guertzenstein PG, Silver A: **Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions.** *J Physiol* 1974, **242**:489-503.
40. Dampney RA: **Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system.** *Physiol Rev* 1994, **74**:323-364.
41. Dampney RA, Horiuchi J, Tagawa T, Fontes MA, Potts PD, Polson JW: **Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone.** *Acta Physiol Scand* 2003, **177**:209-218.
42. Heesch CM, Laiprasert JD, Kvochina L: **RVLM glycine receptors mediate GABAA and GABAB)independent sympathoinhibition from CVLM in rats.** *Brain Res* 2006, **1125**:46-59.
43. Dupont AG, Brouwers S: **Brain angiotensin peptides regulate sympathetic tone and blood pressure.** *J Hypertens* 2010, **28**:1599-1610.
44. Badoer E, McKinley MJ, Oldfield BJ, McAllen RM: **Localization of barosensitive neurons in the caudal ventrolateral medulla which project to the rostral ventrolateral medulla.** *Brain Res* 1994, **657**:258-268.
45. Cravo SL, Morrison SF: **The caudal ventrolateral medulla is a source of tonic sympathoinhibition.** *Brain Res* 1993, **621**:133-136.
46. Dampney RA: **The subretrofacial vasomotor nucleus: anatomical, chemical and pharmacological properties and role in cardiovascular regulation.** *Prog Neurobiol* 1994, **42**:197-227.
47. Guertzenstein PG, Lopes OU: **Cardiovascular responses evoked from the nicotine-sensitive area on the ventral surface of the medulla oblongata in the cat.** *J Physiol* 1984, **347**:345-360.
48. Sved AF, Blessing WW, Reis DJ: **Caudal ventrolateral medulla can alter vasopressin and arterial pressure.** *Brain Res Bull* 1985, **14**:227-232.
49. McKittrick DJ, Calaresu FR: **Reciprocal connection between nucleus ambiguus and caudal ventrolateral medulla.** *Brain Res* 1997, **770**:213-220.
50. Cravo SL, Morrison SF, Reis DJ: **Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla.** *Am J Physiol* 1991, **261**:R985-994.
51. Agarwal SK, Gelsema AJ, Calaresu FR: **Neurons in rostral VLM are inhibited by chemical stimulation of caudal VLM in rats.** *Am J Physiol* 1989, **257**:R265-270.
52. Agarwal SK, Gelsema AJ, Calaresu FR: **Inhibition of rostral VLM by baroreceptor activation is relayed through caudal VLM.** *Am J Physiol* 1990, **258**:R1271-1278.
53. Masuda N, Terui N, Koshiya N, Kumada M: **Neurons in the caudal ventrolateral medulla mediate the arterial baroreceptor reflex by inhibiting barosensitive**

- reticulospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla in rabbits.** *J Auton Nerv Syst* 1991, **34**:103-117.
54. Minson JB, Llewellyn-Smith IJ, Arnolda LF, Pilowsky PM, Chalmers JP: **C-fos expression in central neurons mediating the arterial baroreceptor reflex.** *Clin Exp Hypertens* 1997, **19**:631-643.
 55. Chan RK, Sawchenko PE: **Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry.** *J Neurosci* 1998, **18**:371-387.
 56. Schreihofner AM, Guyenet PG: **The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002, **29**:514-521.
 57. Natarajan M, Morrison SF: **Adrenal epinephrine secretion is not regulated by sympathoinhibitory neurons in the caudal ventrolateral medulla.** *Brain Res* 1999, **827**:169-175.
 58. Schreihofner AM, Ito S, Sved AF: **Brain stem control of arterial pressure in chronic arterial baroreceptor-denervated rats.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, **289**:R1746-1755.
 59. Averill DB, Diz DI: **Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata.** *Brain Res Bull* 2000, **51**:119-128.
 60. Sved AF, Ito S, Madden CJ: **Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation.** *Brain Res Bull* 2000, **51**:129-133.
 61. Cangussu LM, de Castro UG, do Pilar Machado R, Silva ME, Ferreira PM, dos Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC: **Angiotensin-(1-7) antagonist, A-779, microinjection into the caudal ventrolateral medulla of renovascular hypertensive rats restores baroreflex bradycardia.** *Peptides* 2009, **30**:1921-1927.
 62. Chan RK, Chan YS, Wong TM: **Electrophysiological properties of neurons in the rostral ventrolateral medulla of normotensive and spontaneously hypertensive rats.** *Brain Res* 1991, **549**:118-126.
 63. Boone JB, Jr., McMillen D: **Proenkephalin gene expression is altered in the brain of spontaneously hypertensive rats during the development of hypertension.** *Brain Res Mol Brain Res* 1994, **24**:320-326.
 64. Suzuki S, Pilowsky P, Minson J, Arnolda L, Llewellyn-Smith IJ, Chalmers J: **c-fos antisense in rostral ventral medulla reduces arterial blood pressure.** *Am J Physiol* 1994, **266**:R1418-1422.
 65. Minson J, Arnolda L, Llewellyn-Smith I, Pilowsky P, Chalmers J: **Altered c-fos in rostral medulla and spinal cord of spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension* 1996, **27**:433-441.
 66. Smith JK, Barron KW: **The rostral and caudal ventrolateral medulla in young spontaneously hypertensive rats.** *Brain Res* 1990, **506**:153-158.
 67. Smith JK, Barron KW: **Cardiovascular effects of L-glutamate and tetrodotoxin microinjected into the rostral and caudal ventrolateral medulla in normotensive and spontaneously hypertensive rats.** *Brain Res* 1990, **506**:1-8.
 68. Colombari E, Sato MA, Cravo SL, Bergamaschi CT, Campos RR, Jr., Lopes OU: **Role of the medulla oblongata in hypertension.** *Hypertension* 2001, **38**:549-554.
 69. Mandel DA, Schreihofner AM: **Glutamatergic inputs to the CVLM independent of the NTS promote tonic inhibition of sympathetic vasomotor tone in rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008, **295**:H1772-1779.

70. Muratani H, Ferrario CM, Averill DB: **Ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats: role of angiotensin II.** *Am J Physiol* 1993, **264**:R388-395.
71. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW: **STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION : I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA.** *J Exp Med* 1934, **59**:347-379.
72. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW: **Studies on Experimental Hypertension : I. the Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia.** *J Exp Med* 1934, **59**:347-379.
73. Braam B, Navar LG, Mitchell KD: **Modulation of tubuloglomerular feedback by angiotensin II type 1 receptors during the development of Goldblatt hypertension.** *Hypertension* 1995, **25**:1232-1237.
74. Huang WC, Ploth DW, Navar LG: **Angiotensin-mediated alterations in nephron function in Goldblatt hypertensive rats.** *Am J Physiol* 1982, **243**:F553-560.
75. Imamura A, Mackenzie HS, Lacy ER, Hutchison FN, Fitzgibbon WR, Ploth DW: **Effects of chronic treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor or an angiotensin receptor antagonist in two-kidney, one-clip hypertensive rats.** *Kidney Int* 1995, **47**:1394-1402.
76. Ploth DW: **Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney, one-clip renal vascular hypertension.** *Am J Physiol* 1983, **245**:F131-141.
77. Navar LG, Von Thun AM, Zou L, el-Dahr SS, Mitchell KD: **Enhancement of intrarenal angiotensin II levels in 2 kidney 1 clip and angiotensin II induced hypertension.** *Blood Press Suppl* 1995, **2**:88-92.
78. Navar LG, Zou L, Von Thun A, Tarng Wang C, Imig JD, Mitchell KD: **Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension.** *News Physiol Sci* 1998, **13**:170-176.
79. de Gasparo M: **New basic science initiatives with the angiotensin II receptor blocker valsartan.** *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2000, **1**:S3-5.
80. Kaschina E, Unger T: **Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function.** *Blood Press* 2003, **12**:70-88.
81. Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ: **Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome.** *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **185**:253-259.
82. Suzuki J, Matsubara H, Urakami M, Inada M: **Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy.** *Circ Res* 1993, **73**:439-447.
83. Obayashi M, Yano M, Kohno M, Kobayashi S, Tanigawa T, Hironaka K, Ryouke T, Matsuzaki M: **Dose-dependent effect of ANG II-receptor antagonist on myocyte remodeling in rat cardiac hypertrophy.** *Am J Physiol* 1997, **273**:H1824-1831.
84. Unger T: **Blood pressure lowering and renin-angiotensin system blockade.** *J Hypertens Suppl* 2003, **21**:S3-7.
85. Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M, et al: **Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects.** *J Clin Invest* 1998, **101**:527-535.
86. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ: **Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system.** *Hypertension* 1999, **33**:613-621.
87. Levy BI: **How to explain the differences between renin angiotensin system modulators.** *Am J Hypertens* 2005, **18**:134S-141S.

88. Felix D, Khosla MC, Barnes KL, Imboden H, Montani B, Ferrario CM: **Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7)**. *Hypertension* 1991, **17**:1111-1114.
89. Ambuhl P, Felix D, Imboden H, Khosla MC, Ferrario CM: **Effects of angiotensin analogues and angiotensin receptor antagonists on paraventricular neurones**. *Regul Pept* 1992, **38**:111-120.
90. Wright JW, Harding JW: **Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses**. *Neurosci Biobehav Rev* 1994, **18**:21-53.
91. Steckelings UM, Kaschina E, Unger T: **The AT2 receptor--a matter of love and hate**. *Peptides* 2005, **26**:1401-1409.
92. Phillips MI, de Oliveira EM: **Brain renin angiotensin in disease**. *J Mol Med* 2008, **86**:715-722.
93. Harmer D, Gilbert M, Borman R, Clark KL: **Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme**. *FEBS Lett* 2002, **532**:107-110.
94. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, et al: **Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase**. *J Biol Chem* 2002, **277**:14838-14843.
95. Santos RA, Brosnihan KB, Jacobsen DW, DiCorleto PE, Ferrario CM: **Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium**. *Hypertension* 1992, **19**:II56-61.
96. Shaltout HA, Westwood BM, Averill DB, Ferrario CM, Figueroa JP, Diz DI, Rose JC, Chappell MC: **Angiotensin metabolism in renal proximal tubules, urine, and serum of sheep: evidence for ACE2-dependent processing of angiotensin II**. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007, **292**:F82-91.
97. Gallagher PE, Ferrario CM, Tallant EA: **MAP kinase/phosphatase pathway mediates the regulation of ACE2 by angiotensin peptides**. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, **295**:C1169-1174.
98. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI: **Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7)**. *Hypertension* 1997, **30**:535-541.
99. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP: **Angiotensin-(1-7): an update**. *Regul Pept* 2000, **91**:45-62.
100. Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ: **Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs**. *Expert Opin Investig Drugs* 2005, **14**:1019-1031.
101. Paula RD, Lima CV, Khosla MC, Santos RA: **Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats**. *Hypertension* 1995, **26**:1154-1159.
102. Lima CV, Paula RD, Resende FL, Khosla MC, Santos RA: **Potential of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats**. *Hypertension* 1997, **30**:542-548.
103. Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM: **Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide**. *Hypertension* 1996, **27**:523-528.
104. Almeida AP, Frabregas BC, Madureira MM, Santos RJ, Campagnole-Santos MJ, Santos RA: **Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart**. *Braz J Med Biol Res* 2000, **33**:709-713.
105. Fernandes L, Fortes ZB, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, Catelli De Carvalho MH: **Potential of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo**. *Hypertension* 2001, **37**:703-709.
106. Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA: **Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth**. *Hypertension* 1996, **28**:104-108.

107. Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM: **State-of-the-Art lecture. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle.** *Hypertension* 1999, **34**:950-957.
108. Strawn WB, Ferrario CM, Tallant EA: **Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury.** *Hypertension* 1999, **33**:207-211.
109. Machado RD, Santos RA, Andrade SP: **Opposing actions of angiotensins on angiogenesis.** *Life Sci* 2000, **66**:67-76.
110. Faria-Silva R, Duarte FV, Santos RA: **Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats.** *Hypertension* 2005, **46**:948-952.
111. Phillips MI, de Oliveira EM: **Brain renin angiotensin in disease.** *J Mol Med (Berl)* 2008, **86**:715-722.
112. Rodrigues MC, Campagnole-Santos MJ, Machado RP, Silva ME, Rocha JL, Ferreira PM, Santos RA, Alzamora AC: **Evidence for a role of AT(2) receptors at the CVLM in the cardiovascular changes induced by low-intensity physical activity in renovascular hypertensive rats.** *Peptides* 2007, **28**:1375-1382.
113. Bourassa EA, Fang X, Li X, Sved AF, Speth RC: **AT angiotensin II receptor and novel non-AT, non-AT angiotensin II/III binding site in brainstem cardiovascular regulatory centers of the spontaneously hypertensive rat.** *Brain Res*, **1359**:98-106.
114. Macarthur H, Westfall TC, Wilken GH: **Oxidative stress attenuates NO-induced modulation of sympathetic neurotransmission in the mesenteric arterial bed of spontaneously hypertensive rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008, **294**:H183-189.
115. Silva LC, Fontes MA, Campagnole-Santos MJ, Khosla MC, Campos RR, Guertzenstein PG, Santos RA: **Cardiovascular effects produced by micro-injection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla.** *Brain Res* 1993, **613**:321-325.
116. Alzamora AC, Santos RA, Campagnole-Santos MJ: **Hypotensive effect of ANG II and ANG-(1-7) at the caudal ventrolateral medulla involves different mechanisms.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002, **283**:R1187-1195.
117. Alzamora AC, Santos RA, Campagnole-Santos MJ: **Baroreflex modulation by angiotensins at the rat rostral and caudal ventrolateral medulla.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006, **290**:R1027-1034.
118. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: **Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells.** *Circ Res* 1994, **74**:1141-1148.
119. Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davison RL: **Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system.** *Circ Res* 2002, **91**:1038-1045.
120. Chan SH, Hsu KS, Huang CC, Wang LL, Ou CC, Chan JY: **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* 2005, **97**:772-780.
121. Ferreira AJ, Santos RA: **Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7).** *Braz J Med Biol Res* 2005, **38**:499-507.
122. Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S: **Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes.** *Hypertension* 2008, **52**:542-548.
123. Xia H, Lazartigues E: **Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions.** *J Neurochem* 2008, **107**:1482-1494.

124. Zhang Y, Lu J, Shi J, Lin X, Dong J, Zhang S, Liu Y, Tong Q: **Central administration of angiotensin-(1-7) stimulates nitric oxide release and upregulates the endothelial nitric oxide synthase expression following focal cerebral ischemia/reperfusion in rats.** *Neuropeptides* 2008, **42**:593-600.
125. Wang J, Peng YJ, Zhu DN: **Amino acids modulate the hypotensive effect of angiotensin-(1-7) at the caudal ventrolateral medulla in rats.** *Regul Pept* 2005, **129**:1-7.
126. Zhu DN, Moriguchi A, Mikami H, Higaki J, Ogihara T: **Central amino acids mediate cardiovascular response to angiotensin II in the rat.** *Brain Res Bull* 1998, **45**:189-197.
127. Qi J, Zhang DM, Suo YP, Song XA, Yu XJ, Elks C, Lin YX, Xu YY, Zang WJ, Zhu Z, Kang YM: **Renin-angiotensin system modulates neurotransmitters in the paraventricular nucleus and contributes to angiotensin II-induced hypertensive response.** *Cardiovasc Toxicol* 2013, **13**:48-54.
128. Stragier B, Hristova I, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y: **In vivo characterization of the angiotensin-(1-7)-induced dopamine and gamma-aminobutyric acid release in the striatum of the rat.** *Eur J Neurosci* 2005, **22**:658-664.
129. Du D, Chen J, Liu M, Zhu M, Jing H, Fang J, Shen L, Zhu D, Yu J, Wang J: **The effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) in the rostral ventrolateral medulla of rats on stress-induced hypertension.** *PLoS One* 2013, **8**:e70976.
130. Blessing WW, Reis DJ: **Evidence that GABA and glycine-like inputs inhibit vasodepressor neurons in the caudal ventrolateral medulla of the rabbit.** *Neurosci Lett* 1983, **37**:57-62.
131. Guyenet PG, Filtz TM, Donaldson SR: **Role of excitatory amino acids in rat vagal and sympathetic baroreflexes.** *Brain Res* 1987, **407**:272-284.
132. Obata K: **Synaptic inhibition and γ -aminobutyric acid in the mammalian central nervous system.** *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2013, **89**:139-156.
133. Kagiya S, Tsuchihashi T, Abe I, Fujishima M: **Cardiovascular effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of rats.** *Brain Res* 1997, **757**:155-158.
134. Lage RC, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA, Santos RA: **Cardiovascular effects produced by nitric oxide-related drugs in the caudal ventrolateral medulla.** *Neuroreport* 1999, **10**:731-735.
135. Mayorov DN: **Nitric oxide synthase inhibition in rostral ventrolateral medulla attenuates pressor response to psychological stress in rabbits.** *Neurosci Lett* 2007, **424**:89-93.
136. Shih CD, Chuang YC: **Nitric oxide and GABA mediate bi-directional cardiovascular effects of orexin in the nucleus tractus solitarii of rats.** *Neuroscience* 2007, **149**:625-635.
137. Villela DC, da Silva LG, Fontes MA: **Activation of 5-HT receptors in the periaqueductal gray attenuates the tachycardia evoked from dorsomedial hypothalamus.** *Auton Neurosci* 2009, **148**:36-43.
138. Strobel GE, Wollman H: **Pharmacology of anesthetic agents.** *Fed Proc* 1969, **28**:1386-1403.
139. Maggi CA, Meli A: **Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system.** *Experientia* 1986, **42**:292-297.
140. Lalley PM: **Inhibition of depressor cardiovascular reflexes by a derivative of gamma-aminobutyric acid (GABA) and by general anesthetics with suspected GABA-mimetic effects.** *J Pharmacol Exp Ther* 1980, **215**:418-425.

141. Michelini LC, Bonagamba LG: **Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats.** *Hypertension* 1990, **15**:I45-50.
142. Fontes MA, Martins Pinge MC, Naves V, Campagnole-Santos MJ, Lopes OU, Khosla MC, Santos RA: **Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats.** *Brain Res* 1997, **750**:305-310.
143. Dampney RA, Fontes MA, Hirooka Y, Horiuchi J, Potts PD, Tagawa T: **Role of angiotensin II receptors in the regulation of vasomotor neurons in the ventrolateral medulla.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002, **29**:467-472.
144. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ: **Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.** *Hypertension* 2003, **42**:1206-1252.
145. Meredith IT, Broughton A, Jennings GL, Esler MD: **Evidence of a selective increase in cardiac sympathetic activity in patients with sustained ventricular arrhythmias.** *N Engl J Med* 1991, **325**:618-624.
146. DeForrest JM, Knappenberger RC, Antonaccio MJ, Ferrone RA, Creekmore JS: **Angiotensin II is a necessary component for the development of hypertension in the two kidney, one clip rat.** *Am J Cardiol* 1982, **49**:1515-1517.
147. Britto RR, Santos RA, Fagundes-Moura CR, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ: **Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats.** *Hypertension* 1997, **30**:549-556.
148. Cervenka L, Horacek V, Vaneckova I, Hubacek JA, Oliverio MI, Coffman TM, Navar LG: **Essential role of AT1A receptor in the development of 2K1C hypertension.** *Hypertension* 2002, **40**:735-741.
149. Lazartigues E, Lawrence AJ, Lamb FS, Davisson RL: **Renovascular hypertension in mice with brain-selective overexpression of AT1a receptors is buffered by increased nitric oxide production in the periphery.** *Circ Res* 2004, **95**:523-531.
150. Okamura T, Miyazaki M, Inagami T, Toda N: **Vascular renin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats.** *Hypertension* 1986, **8**:560-565.
151. Nishimura M, Milsted A, Block CH, Brosnihan KB, Ferrario CM: **Tissue renin-angiotensin systems in renal hypertension.** *Hypertension* 1992, **20**:158-167.
152. Sigmon DH, Beierwaltes WH: **Influence of nitric oxide in the chronic phase of two-kidney, one clip renovascular hypertension.** *Hypertension* 1998, **31**:649-656.
153. Soares ER, Lima WG, Machado RP, Carneiro CM, Silva ME, Rodrigues MC, De Castro UG, Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC: **Cardiac and renal effects induced by different exercise workloads in renovascular hypertensive rats.** *Braz J Med Biol Res* 2011, **44**:573-582.
154. Hunter JJ, Chien KR: **Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure.** *N Engl J Med* 1999, **341**:1276-1283.
155. Yang LM, He RR, Ho SY: **[Effects of microinjection of L-NNA and SNP into ventrolateral medulla on blood pressure, heart rate and renal sympathetic nerve activity in rats].** *Sheng Li Xue Bao* 1996, **48**:368-376.
156. Campese VM, Sindhu RK, Ye S, Bai Y, Vaziri ND, Jabbari B: **Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain.** *Brain Res* 2007, **1134**:27-32.
157. Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G: **Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells.** *Hypertension* 2001, **37**:72-76.

158. Pinheiro SV, Simões e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, et al: **Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney.** *Hypertension* 2004, **44**:490-496.
159. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM: **Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways.** *Hypertension* 2007, **49**:185-192.
160. Gomes ER, Lara AA, Almeida PW, Guimarães D, Resende RR, Campagnole-Santos MJ, Bader M, Santos RA, Guatimosim S: **Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway.** *Hypertension* 2010, **55**:153-160.
161. Gironacci MM, Vatta M, Rodriguez-Fermepín M, Fernández BE, Peña C: **Angiotensin-(1-7) reduces norepinephrine release through a nitric oxide mechanism in rat hypothalamus.** *Hypertension* 2000, **35**:1248-1252.
162. Cerrato BD, Frasch AP, Nakagawa P, Longo-Carbajosa N, Peña C, Höcht C, Gironacci MM: **Angiotensin-(1-7) upregulates central nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats.** *Brain Res* 2012, **1453**:1-7.
163. Xing J, Kong J, Lu J, Li J: **Angiotensin-(1-7) inhibits neuronal activity of dorsolateral periaqueductal gray via a nitric oxide pathway.** *Neurosci Lett* 2012, **522**:156-161.
164. Krukoff TL, Gehlen F, Ganten D, Wagner J: **Gene expression of brain nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in hypothalamus and medulla of two-kidney, one clip hypertensive rats.** *Hypertension* 1995, **26**:171-176.
165. Plochocka-Zulinska D, Krukoff TL: **Increased gene expression of neuronal nitric oxide synthase in brain of adult spontaneously hypertensive rats.** *Brain Res Mol Brain Res* 1997, **48**:291-297.
166. Zimmerman MC, Sharma RV, Davisson RL: **Superoxide mediates angiotensin II-induced influx of extracellular calcium in neural cells.** *Hypertension* 2005, **45**:717-723.
167. Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, Zucker IH: **Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase.** *Circ Res* 2004, **95**:937-944.
168. Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL: **Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996, **23**:183-191.
169. Zimmerman MC, Lazartigues E, Sharma RV, Davisson RL: **Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system.** *Circ Res* 2004, **95**:210-216.
170. Hirooka Y, Eshima K, Setoguchi S, Kishi T, Egashira K, Takeshita A: **Vitamin C improves attenuated angiotensin II-induced endothelium-dependent vasodilation in human forearm vessels.** *Hypertens Res* 2003, **26**:953-959.
171. Mandel DA, Schreihof AM: **Modulation of the sympathetic response to acute hypoxia by the caudal ventrolateral medulla in rats.** *J Physiol* 2009, **587**:461-475.
172. Wu WC, Yang CY, Chai CY: **Modulation of propofol on the effects of blood pressure and firing activity of related neurons in the medulla.** *Chin J Physiol* 2009, **52**:358-364.
173. Natarajan M, Morrison SF: **Sympathoexcitatory CVLM neurons mediate responses to caudal pressor area stimulation.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000, **279**:R364-374.

174. Pajolla GP, Accorsi-Mendonça D, Rodrigues GJ, Bendhack LM, Machado BH, Lunardi CN: **Fluorescent indication that nitric oxide formation in NTS neurons is modulated by glutamate and GABA.** *Nitric Oxide* 2009, **20**:207-216.
175. Nishi EE, Bergamaschi CT, Oliveira-Sales EB, Simon KA, Campos RR: **Losartan reduces oxidative stress within the rostral ventrolateral medulla of rats with renovascular hypertension.** *Am J Hypertens* 2013, **26**:858-865.
176. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, García-Calderó H, Fernández M, Bosch J, García-Pagán JC: **Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability.** *Hepatology* 2008, **47**:1248-1256.
177. Ferreira NS, Lira CAB, Ferri LP, Cintra CE, Morais LC, Santos KCF, Benite-Ribeiro SA: **A abordagem multidisciplinar no cuidado à saúde: resultados da avaliação de um programa de educação e controle da hipertensão arterial.** *Revista Hipertensão Resumos* 2013, **P17**.
178. **Causes of Death 2008** [online database]. Geneva, *World Health Organization* (http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf.)
179. Collen Smith, Allan D. Marks, Michael Lieberman: **Bioquímica Médica Básica de Marks: Uma Abordagem Clínica.** 2 ed. Artmed, 2007. 439-457p.
180. Aires, Margarida de Mello: **Fisiologia.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 254p.
181. Paxinos, G., Watson, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** New York: *Academic Press.* 1986.
182. World Health Organization (WHO). **International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension.** *Jornal of Hypertension.* 21:1983-1992. 2003.
183. de Castro, UG. **Efeitos cardiovasculares do óxido nítrico sobre neurônios da CVLM em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.** 2010. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2010.
184. Guix, F. X., Uribealago, I., Coma, M. e Munoz, F. J. **The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain.** *Prog Neurobiol.* v.76, n.2: p.126-52. 2005.