

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

*“Efeito do Óxido Nítrico na Regulação
de Parâmetros Cardiovasculares pela
CVLM em Ratos com Hipertensão
Renovascular 2R1C”*

Uberdan Guilherme Mendes de Castro

**Ouro Preto - MG
2010
Uberdan Guilherme Mendes de Castro**

**Efeito do Óxido Nítrico na Regulação de
Parâmetros Cardiovasculares pela CVLM em Ratos
com Hipertensão Renovascular 2R1C**

Orientadora: Andréia Carvalho Alzamora

Co-orientadora: Raquel do Pilar Machado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de 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, área de concentração Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

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.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original”

ALBERT EINSTEIN

Dedico este trabalho à minha família e a Deus

AGRADECIMENTOS

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

À Prof^a. Dr^a. Andréia Carvalho Alzamora, minha orientadora, por ter me dado a oportunidade, a 6 anos atrás, de fazer parte de seu grupo de pesquisa e por sempre reconhecer minha capacidade para o trabalho e pesquisa, mesmo perante nossa divergência de opiniões em aspectos do dia-a-dia. No entanto, acredito que até a ciência caminha desse jeito... São caminhos divergentes, mas que ao final buscam chegar a um lugar em comum...

Por todo ensinamento e convivência de anos.. sou muito grato.

À Prof^a. Dr^a. Raquel do Pilar Machado agradeço pela convivência de anos... Pela pessoa extraordinária que ela é, pelo seu dom para ensinar e pelo exemplo de vida que é para mim.

Ao Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva, que sempre acreditou e colaborou com meu trabalho. Sempre foi uma pessoa muito simples e que me ajudou imensamente desde quando foi meu professor na graduação. Agradeço-o pela imensa amizade.

Ao Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima, do Laboratório de Imunopatologia, por ser colaborador de minha pesquisa e por ter me auxiliado imensamente com seu conhecimento sobre análises histológicas.

À professora Lisandra Brandino, agradeço pela convivência e ajuda em situações cotidianas.

Ao professor Leonardo Cardoso pelas valiosas conversas que me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria José Campagnole-Santos e ao Prof. Dr. Robson Santos do Laboratório de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, agradeço por terem sempre acreditado no trabalho que desenvolvo.

Agradeço também ao Jair, técnico do laboratório de Nutrição experimental, Maria, técnica do laboratório de imunopatologia e ao Ernani e ao Paulo, técnicos do nosso laboratório, pelo companheirismo de anos e por terem dado aos meus colegas de pesquisa e a mim, condições de exercer nosso trabalho.

À Todos os Professores do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, que com o duro trabalho de cada um em sua área, desenvolveram e mantêm o respeito e prestígio desse extraordinário programa de pós-graduação.

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

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao Ensino Público que me deram oportunidade de concluir este trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Hipertensão:

Aos que não estão mais presentes no laboratório como: Vinícius (*in memoriam*) grande companheiro e que me ensinou muito do que sei... Edivaldo, que me ajudou imensamente enquanto fez parte de nossa equipe, Luíza Michelle, pela amizade de 6 anos, por ter tido a paciência de me ensinar muito do que sei e por ter sempre me incentivado. E também a Mirian, José Luiz e karina, amigos e Analina, Elton e Enyara pelo companheirismo.

E aos que fazem parte de nossa atual equipe como: Everton, companheiro de laboratório e que sempre me ajuda a solucionar problemas. Ao Rodrigo, outro grande amigo. À Telma, minha grande amiga e aos outros amigos do laboratório Rosana, Amanda, Rafaela, Carolina, Milla, Claudiane e Jamille pelo companheirismo e amizade.

À minha namorada e aluna de iniciação científica Grazi por ter colaborado na execução deste trabalho e por ter estado presente em minha vida durante esse período todo. Compreendendo-me, ajudando-me e me dando força para prosseguir sempre....

Agradeço profundamente à minha família e Irmã Narjara pela amizade.

“Foram etapas difíceis que passei em minha vida, em que percebi que muitos me deixaram de lado. No entanto, foi nesses momentos mais adversos é que percebi quem realmente queria meu bem acima de tudo... acima do seu inclusive... Foi aí que pude contar como sempre com o amor das pessoas que me amam acima de sua própria existência. Eles me deram a vida uma vez na minha concepção e dariam novamente caso necessário...”

Essas pessoas são os meus pais Clodoveu e Marly, meu porto seguro, a quem agradeço pelo carinho, compreensão, apoio, amizade e amor incondicional.

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

RESUMO

A hipertensão arterial pode ocorrer devido à hiperatividade de neurônios do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (Chan e cols., 1991; Boone e McMillen, 1994; Suzuki e cols., 1994; Minson e cols., 1996) e/ou devido a um tônus reduzido dos neurônios GABAérgicos do bulbo ventrolateral caudal (CVLM) que se projetam para a RVLM. (Smith e Barron, 1990b; a; Colombari e cols., 2001). Além disso, foi observado que durante a hipertensão ocorre uma elevação dos níveis de óxido nítrico (NO) na CVLM. No entanto, não existem estudos conclusivos acerca do papel do NO na CVLM durante o desenvolvimento e/ou manutenção desta patologia. Diante dessas considerações, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do NO na CVLM sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e sensibilidade da bradicardia reflexa em animais com hipertensão renovascular 2R1C.

Ratos fisher (150 a 200g) foram anestesiados com uma mistura de quetamina (50 mg/Kg, i.p.) e xilasina (5 mg/Kg, i.p.) para realização da cirurgia para indução da hipertensão renovascular (2R1C) ou fictícia (SHAM). Após 30 dias, os animais foram anestesiados com uretana (1,2g/kg, i.p.), posicionados em um aparelho estereotáxico para exposição do bulbo e instrumentados para registro da PAM e FC. A sensibilidade da bradicardia reflexa foi avaliada através da injeção de doses crescentes de fenilefrina (i.v.). Ao final dos experimentos os animais foram sacrificados, os rins e coração pesados e o cérebro submetido à análise histológica.

Os animais 2R1C apresentam menor peso relativo do rim esquerdo (clipado) ($0,28 \pm 0,02g$, $n=11$), maior peso relativo do rim contralateral ($0,52 \pm 0,05g$, $n=11$), maior peso relativo do coração ($0,41 \pm 0,02g$, $n=11$) e ventrículo esquerdo ($0,31 \pm 0,02$, $n=11$) e aumento da PAM (142 ± 3 mmHg, $n=36$) em comparação aos ratos SHAM ($0,34 \pm 0,01g$; $0,35 \pm 0,01g$; $0,30 \pm 0,01g$; $0,20 \pm 0,01g$, $n=11$ e 106 ± 2 mmHg, $n=42$ respectivamente)

A microinjeção de nitro-L-arginina-metil-ester, L-NAME (inibidor não seletivo do NO, 10nmol) na CVLM, produziu uma queda na PAM e na FC em animais 2R1C (-17 ± 3 mmHg e -29 ± 8 bpm, $n=7$, respectivamente) e em animais SHAM (-17 ± 3 mmHg e -39 ± 15 bpm, $n=6$, respectivamente). Já a microinjeção de L-ARGININA (precursor do NO, 50nmol) na CVLM produziu uma elevação na PAM de ratos 2R1C (11 ± 3 mmHg, $n=6$) e SHAM (11 ± 1 mmHg, $n=11$), além de alterações variadas sobre a FC em ambos os grupos (-12 ± 6 bpm, $n=6$, grupo SHAM; 8 ± 8 bpm, $n=11$, grupo 2R1C).

Em animais 2R1C, observamos que o tempo de duração da bradicardia produzida pela microinjeção de L-NAME na CVLM foi inferior (11 ± 1 min, $n=11$) ao tempo de duração em animais SHAM (23 ± 3 min, $n=6$). Adicionalmente, a duração do efeito hipertensor da microinjeção de L-ARGININA em animais 2R1C (26 ± 7 min, $n=4$) e das alterações variadas produzidas pela mesma sobre a FC (32 ± 5 min, $n=6$) foram superiores, quando comparado aos ratos SHAM (10 ± 2 min e 14 ± 4 min, $n=7-10$, respectivamente). Os efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção da L-ARGININA na CVLM foram abolidos pela microinjeção prévia de L-NAME na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.

A bradicardia reflexa dos animais 2R1C foi menor ($0,11 \pm 0,02$ ms/mmHg, $n=17$) quando comparada aos ratos SHAM ($0,42 \pm 0,08$ ms/mmHg, $n=14$). A microinjeção do L-NAME na CVLM produziu um aumento da sensibilidade da bradicardia reflexa em animais 2R1C ($0,18 \pm 0,04$ ms/mmHg, $n=8$) em comparação com a sensibilidade da bradicardia reflexa antes da microinjeção do L-NAME ($0,07 \pm 0,01$ ms/mmHg, $n=10$). Já a microinjeção de L-ARGININA na CVLM produziu uma redução da sensibilidade da bradicardia reflexa nos ratos SHAM ($0,29 \pm 0,03$ ms/mmHg, $n=6$) em relação à sensibilidade da bradicardia reflexa antes da microinjeção de L- ARGININA (de $0,52 \pm 0,08$ ms/mmHg, $n=6$).

Os resultados do presente estudo reforçam a idéia de que o NO esteja aumentado na CVLM durante a hipertensão arterial. Esses níveis elevados de NO parecem ter um papel inibitório sobre os neurônios da CVLM, contribuindo para o desenvolvimento e/ou manutenção da hipertensão renovascular e para a baixa sensibilidade do barorreflexo que ocorre nesta patologia.

ABSTRACT

Hypertension may occur due to hyperactivity of neurons in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) (Chan et al. 1991; Boone and McMillen, 1994, Suzuki et al. 1994; Minson et al., 1996) and/or due to a reduced tone of GABAergic neurons of the caudal ventrolateral medulla (CVLM) that projects to the RVLM. Furthermore, during hypertension occurs an elevation of nitric oxide (NO) in the CVLM. However, there are no conclusive studies about the role of NO in the CVLM during development and/or maintenance of this pathology. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of NO in the CVLM on the mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and reflex bradycardia in renovascular hypertensive rats (2K1C).

Male Fisher rats (150 to 200g) were anesthetized with a mixture of ketamine (50 mg / kg, ip) and xylazine (5 mg / kg, ip) for the 2K1C or SHAM surgeries. 30 days after these surgeries, the 2K1C and SHAM animals were anesthetized with urethane (1.2 g / kg, ip), positioned in a stereotactic apparatus to expose the medulla and instrumented for MAP and HR measurements. Baroreflex control of HR was determined by recording reflex heart rate changes in response to transient increases in MAP produced by repeated bolus injections of graded doses of phenylephrine (0.25 to 5 μ g, iv) before and after microinjections of L-NAME (10nmol) or L-ARGININE (50nmol). After carrying out the experiments the animals were sacrificed. The kidneys and heart were weighed and the brain submitted to histological analysis.

The 2K1C animals showed lower relative weight of the left kidney (clipped) (0.28 ± 0.02 g, n=11), increased relative weight of the contralateral kidney (0.52 ± 0.05 g, n=11), greater relative heart weight (0.41 ± 0.02 g, n=11) and left ventricle (0.31 ± 0.02 , n=11) and an increase in MAP (142 ± 3 mmHg, n = 36) compared to the SHAM rats (0.34 ± 0.01 g, 0.35 ± 0.01 g, 0.30 ± 0.01 g, 0.20 ± 0.01 g, n = 11 and 106 ± 2 mmHg, n=42 respectively)

The microinjection of L-NAME in the CVLM produced a fall in MAP and HR of both animals 2K1C (-17 ± 3 mmHg and -29 ± 8 beats/min, n=7, respectively) and SHAM animals (-17 ± 3 mmHg and -39 ± 15 beats/min, n=6, respectively). The microinjection of L- ARGININE in the CVLM produced an increase in MAP and variable changes in the HR in 2K1C (11 ± 3 mmHg and -12 ± 6 beats/min, n = 6, respectively) and in the SHAM rats (11 ± 1 mmHg and 8 ± 8 beats/min, n=11, respectively).

In 2K1C rats, we observed that the duration of the bradycardia produced by

microinjection of L-NAME in the CVLM was lower (11 ± 1 min, $n=11$) than in SHAM animals (23 ± 3 min, $n=6$). In addition, the duration of the hypertensive effect of microinjection of L- ARGININE in 2K1C rats (26 ± 7 min, $n=4$) and the variable changes produced by microinjection of L- ARGININE on the HR (32 ± 5 min, $n=6$) were higher when compared to SHAM rats (10 ± 2 min and 14 ± 4 min, $n=7-10$, respectively). Cardiovascular effects produced by microinjection of L- ARGININE in the CVLM were abolished by prior microinjection of L-NAME in the CVLM of SHAM and 2K1C rats.

The reflex bradycardia sensitivity in 2K1C animals was lower (0.11 ± 0.02 ms / mmHg, $n=17$) compared to SHAM rats (0.42 ± 0.08 ms / mmHg, $n=14$). The microinjection of L-NAME in the CVLM produced an increase in the reflex bradycardia sensitivity of 2K1C animals (0.18 ± 0.04 ms / mmHg compared to 0.07 ± 0.01 ms / mmHg, $n=10$; before L-NAME). In addition, the microinjection of L- ARGININE in the CVLM produced a reduction of reflex bradycardia only in SHAM rats (0.29 ± 0.03 ms / mmHg compared to 0.52 ± 0.08 ms / mmHg, $n = 6$; before L-arginine).

The results of this study reinforce the idea that NO participates in the development of hypertension, possibly by increasing its levels in the CVLM. Moreover, these high levels of NO appear to have an inhibitory role on the CVLM neurons, contributing to the low sensitivity of the baroreflex that occurs in the renovascular hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via clássica da síntese de NO pela NOS.....	22
Figura 2: Esquema da via do barorreflexo.....	27
Figura 3: Ativação de mecanismos dependentes da angiotensina através da estenose arterial renal unilateral.....	28
Figura 4: Foto ilustrativa do sistema de pletismografia de cauda.....	34
Figura 5: Ilustração anatômica do local das microinjeções no bulbo ventrolateral caudal (CVLM)	37
Figura 6: Teste da sensibilidade da bradicardia reflexa.....	39
Figura 7: Protocolo experimental I.....	41
Figura 8: Protocolo experimental II.....	41
Figura 9: Protocolo experimental III.....	42
Figura 10: Pressão arterial mensurada através da pletismografia.....	43
Figura 11: Fotos típicas dos rins de ratos com hipertensão renovascular 2R1C.....	45
Figura 12: Peso úmido relativo dos rins esquerdo e direito dos ratos SHAM e 2R1C.....	45
Figura 13: Correlação entre a PAM basal e o percentual de diferença de peso úmido relativo entre rins dos ratos 2R1C.....	46
Figura 14: Avaliação do peso úmido relativo do coração e componentes cardíacos de ratos SHAM e 2R1C.....	48
Figura 15: Avaliação direta da PAM e FC basais de ratos SHAM e 2R1C.....	49
Figura 16: Registro típico ilustrando o efeito da microinjeção de L-NAME na CVLM sobre a PAP, PAM e FC em ratos SHAM e 2R1C.....	51
Figura 17: Alterações na PAM e FC produzidos pela microinjeção de L-NAME na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.....	52
Figura 18: Registro típico ilustrando o efeito da microinjeção de L-arginina na CVLM sobre a PAP, PAM e FC em ratos SHAM e 2R1C.....	54
Figura 19: Alterações na PAM e FC produzidos pela microinjeção de L-arginina na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.....	55
Figura 20: Alterações na PAM e FC produzidos pela microinjeção de L-arginina antes e após a microinjeção de L-NAME na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.....	58
Figura 21: Sensibilidade da bradicardia barorreflexa em ratos SHAM e 2R1C.....	60

Figura 22: Registro típico ilustrando a bradicardia reflexa de ratos 2R1C após a microinjeção de L-NAME na CVLM.....	61
Figura 23: Sensibilidade da bradicardia barorreflexa após a microinjeção de L-NAME na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.....	62
Figura 24: Registro típico ilustrando a bradicardia reflexa dos ratos SHAM após a microinjeção de L-arginina na CVLM.....	63
Figura 25: Sensibilidade da bradicardia barorreflexa após a microinjeção de L-arginina na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.....	64
Figura 26: Fotografia da superfície ventral do bulbo ilustrando a localização das microinjeções na CVLM.....	66
Figura 27: Correlação da PAM com o peso relativo do rim direito, percentual de diferença entre rim esquerdo/direito e com o peso relativo do rim esquerdo.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Acompanhamento semanal da PAM basal.....	44
Tabela II: Valores do peso úmido relativo dos rins e percentual de diferença entre rins direito e esquerdo de ratos SHAM e 2R1C.....	46
Tabela III: Percentual de diferença de peso úmido entre rim esquerdo e direito de ratos 2R1C e PAM basal.....	47
Tabela IV: Valores do peso úmido relativo do coração e componentes cardíacas de ratos SHAM e 2R1C.....	48
Tabela V: Valores de PAM e FC dos ratos SHAM e 2R1C.....	50
Tabela VI: Variações PAM e FC produzidas pela microinjeção do L-NAME na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.....	53
Tabela VII: Variações PAM e FC produzidas pela microinjeção do L-arginina na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.....	56
Tabela VIII: Duração dos efeitos produzidos pelas microinjeções de L-NAME e L-arginina na CVLM sobre a PAM e FC de ratos SHAM e 2R1C.....	57
Tabela IX: Bloqueio promovido pelo L-NAME, dos efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de L-arginina na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.....	59
Tabela X: Sensibilidade da bradicardia reflexa em ratos SHAM e 2R1C.....	60
Tabela XI: Sensibilidade da bradicardia reflexa após a microinjeção de L-NAME na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.....	62
Tabela XII: Sensibilidade da bradicardia reflexa após a microinjeção de L-arginina na CVLM de ratos SHAM e 2R1C.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

NO – óxido nítrico

EDRF – fator vasodilatador associado ao endotélio vascular

NADPH – nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio

NOS – enzima óxido nítrico sintase

SNAP – S-nitroso N-acetilpenicilamina, doador de óxido nítrico

L-ARG – L-arginina, precursor do óxido nítrico

NOaq – solução aquosa de óxido nítrico

L-NMMA – N^G-monometil-L-arginina, inibidor não específico das isoformas de óxido nítrico sintase

LNA – N^G-nitro-L-arginina, inibidor não específico das isoformas da enzima óxido nítrico sintase

L-NAME – nitro-L-arginina-metil-ester, inibidor não específico das isoformas de óxido nítrico sintase

DEA/NO – dietilamina NONOate, doador de óxido nítrico

GMPc – guanosina monofosfato cíclico

cGC – guanilato ciclase solúvel

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

nNOS – enzima óxido nítrico sintase neuronal

eNOS – enzima óxido nítrico sintase endotelial

iNOS – enzima óxido nítrico sintase induzível

mtNOS – enzima óxido nítrico sintase mitocondrial

NMDA – receptores ionotrópicos do neurotransmissor excitatório glutamato

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

SNC – sistema nervoso central

SNS – sistema nervoso simpático

SNP – sistema nervoso parassimpático

SNA – sistema nervoso autônomo

ASR – atividade simpática renal

RPV – resistência periférica vascular

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

NTS – núcleo do trato solitário
VLM – bulbo ventrolateral
NA – núcleo ambíguo
APC – área pressora caudal
OVLT – órgão vascular da lâmina terminal
CVLM – área caudal do bulbo ventrolateral
SFO – órgão sub-fornical
DVC – complexo vagal dorsal
RVLM – área rostral do bulbo ventrolateral
CVLMr – porção rostral do bulbo ventrolateral caudal
CVLMc – porção caudal do bulbo ventrolateral caudal
MnPO – núcleo pré-óptico mediano
SON – núcleo supra-óptico
AP – área postrema
PAM – pressão arterial média
PAP – pressão arterial pulsátil
PA – pressão arterial
FC – frequência cardíaca
 Δ - delta, variação
 Δ **PAM** – variação da pressão arterial média
 Δ **FC** – variação da frequência cardíaca
mseg – milissegundo
IP – intervalo de pulso
min – minuto
1R1C – 1 rim, 1 clipe (modelo experimental de hipertensão de Goldblatt)
2R1C – 2 rins, 1 clipe (modelo experimental de hipertensão de Goldblatt)
SHR – linhagem de ratos espontaneamente hipertensos
SHAM – animal controle normotenso submetido à cirurgia fictícia
SRA – sistema renina angiotensina
Ang II – angiotensina II
Ang I – angiotensina I
Ang-(1-7) – angiotensina-(1-7)
ECA – enzima conversora de angiotensina I
ECA2 – enzima conversora de angiotensina II

AT1 – receptor angiotensinérgico do tipo 1 para angiotensina II
AT2 – receptor angiotensinérgico do tipo 2 para angiotensina II
AT1a – receptor angiotensinérgico do tipo 1a para angiotensina II
AT1b – receptor angiotensinérgico do tipo 1b para angiotensina II
MAS – receptor angiotensinérgico da angiotensina-(1-7)
BK – bradicinina
PM – peso molecular
UI – unidades internacionais
ml – mililitro
μl - microlitro
mg – miligrama
NaCl – cloreto de sódio
nl – nanolitro
cm – centímetro
g – grama
Kg – quilograma
mm – milímetro
μg – micrograma
i.v. – intravenoso
i.p. – intraperitoneal
ANOVA – análise de variância
EPM – erro padrão da média
mRNA – RNA mensageiro
PCR – reação em cadeia da polimerase, técnica de biologia molecular
PC – disco rígido

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
2. Objetivos.....	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3. Materiais e Métodos.....	32
3.1 Animais.....	32
3.2 Produção da Hipertensão Arterial Renovascular (2R1C)	32
3.3 Drogas e Preparo de Soluções.....	33
3.3.1 Drogas e Soluções.....	33
3.3.2 Preparo das Drogas Microinjetadas.....	33
3.4 Avaliação Indireta da Pressão Arterial.....	34
3.5 Confeção e Implantação das Cânulas Vasculares.....	35
3.6 Traqueostomia.....	35
3.7 Avaliação Direta da Pressão Arterial.....	36
3.8 Procedimentos para Exposição do Bulbo.....	36
3.9 Procedimento de Microinjeção no Bulbo Ventrolateral caudal.....	36
3.10 Teste da Sensibilidade do Controle Reflexo da FC.....	38
3.11 Análise Histológica do Bulbo.....	39
3.12 Análise do Peso dos Órgãos.....	40
3.13 Análise Estatística.....	40
3.14 Protocolos Experimentais.....	40
<i>Protocolo I:</i> Avaliação dos efeitos produzidos pelas microinjeções de L-NAME e L-arginina na CVLM sobre a PAM e FC.....	40
<i>Protocolo II:</i> Avaliação do efeito produzido pela microinjeção de L-arginina após a microinjeção de L-NAME na CVLM sobre a PAM e FC.....	41
<i>Protocolo III:</i> Avaliação da microinjeção do L-NAME ou L-arginina na CVLM sobre a sensibilidade da bradicardia reflexa.....	41
4. Resultados.....	43
4.1 Parâmetros para Caracterização da Hipertensão Renovascular 2R1C.....	43

4.1.1	Avaliação Semanal Indireta da PA.....	43
4.1.2	Avaliação do Peso Úmido dos Rins.....	44
4.1.3	Avaliação do Peso Úmido do Coração e Componentes Cardíacos de Ratos Normotensos SHAM e com Hipertensão 2R1C.....	47
4.2	Avaliação Direta dos Parâmetros Cardiovasculares.....	48
4.2.1	Efeito Produzido pela Microinjeção de L-NAME na CVLM de Ratos SHAM e 2R1C.....	50
4.2.2	Efeito Produzido pela Microinjeção de L-arginina na CVLM de Ratos SHAM e 2R1C.....	53
4.2.3	Duração dos Efeitos Cardiovasculares Produzidos pelas Microinjeções de L-NAME e L-arginina na CVLM de Ratos SHAM e 2R1C.....	56
4.2.4	Efeito Produzido pela Microinjeção de L-arginina após a Microinjeção de L-NAME na CVLM de Ratos SHAM e 2R1C.....	57
4.2.5	Avaliação da Sensibilidade da Bradicardia Reflexa antes e após a Microinjeção de L-NAME ou L-arginina na CVLM	59
4.2.6	Avaliação Histológica da CVLM.....	65
5.	Discussão.....	67
6.	Perspectivas.....	80
7.	Sumário.....	82
8.	Conclusão.....	83
9.	Referências.....	84
10.	Anexos.....	107
Anexo I.....		107
Anexo II.....		108

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são responsáveis por um terço de todas as mortes que acontecem no mundo e a hipertensão arterial é um dos maiores fatores de risco para surgimento das doenças cardiovasculares. A hipertensão está diretamente relacionada ao surgimento de doenças cerebrovasculares, doença isquêmica do miocárdio, falência renal e cardíaca (WHO, 2003). O tratamento desta doença está associado a uma redução de 40% do risco de acidente vascular cerebral e 15% de infarto do miocárdio (Collins e cols., 1990).

O Óxido Nítrico (NO), sintetizado em diversos órgãos e tecidos, possui uma multiplicidade de funções fisiológicas (Suhr e cols., 2009). O envolvimento desta molécula em diversos processos fisiológicos e patológicos tem motivado estudos em diversas morbidades, dentre elas a hipertensão arterial. (Touyz, 2004).

O NO é caracteristicamente uma molécula gasosa difusível, com meia vida curta e por ser altamente reativa interage com diferentes agentes biológicos através de reações redoxes covalentes (Suhr e cols., 2009). O mecanismo de sinalização intracelular do NO é, em geral, realizado através dos receptores de membrana celular da célula alvo; estes receptores são, habitualmente, transmembranosos tendo contato com o citoplasma e desencadeando uma “cascata” de sinais intracelulares (Schuman e Madison, 1991; Kubes e Granger, 1992).

Em 1984, Furchgott e colaboradores investigaram um fator vasodilatador associado ao endotélio vascular (endothelium-derived relaxing factor – EDRF) e poucos anos mais tarde conclui-se ser o NO responsável pela atividade biológica do EDRF (Ignarro e cols., 1987; Rees e cols., 1989).

Marletta e colaboradores (1988) identificaram o NO como produto da reação de oxiredução da L-arginina. A L-arginina é um aminoácido semi-essencial, já que pode ser sintetizada a partir do glutamato (Wu e Morris, 1998) ou produzida através da reciclagem da citrulina no ciclo da citrulina-NO com argininosuccinase sintase e argininosuccinato liase (Wiesinger, 2001). A L-arginina é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) para produzir o NO e citrulina em um processo que requer nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH) e oxigênio (O₂)

A figura 1 indica a clássica reação química de formação do NO, em que a L-arginina é transformada em um intermediário do NO, a N^G-hidroxi-L-arginina com a presença de NADPH, sendo necessário mais NADPH e O₂ para a formação de L-citrulina e NO.

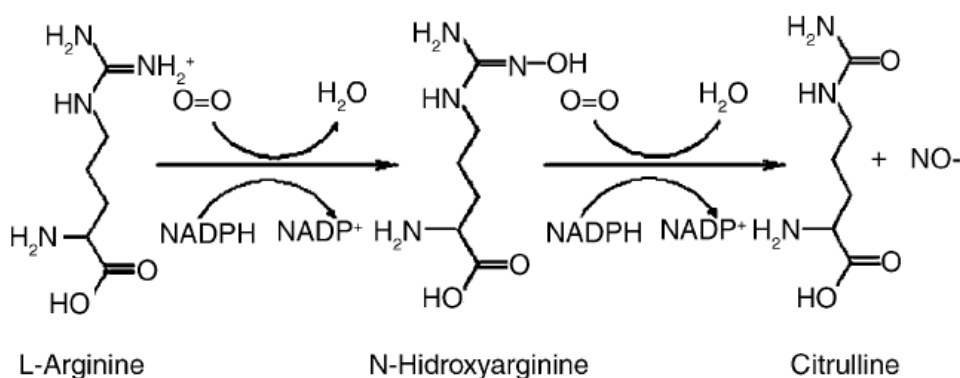


Figura 1: Reação clássica da síntese de NO pela NOS. A L-arginina na presença de NADPH e O₂ é oxidada a N-hidroxi-arginina, que é re-oxidada a citrulina produzindo NO (Guix e cols., 2005).

A síntese enzimática de citrulina e NO (Figura 1) 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 (Rees e cols., 1990).

Existem formas alternativas da produção de NO através de reações específicas como sua liberação a partir do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e L-arginina por via não enzimática (Nagase e cols., 1997), ou pela redução de nitritos ou outras reações de redução em processos de isquemia (Maiese e Boccone, 1995). No entanto, a maioria absoluta do NO é produzido enzimaticamente por 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”, denominadas NOSs (Green e cols., 2004).

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

A nNOS foi purificada inicialmente no cerebelo de camundongos e porcos (Schmidt e cols., 1991). A nNOS é uma isoforma dependente de cálcio intracelular, ocorrendo sua inativação abaixo de uma determinada concentração deste mineral (Alderton e cols., 2001).

A eNOS foi originalmente identificada no endotélio vascular e sua ação regula a resistência dos vasos. Sua atividade também é cálcio-calmodulina dependente e no SNC está predominantemente presente no endotélio dos vasos cerebrais, em populações de neurônios (Dinerman e cols., 1994) e em células da glia (Wiencken e Casagrande, 1999).

Portanto, a nNOS e eNOS são enzimas cálcio-calmodulina-dependentes e são constitutivamente expressas em células de mamíferos e geram NO por poucos minutos (Mungrue e cols., 2003).

A iNOS não é expressa constitutivamente, ou seja, não está presente de modo habitual, sendo induzida em macrófagos, astrócitos e outras células por lipopolissacarídeos bacterianos ou citocinas (Stuehr e cols., 1991). Essa isoforma tem sua atividade independente do cálcio (Alderton e cols., 2001). Vários grupos clonaram a iNOS em diversos tecidos como músculo liso (Teng e cols., 1998) e hepatócitos de camundongos e humanos (Stuehr e cols., 1991). A iNOS é expressa após a estimulação de macrófagos, astrócitos, micróglia, e outras células em processos imunológicos e inflamatórios, sendo que a produção de NO é alta nestas situações, e dura horas ou dias (Hartung e cols., 1992; Pender e Rist, 2001). No sistema nervoso central (SNC), a iNOS é encontrada em células da glia e sua indução está associada à resposta imune inespecífica do SNC em condições patológicas (Murphy, 2000).

A mtNOS é uma isoforma da nNOS presente no interior da membrana da mitocôndria (Elfering e cols., 2002) e sua forma constitutiva é denominada de mtNOS (Tatoyan e Giulivi, 1998). A mtNOS foi isolada no fígado, rins, pulmões, baço, testículo, coração, músculos e cérebro (Elfering e cols., 2002). A função da mtNOS na mitocôndria parece estar relacionada a regulação do consumo de O_2 através da inibição da citocromo oxidase C (Brown e Cooper, 1994). A modulação do consumo de O_2 através do NO mitocondrial é transitória e reversível porque o NO é gerado em pequenas quantidades. A mtNOS foi identificada como uma isoforma da nNOS α (Elfering e cols., 2002) e provavelmente é codificada pelo mesmo gene da nNOS, já que camundongos nocautes para nNOS (camundongos que não expressam a nNOS) não possuem mtNOS (Kanai e cols., 2001).

Atualmente já se sabe que os níveis das isoformas das NOSs podem ser induzidas sobre determinados estímulos (Alderton e cols., 2001). Diferentes autores demonstraram que em condições normais as células endoteliais expressam uma pequena quantidade de eNOS em resposta ao estímulo vasodilatador sanguíneo (estresse de cisalhamento) (Schulz e cols., 2005).

O NO também é um neurotransmissor e neuromodulador do SNC e periférico através de mecanismos dependentes de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Bredt e Snyder, 1994; Trabace e Kendrick, 2000; Prast e Philippu, 2001; Lewko e Stepinski, 2002). O papel do NO central foi reconhecido antes mesmo de sua natureza química. Garthwaite e colaboradores (1988) foram os primeiros a observar que a ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), (receptores ionotrópicos do neurotransmissor excitatório glutamato), resultaram na liberação de NO. As ações da nNOS foram associadas com a percepção de dor, especialmente em nível da medula espinhal (Yamamoto e cols., 1993), controle do

sono, apetite e termoregulação (Monti e Jantos, 2004) desenvolvimento neural (Carden e cols., 2003) e plasticidade sináptica (Dinerman e cols., 1994).

O NO já foi identificado como participante de mecanismos fundamentais de controle do sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP) em importantes centros cardiovasculares, tais como núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), (Horn e cols., 1994) núcleo do trato solitário (NTS) (Tseng e cols., 1996) e bulbo ventrolateral (VLM) (Shapoval e cols., 1991; Tseng e cols., 1996). Estes núcleos centrais fazem parte de um importante circuito relacionado ao controle de funções cardiovasculares que envolve ainda outras regiões, como núcleo ambíguo (NA) e área pressora caudal (APC) (Guyenet, 2006).

O PVN já é bem reconhecido como tendo um papel importante no controle da pressão arterial (PA) (Swanson e Sawchenko, 1983; Krukoff e Khalili, 1997). A porção do PVN relacionada ao controle da atividade do SNS, controle da PA e do tônus vasomotor encontra-se na subdivisão parvocelular e atua sobre áreas inferiores do tronco cerebral como o NTS, complexo vagal dorsal (DVC), a área rostral do bulbo ventrolateral (RVLM) e medula espinhal (Armstrong e cols., 1980; Porter e Brody, 1985; Zhang e Ciriello, 1985; Horn e cols., 1994; Portillo e cols., 1998; Ranson e cols., 1998; Shafton e cols., 1998; Pyner e Coote, 1999; Benarroch, 2005; Brooks e cols., 2005; Coote, 2005). O PVN ainda possui conexões com os órgãos circumventriculares, como órgão sub-fornical (SFO) e órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), que por serem áreas centrais com a barreira hematoencefálica mais permeável, deixam o PVN susceptível a ação de agentes periféricos (Krukoff e cols., 1997).

O NTS é o local primário das aferências periféricas dos barorreceptores arteriais, dos receptores cardiopulmonares e dos quimiorreceptores (Talman e cols., 2001; Lin e Talman, 2005). Localizado na porção dorsomedial do bulbo, a região recebe, processa e integra as informações aferentes vindas da periferia e posteriormente origina sinais eferentes que são transmitidos via conexões com as áreas de controle autonômico bulbar para determinar o grau de atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) (Feldman e Ellenberger, 1988; Feldman e Moises, 1988). Os sensores periféricos de estiramento dos vasos são os pressorreceptores, que são mecanorreceptores, que respondem às alterações da PA. Eles consistem de porções terminais de fibras nervosas não diferenciadas que se ramificam nas camadas adventícias e médias do seio carotídeo e arco aórtico. As fibras aferentes dos pressorreceptores trafegam para o bulbo através dos nervos glossofaríngeo e vago, convergindo para o NTS (Scher, 1977). As informações periféricas são processadas e respostas eferentes originadas através de sub-núcleos do NTS (NTS comissural e intermediário) que participam do controle das funções cardiovasculares. Estas porções do NTS são ricamente inervadas por fibras que se dirigem para outras áreas que participam do

controle cardiovascular como núcleo parabraquial, hipotálamo medial, amígdala e área caudal do bulbo ventrolateral (CVLM) (Howe, 1985; Simon e cols., 1985; Agarwal e Calaresu, 1991; Murphy e cols., 1994; Yu e Gordon, 1996; Colombari e cols., 2001) e RVLM.

O sistema do barorreflexo pode ser ativado através de aumentos agudos da PA, o que diminui a descarga do tônus simpático cardíaco, resultando em uma diminuição da frequência cardíaca (FC) e da contratilidade ventricular. As alterações reflexas do SNS são acompanhadas por alterações recíprocas na atividade do SNP. A inervação parassimpática cardíaca se faz através do vago inervando o átrio e o especializado sistema de condução em nível do nodo átrio-ventricular. O componente parassimpático da atividade barorreflexa deprime a função das células marca-passo e o sistema cardíaco de condução. A ação do SNP se faz sobre a atividade cardíaca, enquanto o SNS além de modular a função cardíaca diretamente, atua ainda sobre os vasos sanguíneos, aumentando a resistência periférica vascular (RPV) (Guyenet, 2006). Portanto, este reflexo pressoreceptor é o principal e mais eficiente mecanismo de controle neural da pressão arterial em curto prazo, não apenas por trazer a PA para os níveis normais, mas também por tamponar as flutuações de pressão decorrentes das diferentes atividades posturais e mesmo respiratórias (Guyenet, 2006). Estudos clínicos mostraram, por exemplo, que uma reduzida sensibilidade do barorreflexo está associada com a morte súbita que se segue ao infarto agudo do miocárdio (Campagnole-Santos e Haibara, 2001).

A RVLM é tipicamente conhecida como uma área pressora (Guertzenstein e Silver, 1974) 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 (Dampney, 1994a). A RVLM é a área central excitatória do SNS e origina sinais excitatórios através de um conjunto de neurônios glutamatérgicos. Um sub-grupo de neurônios da RVLM também sintetiza adrenalina e são denominados neurônios C1 (Cao e Morrison, 2001; Guyenet e cols., 2004), dos quais, nem todos, participam do controle do barorreflexo (Ritter e cols., 2001). Praticamente todos neurônios da RVLM que participam do controle cardiovascular liberam o neurotransmissor excitatório glutamato.

A CVLM é caracterizada como sendo uma região depressora (Guertzenstein e Lopes, 1984; Sved e cols., 1985; Willette e cols., 1987). A estimulação dessa área provoca hipotensão, com conseqüente vasodilatação de diversos territórios vasculares, incluindo os leitos mesentérico, da musculatura esquelética e renal (Cravo e cols., 1991; Cravo e Morrison, 1993; Dampney, 1994a). A atividade tônica da CVLM é mantida através de uma combinação de sinapses excitatórias (glutamatérgicas) e inibitórias (GABAérgicas), embora as fontes para estes sinais ainda permaneçam não totalmente compreendidas (Blessing e Reis, 1983; Guyenet e cols., 1987). Já está bem estabelecido que esta região é rica em

neurônios gabaérgicos (Stornetta e Guyenet, 1999) e muitos destes neurônios GABAérgicos inibem tonicamente os neurônios simpato-excitatórios na RVLM (Cravo e Morrison, 1993; Badoer e cols., 1994; Dampney, 1994b) levando a uma diminuição da atividade do SNS e à uma consequente redução da PA (Agarwal e cols., 1989; 1990; Masuda e cols., 1991; Minson e cols., 1997; Chan e Sawchenko, 1998; Schreihofe e Guyenet, 2002). A inibição da atividade neuronal da CVLM, bloqueio de seus receptores, ou mesmo destruição mecânica da região, aumenta significativamente a atividade neuronal da RVLM, atividade do SNS e a PA (Agarwal e cols., 1989; 1990; Natarajan e Morrison, 1999; Schreihofe e cols., 2005).

A CVLM é essencial para a maioria dos reflexos simpato-inibitórios produzidos pela ativação do NTS (Colombari e cols., 2001), visto que o bloqueio da transmissão glutamatérgica do NTS para a CVLM reduz a atividade neuronal desta região (Guyenet e cols., 1987; Agarwal e cols., 1989). Sendo assim, a projeção excitatória do NTS para a CVLM exerce um importante controle da resposta da CVLM frente a eventos cardiovasculares periféricos, como uma elevação ou diminuição da PA (Schreihofe e Guyenet, 2002).

Conexões da CVLM com outros núcleos centrais também já foram descritas. Em 1997, McKittrick e Calaresu sugeriram a existência de interações recíprocas entre o NA e a CVLM no controle da atividade do SNP. Em outros estudos da literatura (Saper e cols., 1983; Tucker e cols., 1987; Tanaka e cols., 1997) foi mostrado que os neurônios A1 da CVLM estão reciprocamente conectados com regiões hipotalâmicas, como núcleo pré-óptico mediano, (MnPO), SFO, PVN e núcleo supra-óptico (SON), participando das respostas cardiovasculares induzidas por mudanças agudas no volume ou composição do fluido extracelular.

A contribuição da CVLM para gênese e manutenção da hipertensão ainda não está completamente estabelecida (Averill e Diz, 2000; Sved e cols., 2000; Cangussu e cols., 2009). Estudos da literatura mostraram que durante a hipertensão ocorre uma hiperatividade de neurônios da RVLM (Chan e cols., 1991; Boone e McMillen, 1994; Suzuki e cols., 1994; Minson e cols., 1996). 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 (Smith e Barron, 1990b; a; Colombari e cols., 2001), o que poderia explicar o aumento da atividade do SNS observada nesses modelos de hipertensão (Smith e Barron, 1990b; Muratani e cols., 1993; Mandel e Schreihofe, 2008).

A porção do circuito de controle do barorreflexo que envolve o NTS, RVLM e CVLM esta descrito na Figura 2.

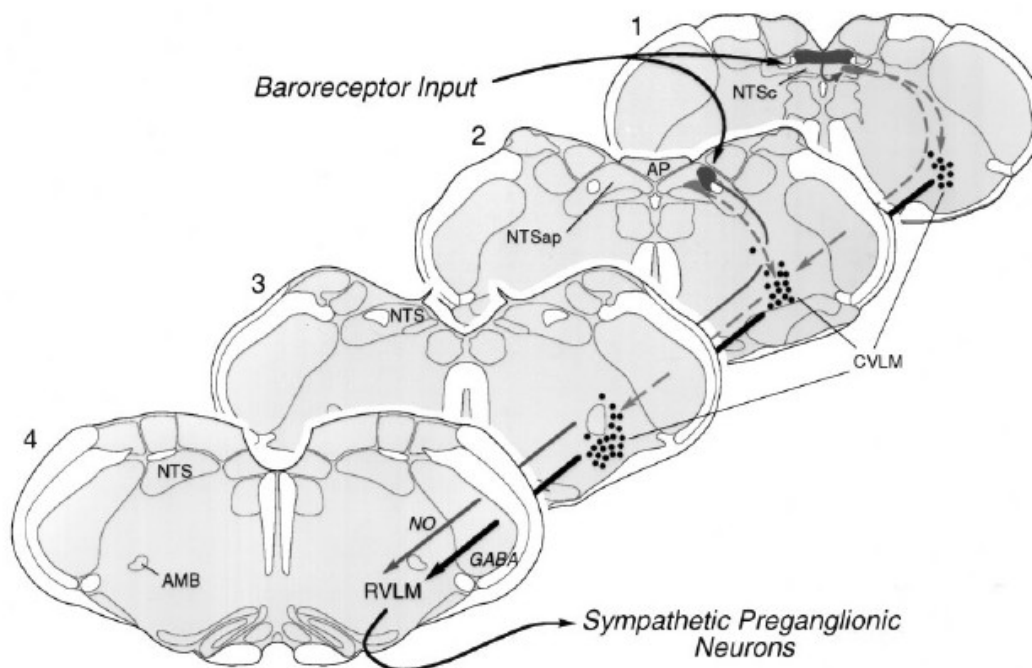


Figura 2: Resumo da organização da via do barorreflexo medular. AMB, núcleo ambíguo; AP, área postrema; NTS, núcleo do trato solitário; NTSap, NTS em nível da área postrema; NTSc, NTS comissural; RVLM, área rostral do bulbo ventrolateral; CVLM, área caudal do bulbo ventrolateral; NO, óxido nítrico (Chan e Sawchenko, 1998)

Uma terceira área na superfície ventrolateral do bulbo localizada caudalmente à CVLM, entre as raízes do nervo hipoglosso e o primeiro nervo cervical, foi descrita por Feldberg e Guertzenstein (1986), como área pressora caudal (APC). A região possui neurônios com atividade pressora tônica que contribuem para manutenção dos níveis basais de PA, tendo um importante papel na manutenção do tônus vasomotor (Gordon e McCann, 1988) devido à suas conexões excitatórias com a RVLM (Campos e cols., 2008).

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), 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) (Goldblatt e cols., 1934).

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 (Huang e cols., 1982; Ploth, 1983; Braam e cols., 1995; Imamura e cols., 1995). 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 antiotensina (SRA) e eleva os níveis de Angiotensina II (Ang II) (Navar e cols., 1995). Os altos níveis circulantes de Ang II possuem efeitos vasculares

diretos como o aumento da RPV, o que contribui para a elevação da PA (Navar e cols., 1995). Com o progressivo aumento PA sistêmica e pressão de perfusão ocorre aumento do fluxo sanguíneo para o rim contralateral não clipado, o que depleta seus níveis de renina. Por mecanismos ainda não totalmente compreendidos, o rim não-estenótico 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 (Navar e cols., 1998). (Figura 3).

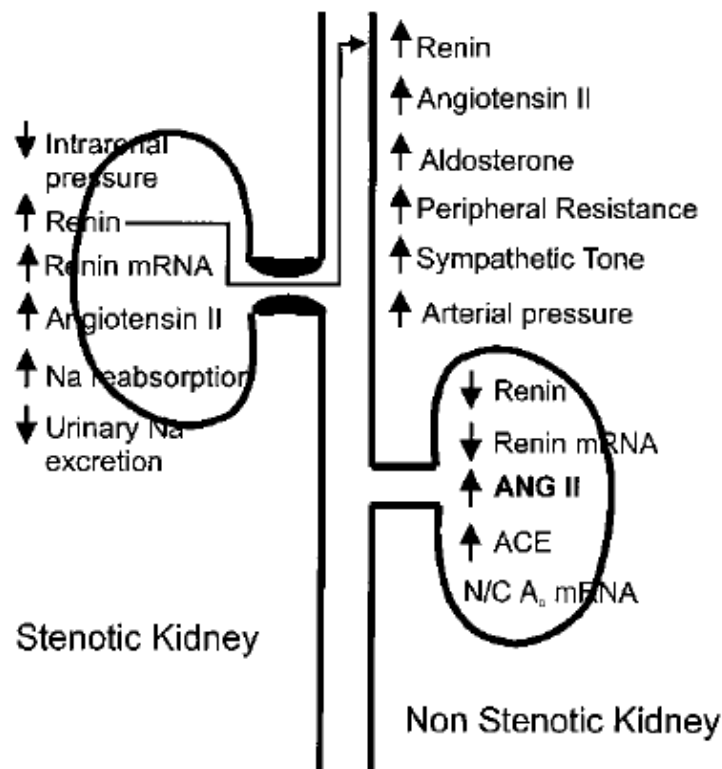


Figura 3: Ativação de mecanismos dependentes da angiotensina através da estenose arterial renal unilateral. Após a estenose renal ocorre o aumento da formação de renina pelo rim clipado, o que promove aumentos dos níveis circulantes de angiotensina II (Ang II), levando à várias mudanças mediadas pela Ang II. ACE, enzima conversora de angiotensina; A₀, Angiotensinogênio; mRNA, RNA mensageiro; N/C, não observância de mudanças (Navar e cols., 1998).

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 pela hidrólise do angiotensinogênio pela 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) (de Gasparo, 2000; Kaschina e Unger, 2003). O receptor AT₁ medeia tanto os efeitos fisiológicos clássicos da Ang II, como regulação da PA, do balanço hidroeletrolítico e comportamentos associados à sede e ingestão de sódio, quanto efeitos patológicos como hipertrofia cardíaca patológica e hipertensão (Suzuki e cols., 1993; Obayashi e cols., 1997; Unger, 2003). Dois subtipos do receptor AT₁ foram identificadas em ratos e camundongos, os receptores AT_{1A} e AT_{1B} (Sasamura e cols., 1992). Os efeitos induzidos pela interação da Ang II com o receptor AT₂ são menos claros. Acredita-se que esse receptor esteja relacionado à regulação da PA, natriurese, temperatura corporal, reprodução, desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, reparo de tecidos e morte celular programada (Felix e cols., 1991; Ambuhl e cols., 1992; Wright e Harding, 1994; Steckelings e cols., 2005). A ligação da Ang II ao seu receptor AT₂ produz efeitos que têm sido caracterizados como contrareguladores dos efeitos mediados pelo AT₁, tanto em curto como em longo prazo (Masaki e cols., 1998; Horiuchi e cols., 1999; Levy, 2005) tendo um papel protetor contra a hipertensão.

A fragmentação do octapeptídeo Ang II, através da remoção da fenilalanina de sua porção carboxi-terminal, resulta na formação da Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. Esta conversão é eficientemente catalisada pela recém descoberta enzima conversora de Angiotensina II (ECA2), um análogo da ECA (Harmer e cols., 2002; Vickers e cols., 2002). A Ang-(1-7) também pode ser formada diretamente a partir da Ang I, uma conversão mediada por várias enzimas como a proliendopetidase nas células vasculares (Santos e cols., 1992), endopeptidase neutral na circulação e rins (Shaltout e cols., 2007) e oligopeptidases (Gallagher e cols., 2008). Muitos estudos mostraram que a Ang-(1-7) possui efeitos, na maioria das vezes, opostos aos produzidos pela Ang II (Ferrario e cols., 1997; Santos e cols., 2000; Santos e cols., 2005). Nos vasos, além de potencializar a ação vasodilatadora da bradicinina (BK) (Paula e cols., 1995; Brosnihan e cols., 1996; Lima e cols., 1997; Almeida e cols., 2000; Fernandes e cols., 2001) ainda inibe o crescimento de células musculares lisas (Freeman e cols., 1996; Strawn e cols., 1999; Tallant e cols., 1999; Machado e cols., 2000). Estudos (Almeida e cols., 2000; Santos e cols., 2000; Faria-Silva e cols., 2005) têm mostrado que estes efeitos anti-hipertensivos da ang-(1-7) estão associados à liberação de NO.

Aumentos da expressão das isoformas de NOS alcançam uma importância singular durante a hipertensão arterial, na qual a produção de NO parece estar seletivamente aumentada em áreas centrais em resposta à elevação da atividade do SNS (Dampney, 1994a; Horn e cols., 1994; Hirooka e cols., 1996; Tseng e cols., 1996; Martins-Pinge e cols., 1997; Plochocka-Zulinska e Krukoff, 1997; Matsumura e cols., 1998). A maioria dos estudos a respeito das ações cardiovasculares do NO na VLM tiveram como foco a RVLM e com isso pouco se sabe das ações cardiovasculares do NO na CVLM. Como já mencionado, durante

a hipertensão 2R1C, a CVLM apresenta uma reduzida capacidade simpato-inibitória sobre neurônios da RVLM (Smith e Barron, 1990b; Muratani e cols., 1993; Sved e cols., 2000), o que poderia ser uma das causas da elevação da PA, aumento da atividade do SNS e da baixa sensibilidade da bradicardia reflexa que ocorre durante a hipertensão (Kawashima e cols., 1987; Moreira e cols., 1988; Whitescarver e cols., 1990; Berenguer e cols., 1991; Grassi e cols., 2000; Ketch e cols., 2002; Rodrigues e cols., 2007; Cangussu e cols., 2009). Além disso, estudos da literatura mostraram que a expressão da nNOS mostra-se aumentada na CVLM em animais SHR e com hipertensão renovascular 2R1C (Krukoff e cols., 1995; Plochocka-Zulinska e Krukoff, 1997), entretanto, não existem trabalhos conclusivos acerca da importância desta alteração dos níveis de NO da CVLM sobre parâmetros cardiovasculares, durante a hipertensão 2R1C.

Diante destas considerações, nossa hipótese é que o NO da CVLM poderia estar envolvido no desenvolvimento e/ou manutenção da hipertensão renovascular 2R1C e na menor sensibilidade da bradicardia reflexa que ocorre nesta patologia. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do NO na CVLM sobre parâmetros cardiovasculares como pressão arterial média (PAM), FC e sensibilidade da bradicardia reflexa em animais com hipertensão renovascular 2R1C.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do NO no bulbo ventrolateral caudal (CVLM) sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e sensibilidade da bradicardia reflexa em ratos com hipertensão renovascular dois rins, um clipe (2R1C).

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o peso úmido relativo dos rins (clipados e não clipados) dos animais com hipertensão renovascular 2R1C.
2. Avaliar o peso úmido relativo do coração (átrios, ventrículo direito e ventrículo esquerdo) de animais normotensos (SHAM) e 2R1C.
3. Avaliar o efeito da inibição da produção do NO, através da microinjeção de L-NAME na CVLM, sobre a PAM e FC em animais SHAM e 2R1C.
4. Avaliar o efeito do aumento da produção do NO, através da microinjeção do precursor do NO, L-arginina, na CVLM, sobre a PAM e FC em animais SHAM e 2R1C.
5. Avaliar o tempo de duração dos efeitos cardiovasculares produzidos pelas microinjeções de L-NAME e L-arginina na CVLM em ratos SHAM e 2R1C.
6. Avaliar os efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de L-arginina após a microinjeção de L-NAME na CVLM em animais SHAM e 2R1C.
7. Avaliar o efeito das microinjeções de L-NAME e L-arginina na CVLM, sobre a sensibilidade da bradicardia reflexa em ratos SHAM e 2R1C

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Fischer, pesando entre 150 e 200g, fornecidos pelo Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto-MG. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Experimental da Universidade Federal de Ouro Preto-MG.

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). 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 PAM > 130 mmHg, após 30 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

- **L-NAME (inibidor não seletivo das isoformas de NOS):** {Peso molecular (PM): 270,0} Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.
- **L-arginina (precursor da síntese de NO, catalisada pelas isoformas de NOS):** (PM: 174,5) Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.
- **Agente hipertensor agonista adrenérgico:** cloridrato de L-Fenilefrina adquirida de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.
- **Anestésicos:** - **Uretana** (PM: 89,09), adquirida de Sigma Chemical Co., 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 do L-NAME

O L-NAME foi dissolvido em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) na concentração de 0,135 mg/ μ l, imediatamente aliquotado (5 μ l), e acondicionado em microtubos de polietileno tipo “Ependorff” a -20°C. No dia do experimento dilui-se o conteúdo de um microtubo a 20 μ l de solução fisiológica de NaCl. A quantidade microinjetada de L-NAME foi de 10nmol em 100nl. A concentração e quantidade da droga a ser microinjetada foram escolhidas de acordo com estudos prévios da literatura (Kagiyama e cols., 1997; Lage e cols., 1999; Mayorov, 2007b).

Preparo da L-arginina

A L-arginina foi dissolvida em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) na concentração de 0,1746 mg/ μ l, imediatamente aliquotado (25 μ l), e acondicionado em microtubos de polietileno tipo “Ependorff” a -20°C. No dia do experimento dilui-se o conteúdo de um microtubo com mais 25 μ l de solução fisiológica de NaCl. A quantidade microinjetada de L-arginina foi de 50nmol em 100nl. A concentração e quantidade da droga a ser microinjetada foram escolhidas a de acordo com dados prévios da literatura (Lage e cols., 1999).

Preparo da Fenilefrina

Foram preparadas soluções em sete concentrações (0,5 µg/ ml; 1,0 µg/ ml; 2,5 µg/ ml; 5,0 µg/ ml; 10 µg/ ml, 20 µg/ ml e 50 µg/ ml) utilizando cloridrato de L-Fenilefrina. Estas soluções foram aliquotadas em microtubos de polietileno tipo “Ependorff” e permaneceram congeladas até o momento do uso.

3.4 Avaliação Indireta da Pressão Arterial Através da Utilização da Pletismografia de Cauda

Para acompanhar o desenvolvimento da hipertensão renovascular foi utilizado método indireto de medida da PA por pletismografia de cauda. O sistema utilizado foi proposto por Willians e colaboradores em 1939 e modificado por Magaldi (1944). O aparelho utilizado consiste de um sistema fechado (coluna de vidro) contendo água, que sobre pressão ajusta um manguito de borracha (látex) a toda porção distal da cauda do animal. A parte proximal da cauda é envolvida por um outro manguito de borracha, (de três centímetros de comprimento) que está conectado à uma coluna de mercúrio e é responsável pela oclusão da artéria caudal. A figura 4 ilustra a foto do pletismógrafo.

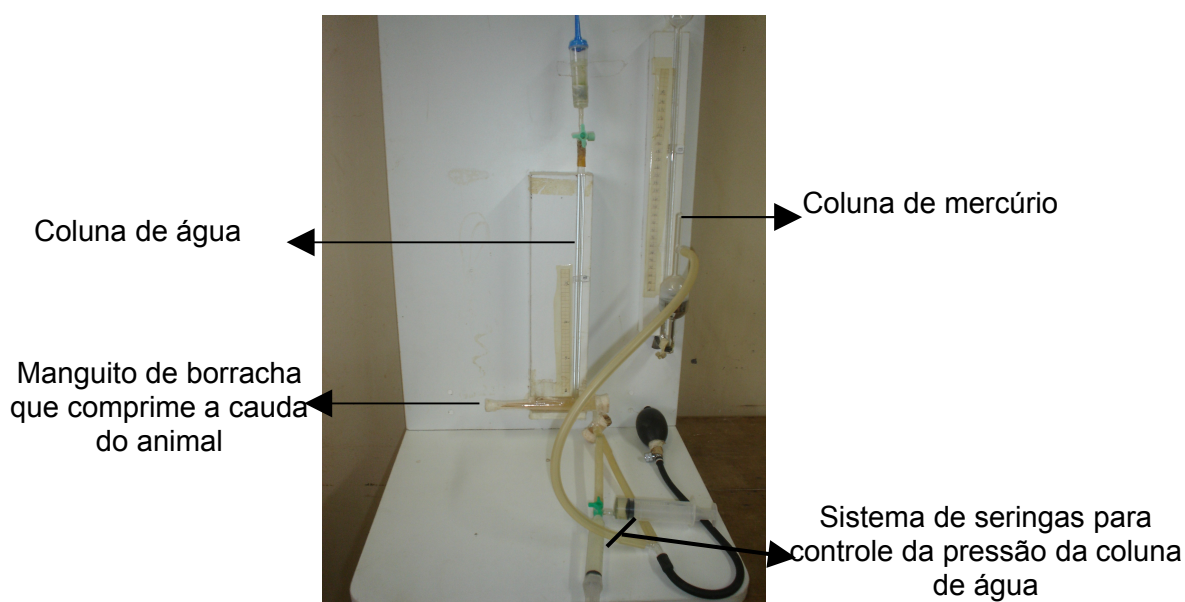


Figura 4: Foto ilustrativa do sistema de pletismografia de cauda utilizado.

Para provocar dilatação das artérias periféricas e facilitar a medida da pressão, os animais tiveram sua cauda previamente aquecida em uma caixa de madeira com uma lâmpada incandescente de 150 watts. A seguir, os animais foram colocados em um sistema de contenção para proceder a medida. Neste sistema de contenção somente a cauda do

animal foi mantida exteriorizada. Posteriormente a cauda era inserida no pletismógrafo, comprimida pela pressão da coluna de líquido através da aderência do látex à cauda do animal e o manguito conectado à coluna de mercúrio foi insuflado. Em seguida, a pressão na coluna de água do pletismógrafo foi reduzida, graduando-se o nível do líquido na coluna para aproximadamente 15 cm de altura. Em seguida, a pressão no manômetro de mercúrio foi reduzida lentamente ao mesmo tempo em que se aguardava a elevação no nível de líquido na coluna de água do pletismógrafo, o que ocorria em função do retorno de sangue a cauda do animal. Portanto, quando a água da coluna do pletismógrafo se elevava era realizada a leitura da coluna de mercúrio, que correspondia a PAM basal do animal.

3.5 Confecção e Implantação das Cânulas Vasculares

Na confecção 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 vículo-nervoso femural. 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 (i.p).

3.6 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.

3.7 Avaliação Direta da Pressão Arterial

A pressão arterial 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.

3.8 Procedimentos para Exposição do Bulbo

Os animais foram colocados em decúbito ventral em um aparelho estereotático (David Kopf modelo DKI 900) para realização da cirurgia para exposição do bulbo. A inclinação da cabeça foi mantida em uma angulação de aproximadamente 30° e a -11mm 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.

3.9 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 estereotático. 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. 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. Além disso, o tempo gasto para microinjeção de cada volume de 100 nL foi

superior a 15 segundos. As drogas foram microinjetadas unilateralmente na área caudal do bulbo ventrolateral (CVLM) esquerda tendo o óbex como ponto de referência antero-posterior e lateral de acordo com as seguintes coordenadas: **CVLM** – 0,7 mm rostral e 1,8 mm lateral esquerdo ao óbex.

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. A confirmação final do posicionamento correto da micropipeta foi feita através da análise histológica do bulbo. A localização da região da microinjeção está ilustrada na figura 5.

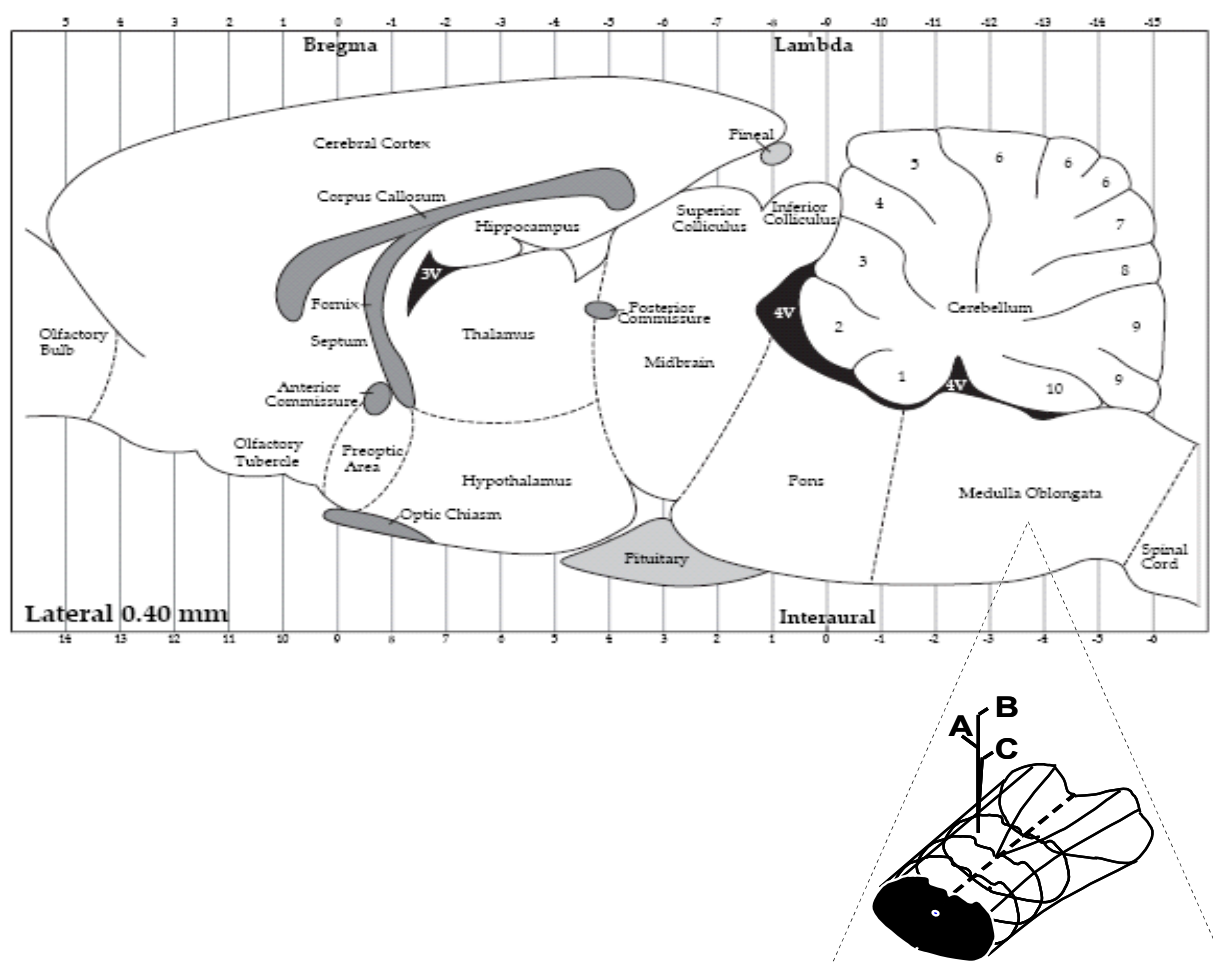


Figura 5: Demonstração anatômica do local de realização das microinjeções no bulbo ventrolateral caudal (CVLM) de ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C. As microinjeções foram realizadas com micropipeta de vidro de 3 pontas (A, B, C). Adaptado de Paxinos e Watson, 1986.

3.10 Teste da Sensibilidade do Controle Reflexo da FC

A sensibilidade do reflexo pressoreceptor foi avaliada relacionando-se as alterações reflexas da FC induzidas por alterações transitórias da PAM. Para produzir alterações da PAM, os animais foram submetidos à injeções endovenosas (em bolus) (0,1 ml) de doses crescentes de fenilefrina que variaram de 0,5 a 50,0 µg de maneira a se obter respostas pressoras crescentes. Um intervalo mínimo de um minuto foi mantido entre as injeções, para permitir que a PAM e FC retornassem aos valores basais.

A alteração máxima da FC verificada durante os primeiros cinco segundos da resposta pressora correspondente foi convertida a intervalo de pulso (IP,ms) através da fórmula do IP (Figura 6B). A sensibilidade do reflexo pressoreceptor foi expressa pela razão entre a alteração da FC em intervalo de pulso (mseg) e a alteração da PAM (mmHg) que denominamos “índice de sensibilidade do reflexo pressoreceptor”. O melhor ajuste da regressão linear foi extraído da média $\pm$ EPM para alterações de PAM e FC para cada dose de fenilefrina e para cada animal (Figura 6B). A curva de regressão linear foi usada como um índice de sensibilidade barorreflexa. A bradicardia reflexa foi avaliada antes e após as microinjeções de L-NAME e L-ARGININA na CVLM de animais normotensos e hipertensos.

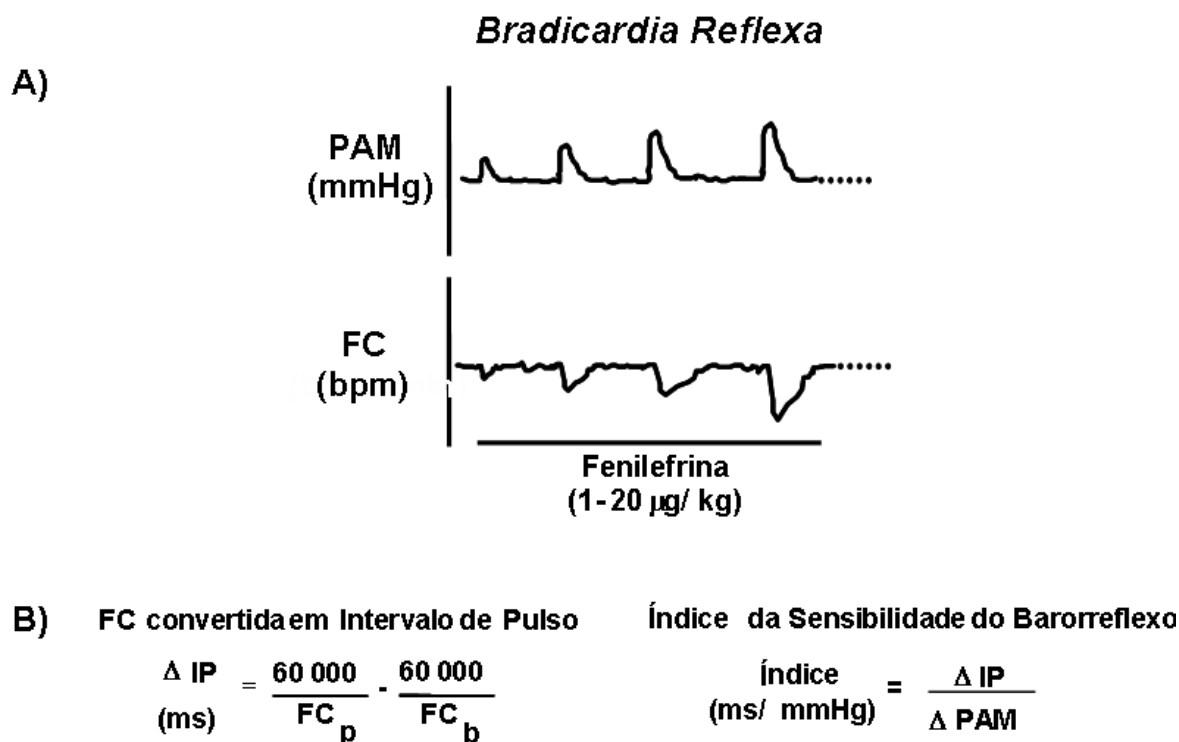


Figura 6: Esquema demonstrando o teste da bradicardia reflexa através de microinjeções de doses crescentes de fenilefrina (painel A) e fórmulas de conversão da frequência cardíaca (FC, bpm) em intervalo de pulso (IP, ms) e do índice de sensibilidade barorreflexa (ms/mmHg) (painel B). Pressão arterial média (PAM, mmHg); frequência cardíaca de pico (FCp, bpm); frequência cardíaca basal (FCb, bpm); delta de variação (Δ)

3.11 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 10%. 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 (24h), 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. 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.

3.12 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).

3.13 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como médias $\pm$ 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 $p < 0.05$.

3.14 Protocolos Experimentais

Protocolo I: Avaliação dos efeitos produzidos pelas microinjeções de L-NAME e L-arginina na CVLM sobre a PAM e FC.

Após o início do registro da PAM e FC, por cerca de dez minutos (estabilização), posicionou-se a micropipeta de vidro na CVLM. Esperou-se mais dez minutos para realização da microinjeção de L-NAME (10nmol) ou L-arginina (50nmol). Após a microinjeção de uma ou outra substância, os parâmetros cardiovasculares dos animais foram registrados por até cinquenta (50) minutos. Ao final do experimento a salina foi microinjetada na CVLM e utilizada como controle. As microinjeções de L-NAME ou L-arginina foram feitas na CVLM de ratos SHAM e 2R1C. Foram utilizados grupos diferentes de ratos para os estudos de microinjeção de L-NAME e L-arginina. Essas etapas experimentais estão sumarizadas na figura 7 abaixo:

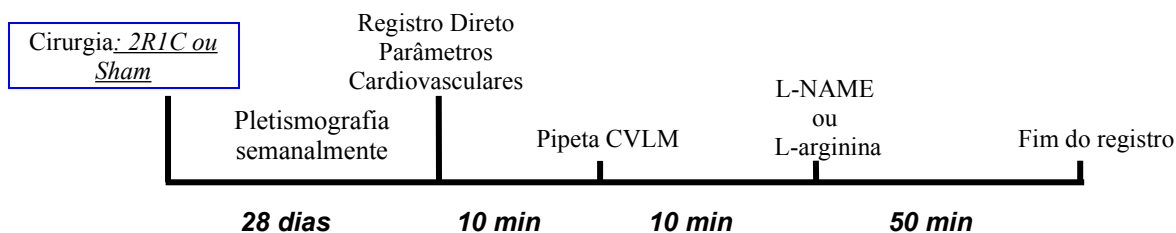


Figura 7: Protocolo experimental para a avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de L-NAME ou L-arginina na CVLM, sobre a PAM e FC em ratos SHAM e 2R1C.

Protocolo II: Avaliação do efeito produzido pela microinjeção de L-arginina após a microinjeção de L-NAME na CVLM sobre a PAM e FC

Para verificar se o L-NAME (inibidor não específico da síntese de NO) seria efetivo em inibir os efeitos da L-arginina (precursor do NO), microinjetou-se a L-arginina (50nmol) na CVLM e esperou-se cinquenta (50) minutos. Após esse período, foi feita a microinjeção de L-NAME (10nmol) na CVLM. A microinjeção de L-arginina foi repetida cinco (5) minutos após a microinjeção de L-NAME e durante os cinquenta (50) minutos posteriores, observou-se os efeitos na PAM e FC produzidas pela microinjeção. Ao final do experimento a salina foi microinjetada na CVLM. Essas etapas experimentais estão sumarizadas na figura 8 abaixo:

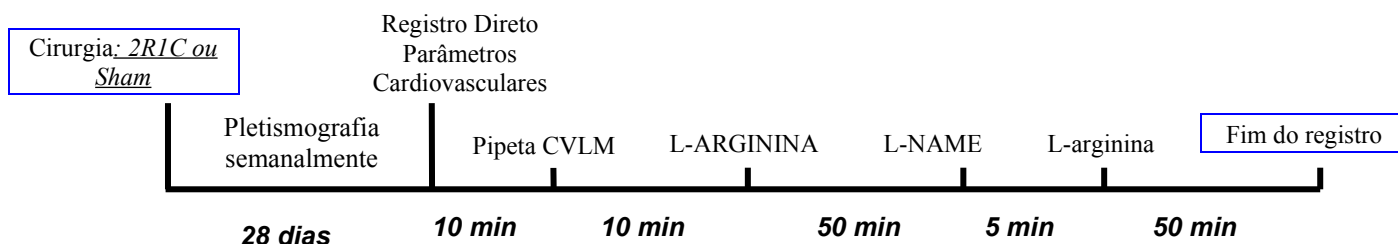


Figura 8: Protocolo experimental para a avaliação dos efeitos na PAM e FC produzidos pela microinjeção de L-arginina antes e após a microinjeção de L-NAME na CVLM, sobre a PAM e FC em ratos SHAM e 2R1C.

Protocolo III: Avaliação da microinjeção do L-NAME ou L-arginina na CVLM sobre a sensibilidade da bradicardia reflexa

Com a intenção de observarmos se o NO interferia com a sensibilidade da bradicardia reflexa foram microinjetados L-NAME (10nmol) ou L-arginina (50nmol) na CVLM, antes e após a avaliação do teste de bradicardia reflexa. Dez (10) minutos após o

posicionamento da micropipeta na CVLM, foi realizado o primeiro teste da sensibilidade da bradicardia reflexa através de doses de concentrações crescentes intravenosas (i.v.) de fenilefrina “in bolus”. A seguir, foi microinjetado L-NAME ou L-arginina de acordo com o protocolo utilizado e um segundo teste do barorreflexo foi realizado 5 minutos após a microinjeção de L-NAME ou L-arginina na CVLM. Ao final do experimento a salina foi microinjetada na CVLM de animais SHAM e 2R1C. Foram utilizados grupos diferentes de ratos para os estudos de microinjeção de L-NAME e L-arginina. As etapas experimentais estão sumarizadas na figura 9 abaixo:

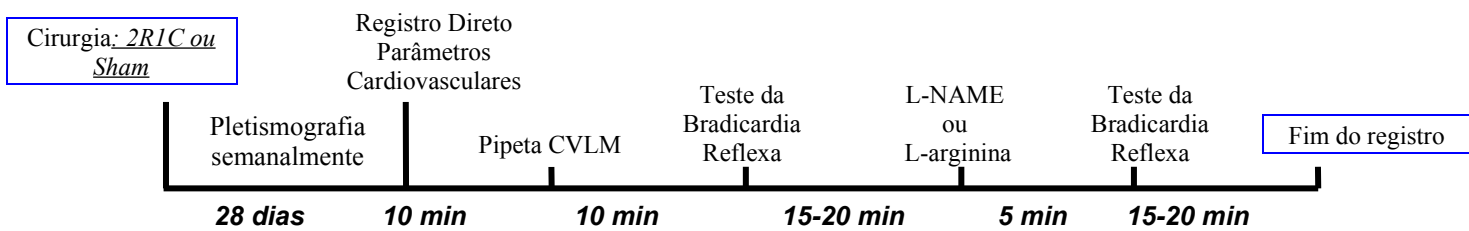


Figura 9: Protocolo experimental para a avaliação da sensibilidade da bradicardia reflexa antes e após microinjeção do L-NAME ou L-arginina na CVLM em animais 2R1C e SHAM.

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros para Caracterização da Hipertensão Renovascular 2R1C

4.1.1 Avaliação Semanal Indireta da PA por Pletismografia de Cauda após Cirurgia para Produção da Hipertensão Renovascular 2R1C

Com o objetivo de avaliar o desenvolvimento da hipertensão renovascular 2R1C, mensurou-se indiretamente a pressão arterial através da pletismografia de cauda. As avaliações foram realizadas semanalmente em animais SHAM (normotensos) e em ratos com hipertensão renovascular 2R1C. Os valores de PA encontrados estão na Figura 10 e Tabela I.

Como mostrado na Figura 10 e Tabela I, os valores de PA dos ratos 2R1C na primeira semana não foram diferentes ($p>0,05$) dos valores encontrados para os ratos SHAM. Já a partir da segunda semana os valores de PA dos animais 2R1C foram superiores ($p<0,05$) aos valores de PA dos animais SHAM. Os valores de PA dos animais 2R1C na terceira e quarta semana após as cirurgias também foram superiores ($p<0,05$) quando comparado aos valores de PA dos animais SHAM e, além disso, não foram diferentes ($p>0,05$) entre si.

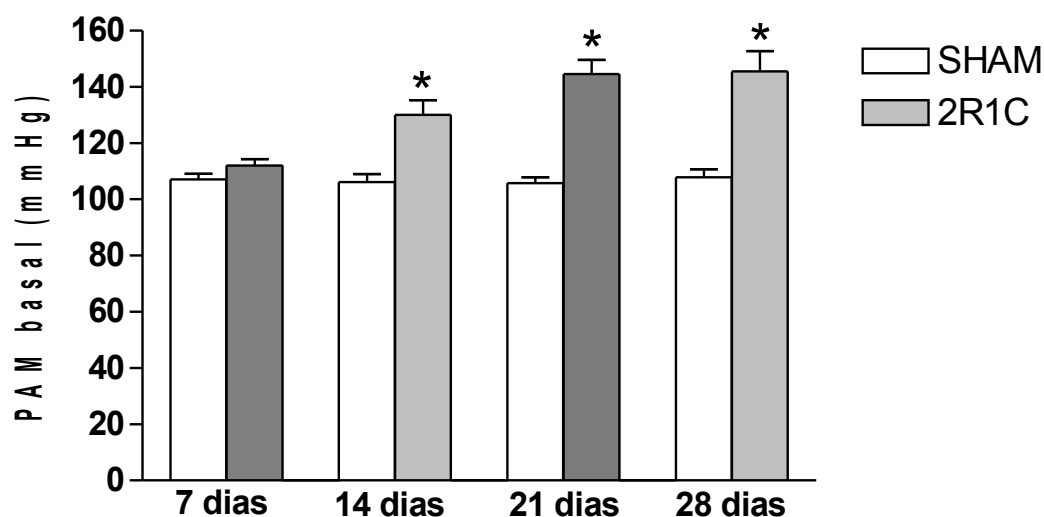


Figura 10: Pressão arterial média (PAM, mmHg) mensurada através de pletismografia de cauda em ratos acordados, durante 4 semanas após as cirurgias SHAM (n=12) e 2R1C (n=12). * $p<0.05$ em comparação aos respectivos valores de PAM dos ratos Sham (teste “t” de Student para observações não pareadas).

Tabela I: Acompanhamento semanal da pressão arterial média basal (PAM, mmHg) em ratos acordados por pletismografia de cauda

	7 Dias	14 Dias	21 Dias	28 Dias
SHAM (n=12)	107,2 ± 2,1	106,1 ± 2,7	105,8 ± 2,1	107,9 ± 2,8
2R1C (n=12)	112,1 ± 2,2	130,0 ± 5,3*	144,6 ± 5,1*	146,5 ± 6,5*

Valores expressos como média ± erro padrão da média. *p<0.05 em comparação aos respectivos valores de PAM dos ratos 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 a cirurgia 2R1C. A Figura 11 ilustra os rins dos ratos 30 dias após a cirurgia fictícia (SHAM) (painel B) e após a cirurgia para a produção hipertensão renovascular (2R1C) (painel A).

A Figura 12 e Tabela II mostram que o peso úmido relativo dos rins esquerdos (clipados) dos animais 2R1C foi menor (p<0,05) do que o peso úmido relativo dos rins esquerdos dos ratos SHAM. Por outro lado, o peso úmido relativo dos rins direitos (contralaterais) dos ratos com hipertensão renovascular 2R1C foi maior (p<0,001) do que o peso úmido relativo dos rins direitos dos ratos SHAM. O percentual de diferença de peso entre rins (clipados e não clipados) dos ratos 2R1C situou-se em torno de 40%, sendo diferente dos animais SHAM que não apresentaram diferença significativa (p>0,05) de peso entre seus rins (Figura 12 e Tabela II).

Em outra análise, o percentual de diferença de peso entre rins dos ratos com hipertensão renovascular 2R1C foi correlacionado com escalas de valores de PAM basal medidos diretamente (pelo transdutor). A Figura 13 e Tabela III mostram dados referentes ao percentual de diferença de peso entre rins e sua correlação com níveis pressóricos dos ratos hipertensos (2R1C). Os dados mostram que houve uma correlação positiva entre os níveis pressóricos e o percentual de diferença de peso úmido relativo entre os rins dos ratos hipertensos (2R1C). Além disso, pode-se observar que os ratos submetidos à cirurgia 2R1C tornaram-se hipertensos (p<0,01) em relação aos ratos SHAM, com uma variação do percentual de diferença entre rins clipados e não clipados de 22 a 60% (Figura 13 e Tabela III). Uma melhor análise desses dados foi obtida através do gráfico da regressão linear da PAM com o peso relativo do rim direito, percentual de diferença entre rim esquerdo/direito e

com o peso relativo do rim esquerdo (Anexo I). Os resultados desta análise revelaram que a PAM correlacionou-se positivamente ($r^2=0,4003$) com o peso relativo do rim direito (Anexo IA) e com o percentual de diferença de peso entre rim esquerdo/direito ($r^2=0,1640$, Anexo IB), não se correlacionando ($r^2=0,02449$) com o peso relativo do rim esquerdo (Anexo IC).

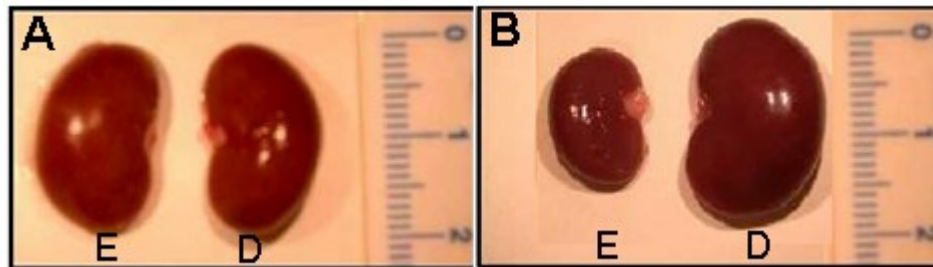


Figura 11: Fotos típicas dos rins direito (D) e esquerdo (E) dos ratos SHAM (painel A) e dos ratos com hipertensão renovascular 2R1C (painel B), 30 dias após cirurgias.

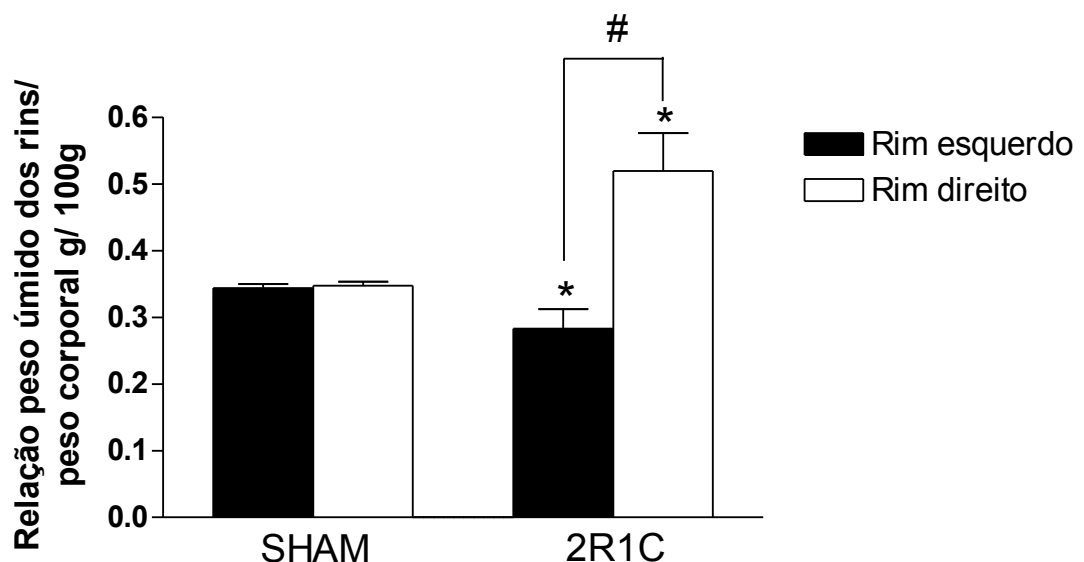


Figura 12: Peso úmido relativo (g/ 100g de peso corporal) dos rins esquerdo e direito dos ratos normotensos SHAM (n=11) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=11). * $p<0,05$ em comparação aos respectivos rins dos ratos SHAM (n=11). # $P<0,001$ em relação ao respectivo rim esquerdo dos animais (teste “t” de Student para observações não pareadas).

Tabela II: Valores do peso úmido relativo dos rins e percentual de diferença entre rins direito e esquerdo de ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C (g/ 100g do peso corporal)

	Rim Esquerdo	Rim Direito	% Diferença
SHAM (n=11)	0,34 ± 0,01g	0,35 ± 0,01g	0,9 ± 0,9
2R1C (n=11)	0,28 ± 0,02g *	0,52 ± 0,05g* [#]	40,2 ± 6,1*

% Diferença= percentual de diferença de peso relativo entre rins (direito e esquerdo) do mesmo rato. Valores expressos como média ± erro padrão da média. *p<0,05 em relação ao grupo SHAM. [#]p<0,001 em relação ao respectivo rim esquerdo dos animais (n=11). (teste “t” de Student para observações não pareadas).

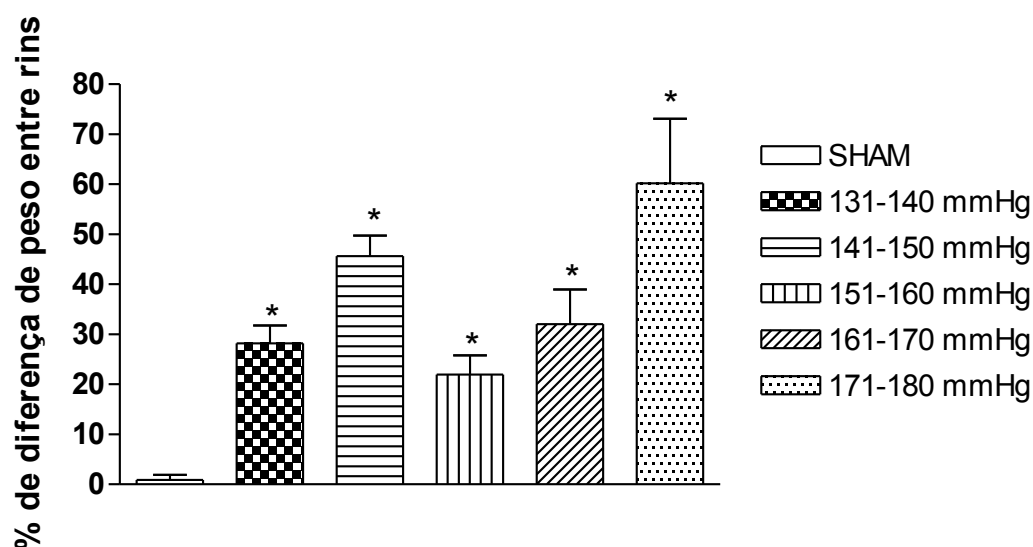


Figura 13: Correlação entre os intervalos de PAM basal (mmHg) medida de forma direta (pelo transdutor) e o percentual de diferença de peso úmido relativo entre rins dos ratos com hipertensão renovascular 2R1C (n=4-12) *p<0,01 em comparação aos ratos SHAM (n=11). (ANOVA seguido de Newman-Keuls).

Tabela III: Percentual de diferença de peso úmido entre rim esquerdo e direito de ratos com hipertensão renovascular 2R1C anestesiados e PAM basal

	SHAM (100-130 mmHg)	Intervalos de pressão arterial média basal (PAM, mmHg)				
		131-140	141-150	151-160	161-170	171-180
%diferença	0,9 ± 0,9	28,2 ± 3,5*	45,6 ± 4,1*	22,0 ± 3,8*	32,0 ± 6,9*	60,2 ± 12,9*
n	11	12	7	6	6	4

Valores expressos como média ± erro padrão da média.

% diferença=percentual de diferença entre rins (direito e esquerdo). *p<0,01 em comparação aos ratos SHAM. (ANOVA seguido de Newman-Keuls).

4.1.3 Avaliação do Peso Úmido do Coração e Componentes Cardíacos de Ratos Normotensos SHAM e com Hipertensão 2R1C

Para avaliarmos o efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre o coração, analisamos o peso úmido relativo do coração, átrios e ventrículos direito e esquerdo. A Figura 14 e tabela IV mostram que o peso dos átrios dos ratos 2R1C não foi diferente (p>0,05) do peso dos átrios dos ratos normotensos SHAM, da mesma forma que também não foram encontradas diferenças significativas (p>0,05) entre o peso úmido do ventrículo direito de animais 2R1C e dos ratos SHAM.

Já o peso úmido relativo do coração dos animais com hipertensão 2R1C foi maior (p<0,001) quando comparado ao peso úmido relativo do coração dos animais normotensos SHAM. Esse aumento foi causado possivelmente devido à hipertrofia do ventrículo esquerdo, que apresentou uma elevação (p<0,001) de peso úmido relativo em ratos hipertensão renovascular 2R1C, quando comparado ao peso úmido relativo do ventrículo esquerdo dos ratos normotensos SHAM (Figura 14 e tabela IV).

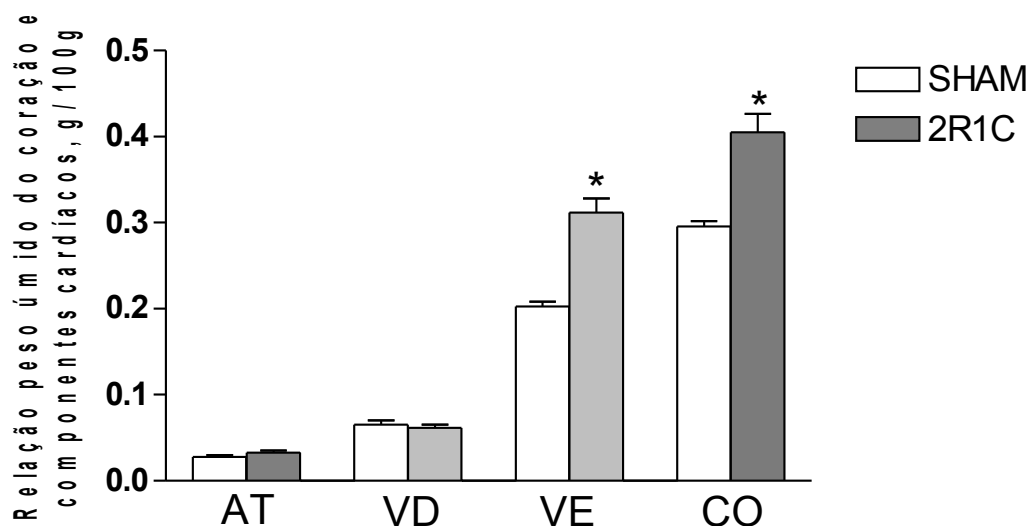


Figura 14 Avaliação do peso úmido relativo dos átrios (AT), ventrículo direito (VD), ventrículo esquerdo (VE) e coração (CO) de ratos com hipertensão renovascular 2R1C (n=11) e ratos normotensos SHAM (n=11). *p<0,05 em comparação aos respectivos pesos úmidos relativos dos animais SHAM. (ANOVA seguido de Newman-Keuls).

Tabela IV: Valores do peso úmido relativo (g/ 100g do peso corporal) dos átrios, ventrículos direito, ventrículos esquerdo e coração de ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C

	Átrios	Ventrículo Direito	Ventrículo Esquerdo	Coração
SHAM (n=11)	0,03± 0,005	0,07 ± 0,005	0,20 ± 0,01	0,30 ± 0,01
2R1C (n=11)	0,03 ± 0,005	0,06 ± 0,005	0,31± 0,02*	0,41 ± 0,02*

Valores expressos como média ± erro padrão da média. *p<0,05 em comparação aos respectivos pesos úmidos relativos dos animais SHAM. (ANOVA seguido de Newman-Keuls)

4.2 Avaliação Direta dos Parâmetros Cardiovasculares

A Figura 15 e Tabela V referem-se aos valores diretos de PAM e FC basal de todos os grupos experimentais. A avaliação direta da PAM basal de ratos anestesiados mostrou como esperado, que os ratos com hipertensão renovascular 2R1C apresentaram uma PAM basal superior (p<0,005) comparado aos animais normotensos SHAM e não foram observadas diferenças estatísticas (p>0,05) em relação à FC basal entre os dois grupos.

Esses dados confirmam o sucesso da técnica de indução de hipertensão utilizada (Figura 15 e Tabela V).

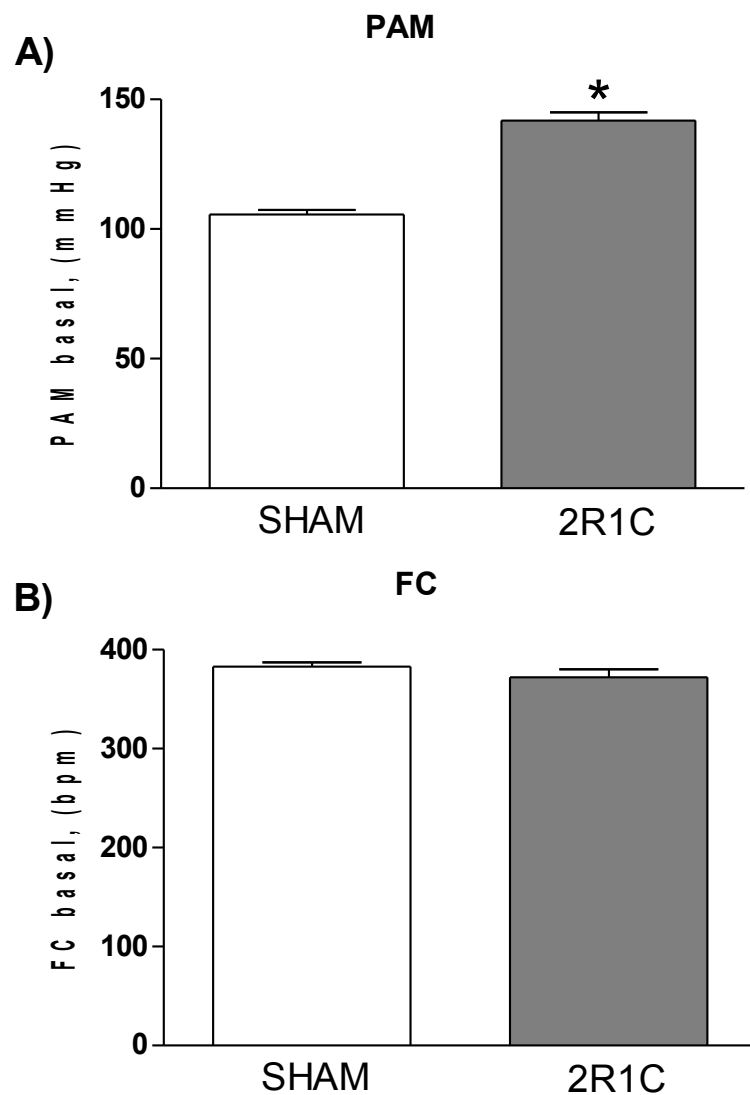


Figura 15: Avaliação direta da pressão arterial média basal (PAM basal, mmHg; painel A) e frequência cardíaca basal (FC basal, bpm; painel B) de ratos normotensos SHAM (n=42) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=36) através do transdutor de pressão. *p<0,05 em comparação ao grupo SHAM (teste “t” de Student para observações não pareadas).

Tabela V: Valores de Pressão Arterial Média basal (PAM basal, mmHg) e Frequência Cardíaca basal (FC basal, bpm) dos ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C

	PAM basal (mmHg)	FC basal (bpm)
SHAM (n=42)	105,6 ± 1,7	382,7 ± 4,4
2R1C (n=36)	141,8 ± 3,1*	372,1 ± 7,9

Valores expressos como média ± erro padrão da média.

*p<0,05 em comparação aos valores basais dos ratos normotensos SHAM. (teste “t” de Student para observações não pareadas).

4.2.1 Efeito Produzido pela Microinjeção de L-NAME na CVLM de Ratos Normotensos SHAM e com Hipertensão Renovascular 2R1C

Com o objetivo de avaliar os efeitos da inibição do óxido nítrico (NO) no bulbo ventrolateral caudal (CVLM), sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), o L-NAME (inibidor não seletivo das isoformas de NOS; 10nmol), foi microinjetado na CVLM de ratos normotensos SHAM (n=6) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=7). A Figura 17 e Tabela VI mostram que a microinjeção de L-NAME na CVLM produziu uma queda (p<0,01) na PAM tanto em animais SHAM, como nos animais 2R1C (p<0,001), em comparação às microinjeções de salina. Em relação à FC, a microinjeção de L-NAME na CVLM produziu uma redução deste parâmetro, tanto em animais SHAM (p<0,01) como em animais 2R1C (p<0,05) quando comparado à microinjeção de salina em ambos os grupos, SHAM e 2R1C. As variações da PAM e FC produzidas pela microinjeção de L-NAME na CVLM não foram diferentes (p>0,05) entre os ratos SHAM e 2R1C (Figura 17 e Tabela VI). A redução da PAM e FC produzida pela microinjeção de L-NAME em animais SHAM e 2R1C podem ser visualizadas na Figura 16.

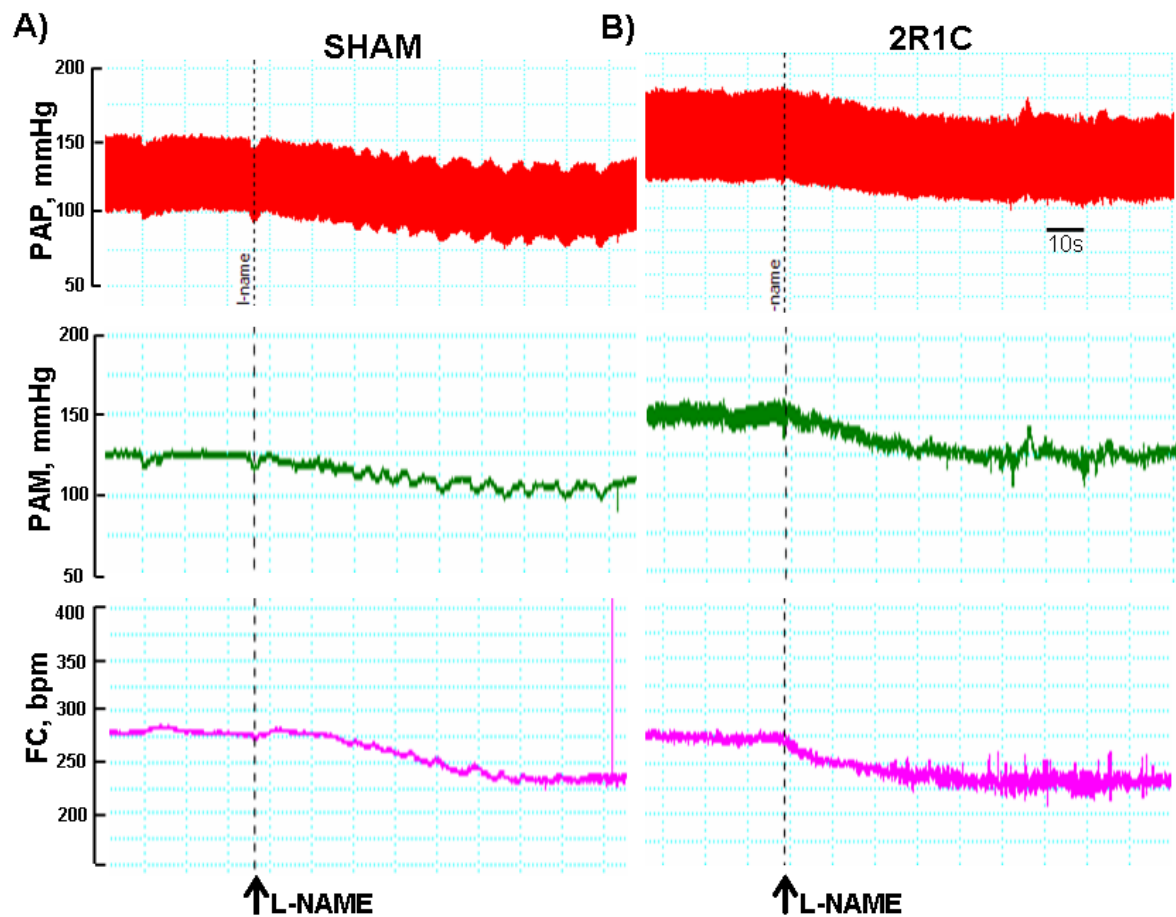


Figura 16: Registro típico ilustrando o efeito da microinjeção de L-NAME (10nmol) na CVLM sobre a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos SHAM (painel A) e com hipertensão renovascular 2R1C (painel B). As setas e as linhas tracejadas verticais indicam o momento da microinjeção do L-NAME na CVLM.

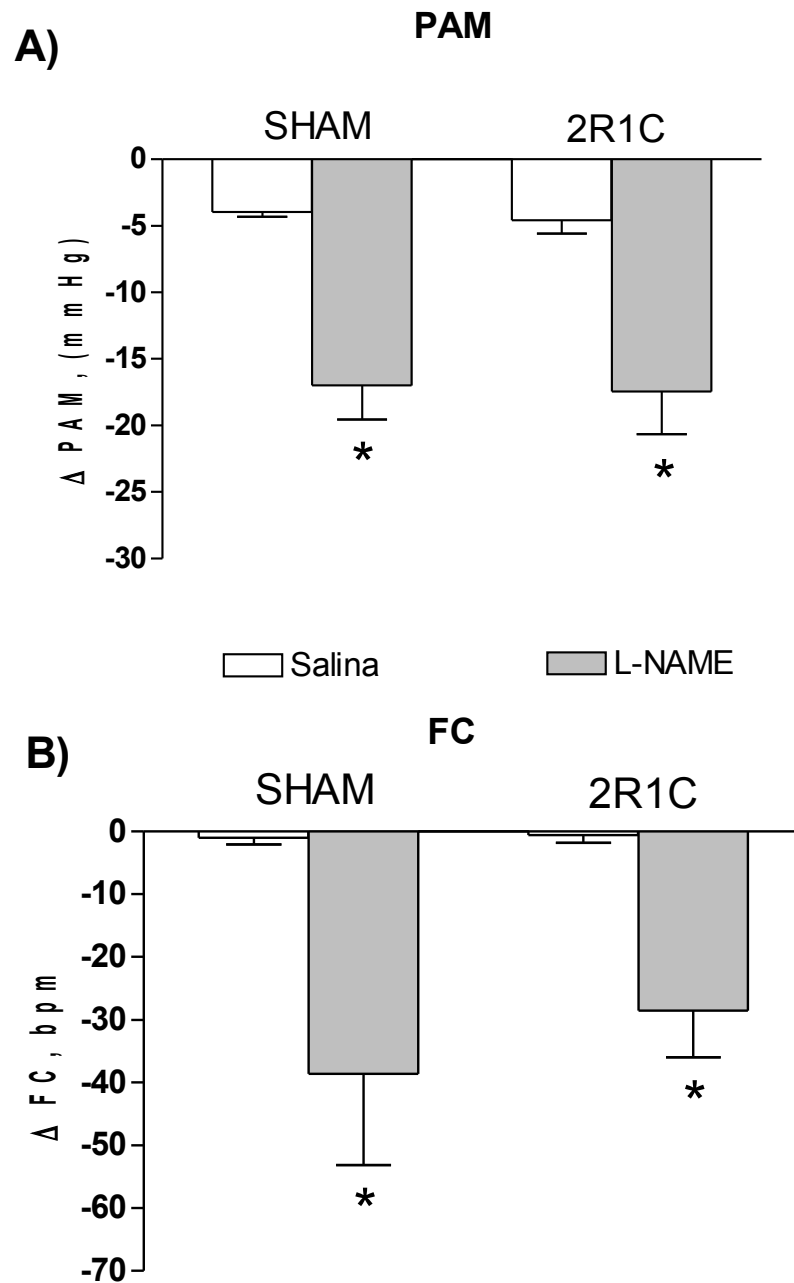


Figura 17: Alterações na PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) produzidos pela microinjeção de L-NAME (10nmol) na CVLM de ratos normotensos SHAM (n=6) e com hipertensão renal 2R1C (n=7). *p<0,05 em comparação à microinjeção de salina. (ANOVA seguido de Newman-Keuls).

Tabela VI: Variações na pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela microinjeção do L-NAME (10nmol) na CVLM de ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C

	(Δ PAM, mmHg)		(Δ FC, bpm)	
	SHAM	2R1C	SHAM	2R1C
Salina	-3,4 $\pm$ 0,4	-4,5 $\pm$ 1,0	-1,0 $\pm$ 1,0	-0,6 $\pm$ 1,2
L-NAME	-17,0 $\pm$ 2,5*	-17,4 $\pm$ 3,2*	-38,6 $\pm$ 14,5*	-28,5 $\pm$ 7,5*
n	6	7	6	7

Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. *p<0,05 em comparação à microinjeção de salina (ANOVA seguido de Newman-Keuls).

4.2.2 Efeito Produzido pela Microinjeção de L-arginina na CVLM de Ratos Normotensos SHAM e com Hipertensão 2R1C

Na intenção de verificarmos se a microinjeção de L-arginina na CVLM produziria efeitos opostos aos da microinjeção de L-NAME, foi microinjetado o precursor da síntese de NO, L-arginina (50nmol), na CVLM de ratos normotensos SHAM (n=11) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=6). Como mostram a Figura 19 e Tabela VII a microinjeção de L-arginina na CVLM produziu uma elevação significativa (P<0,001) da PAM em animais SHAM, assim como em animais com hipertensão renovascular 2R1C, quando comparado às alterações na PAM produzidas pelas microinjeções de salina. O aumento de PAM induzido pela L-arginina foi similar (p<0,05) entre os ratos SHAM e 2R1C.

A microinjeção de L-arginina na CVLM produziu alterações variadas na FC, alternando entre taquicardia e bradicardia. No entanto, quando se registrou as alterações produzidas sobre FC, no pico da resposta pressora produzida pela droga, a microinjeção da L-arginina (10nmol) na CVLM não produziu alterações significativas (p>0,05) na FC em ambos os grupos, apresentando um efeito similar às alterações produzidas pela microinjeção de salina (Figura 19 e Tabela VII). O aumento da PAM produzido pela microinjeção de L-arginina (50nmol) em animais SHAM e 2R1C está ilustrado na Figura 18.

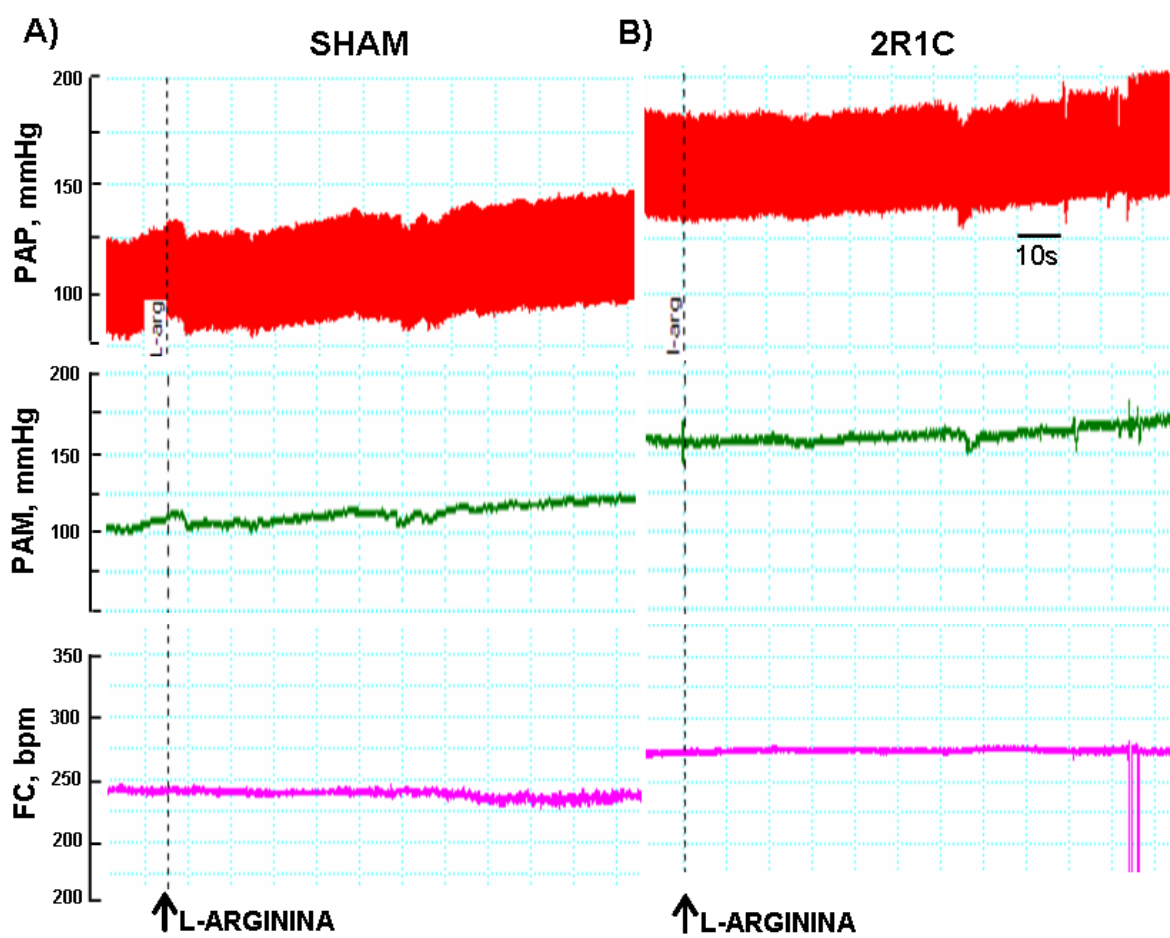


Figura 18: Registro típico ilustrando o efeito da microinjeção de L-arginina (50nmol) na CVLM, sobre a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos SHAM (painel A) e com hipertensão renovascular 2R1C (painel B). As setas e as linhas tracejadas verticais indicam o momento da microinjeção de L-arginina na CVLM.

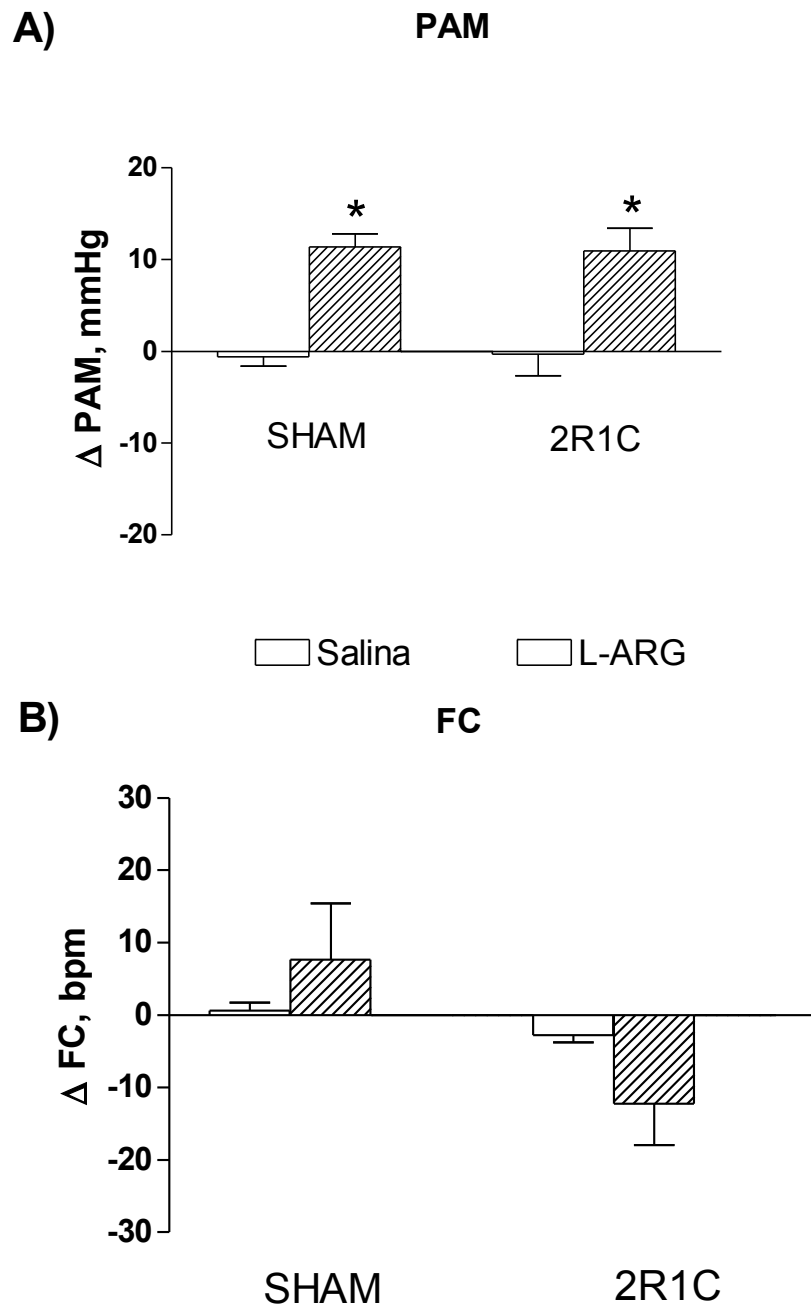


Figura 19: Alterações na PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) produzidas pela microinjeção de L-arginina (50nmol) na CVLM em ratos normotensos SHAM (n=11) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=6). *p<0,05 em comparação à microinjeção de salina (ANOVA seguido de Newman-Keuls).

Tabela VII: Variações na pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela microinjeção de L-arginina (50nmol) na CVLM de ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C

	(Δ PAM, mmHg)		(Δ FC, bpm)	
	SHAM	2R1C	SHAM	2R1C
Salina	-2,4 $\pm$ 0,7	-4,1 $\pm$ 0,6	-0,6 $\pm$ 1,1	-2,7 $\pm$ 1,0
L-ARG	11,4 $\pm$ 1,4*	11,0 $\pm$ 2,5*	7,7 $\pm$ 7,7	-12,2 $\pm$ 5,7
n	11	6	11	6

Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ em comparação à microinjeção de salina. (ANOVA seguido de Newman-Keuls).

4.2.3 Duração dos Efeitos Cardiovasculares Produzidos pelas Microinjeções de L-NAME e L-arginina na CVLM de Ratos Normotensos SHAM e com Hipertensão Renovascular 2R1C

No intuito de melhor caracterizar as alterações cardiovasculares produzidas pelas microinjeções de L-NAME (10nmol) e L-arginina (50nmol) na CVLM, foi avaliado o tempo de duração das alterações produzidas por estas drogas sobre a PAM e FC de ratos SHAM ($n=6-10$) e de ratos 2R1C ($n=4-6$). A duração do efeito depressor da microinjeção de L-NAME não foi diferente ($p > 0,05$) entre animais SHAM e 2R1C. No entanto, a duração da bradicardia produzida pela microinjeção de L-NAME na CVLM foi menor ($p = 0,0065$) em animais 2R1C quando comparado aos ratos normotensos SHAM (Tabela VIII).

Em relação à microinjeção de L-arginina, a Tabela VIII mostra que a duração do efeito pressor da microinjeção desta droga na CVLM foi maior ($p = 0,0140$) em animais 2R1C em comparação com grupo SHAM. A microinjeção de L-arginina na CVLM produz alterações variadas na FC, alternado entre taquicardia e bradicardia, por vezes, no mesmo animal. A duração dessas alterações causadas na FC, ou seja, o tempo em que a FC demora a retornar aos valores basais foi maior ($p = 0,0194$) em animais 2R1C, quando comparadas aos ratos normotensos SHAM.

Tabela VIII: Duração (em minutos) das variações produzidas na pressão arterial média (Δ PAM) e na frequência cardíaca (Δ FC) pelas microinjeções de L-NAME (10nmol) e L-

arginina (50nmol) na CVLM de ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C

DURAÇÃO DO EFEITO DA MICROINJEÇÃO (min)				
L-NAME		L-ARG		
	Δ PAM (mmHg)	Δ FC (bpm)	Δ PAM (mmHg)	Δ FC (bpm)
SHAM	$3,7 \pm 0,5$	$22,5 \pm 3,1$	$10,3 \pm 2,3$	$13,8 \pm 3,9$
n	6	6	10	7
2R1C	$5,6 \pm 1,0$	$11,1 \pm 1,4^*$	$26,1 \pm 6,7^*$	$31,5 \pm 5,2^*$
n	6	6	4	6

Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. (min) representa minutos de duração. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos SHAM. (teste “t” de Student para observações não pareadas).

4.2.4 Efeito Produzido pela Microinjeção de L-arginina após a Microinjeção de L-NAME na CVLM de Ratos Normotensos SHAM e com Hipertensão Renovascular 2R1C

Com o objetivo de analisar se os efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção L-arginina na CVLM eram realmente causados pelo aumento dos níveis de NO na CVLM, analisamos os efeitos na PAM e FC produzidos pela microinjeção de L-arginina (50nmol) antes e após a microinjeção de L-NAME (10nmol) na CVLM de ratos SHAM ($n=11$) e de ratos com hipertensão renovascular 2R1C ($n=6$). A Figura 20 e Tabela IX mostram como já mencionado, que a microinjeção de L-arginina antes da microinjeção de L-NAME na CVLM produziu aumento ($p < 0,001$) da PAM em animais normotensos SHAM, e em animais com hipertensão renovascular 2R1C, quando comparado às microinjeções de salina em ambos os grupos. Já após a microinjeção de L-NAME (cinco minutos), o efeito da microinjeção de L-arginina sobre a PAM foi menor ($p < 0,05$) em relação à microinjeção de L-arginina antes do L-NAME e similar a microinjeção de salina ($p > 0,05$) em ratos SHAM e 2R1C (Figura 20 e Tabela IX). Adicionalmente, a microinjeção de L-arginina após o L-NAME não produziu alterações significativas sobre a FC ($p > 0,05$) em ambos os grupos (SHAM e 2R1C) em comparação à microinjeção de L-arginina antes do L-NAME.

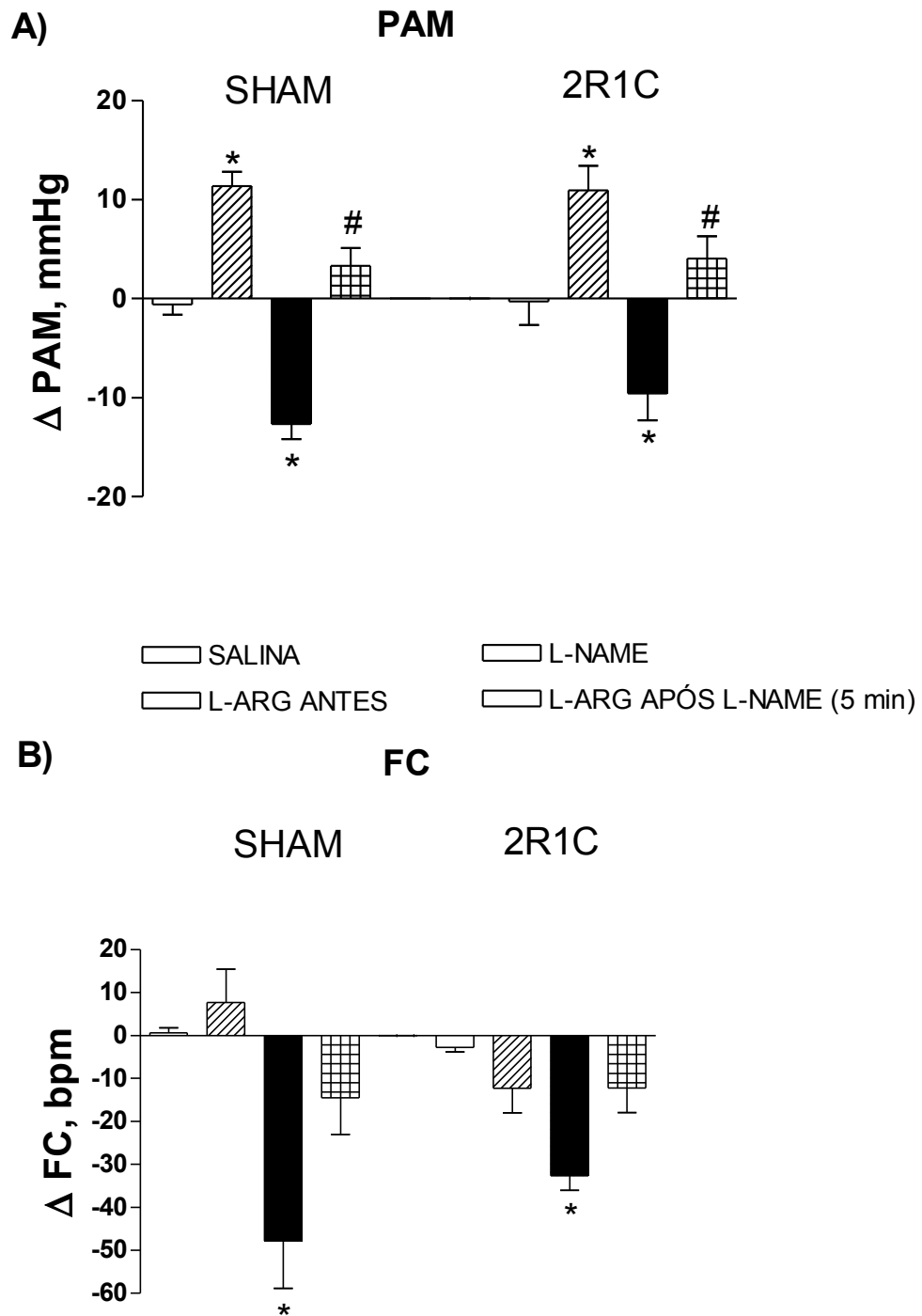


Figura 20: Alterações na PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) produzidas pela microinjeção de L-arginina (50nmol), antes e 5 minutos após a microinjeção de L-NAME (10nmol) na CVLM de ratos normotensos SHAM (n=11) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=6). *p<0,05 em comparação à microinjeção de salina e #p<0,05 em comparação à microinjeção de L-arginina antes do L-NAME. (ANOVA seguido de Newman-Keuls).

Tabela IX: Variações na pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela microinjeção de L-arginina (50nmol) antes e 5 minutos após a microinjeção de L-NAME (10nmol) na CVLM de ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C

	$(\Delta \text{ PAM, mmHg})$		$(\Delta \text{ FC, bpm})$	
	SHAM	2R1C	SHAM	2R1C
Salina	$-0,8 \pm 0,9$	$-0,3 \pm 2,4$	$0,9 \pm 1,1$	$-1,7 \pm 2,6$
L-ARG	$11,4 \pm 1,4^*$	$11,0 \pm 2,5^*$	$7,7 \pm 7,7$	$-19,5 \pm 6,9$
L-NAME	$-12,7 \pm 1,5^*$	$-9,6 \pm 2,7^*$	$-47,9 \pm 11,0^*$	$-32,6 \pm 3,4^*$
L-ARG 5'	$3,3 \pm 1,8^\#$	$4,1 \pm 2,7^\#$	$-14,4 \pm 8,5$	$-12,1 \pm 5,7$
n	11	6	11	6

Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ em comparação à salina
 $^\#p < 0,05$ em comparação à microinjeção de L-arginina antes da microinjeção do L-NAME na CVLM. (ANOVA seguido de Newman-Keuls).

4.2.5 Avaliação da Sensibilidade da Bradicardia Reflexa

Como esperado, a sensibilidade da bradicardia reflexa dos animais com hipertensão renovascular 2R1C foi menor ($p = 0,0006$) quando comparado àquela observada em ratos normotensos SHAM (Figura 21, Tabela X). As figuras 23 e 25 ilustram respectivamente, o efeito produzido pelo L-NAME (10nmol) e L-arginina (50nmol), sobre bradicardia reflexa em ratos SHAM e 2R1C. Como mostrado na Figura 23 e tabela XI, a microinjeção de L-NAME na CVLM aumentou ($p = 0,0152$) a sensibilidade da bradicardia reflexa em ratos 2R1C, embora esse valor da sensibilidade da bradicardia reflexa ainda seja menor ($p = 0,0388$) que o observado em animais SHAM antes da microinjeção do L-NAME. Já a sensibilidade da bradicardia reflexa em ratos SHAM não foi alterada ($p > 0,05$) pela microinjeção de L-NAME (Figura 23 e tabela XI). A Figura 22 ilustra o aumento da sensibilidade da bradicardia reflexa que ocorre em animais 2R1C, após a microinjeção de L-NAME na CVLM.

Por outro lado, a Figura 25 e tabela XII mostram que a microinjeção de L-arginina na CVLM diminuiu ($p < 0,01$) a sensibilidade da bradicardia reflexa em ratos SHAM. No entanto, a sensibilidade da bradicardia reflexa em ratos 2R1C não foi alterada ($p > 0,05$) pela microinjeção de L-arginina (Figura 25 e tabela XII). A Figura 24 ilustra a diminuição da sensibilidade da bradicardia reflexa que ocorre em animais SHAM, após a microinjeção de L-arginina na CVLM.

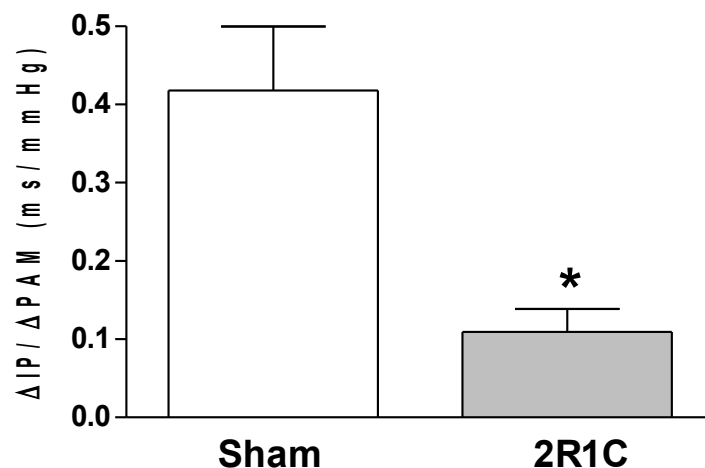


Figura 21: Alterações no índice de sensibilidade da bradicardia barorreflexa ($\Delta IP / \Delta PAM$, ms / mmHg) induzida por aumentos na PAM produzidos pela fenilefrina (i.v) em ratos normotensos SHAM (n=14) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=17). *p<0,05 em comparação com ratos do grupo SHAM. (ANOVA seguido de Newman-Keuls)

Tabela X: Índice de sensibilidade da bradicardia reflexa ($\Delta IP / \Delta PAM$, ms / mmHg) avaliado por aumentos na PAM produzidos pela fenilefrina (iv) e quedas reflexas na FC, em ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C

	SHAM	2R1C
Sensibilidade da Bradicardia reflexa	0,42 ± 0,08	0,11 ± 0,02*
($\Delta IP / \Delta PAM$, ms/ mmHg)		
n	14	17

Valores expressos como média ± erro padrão da média. *p<0,05 em comparação com ratos do grupo SHAM. (ANOVA seguido de Newman-Keuls)

RATO 2R1C

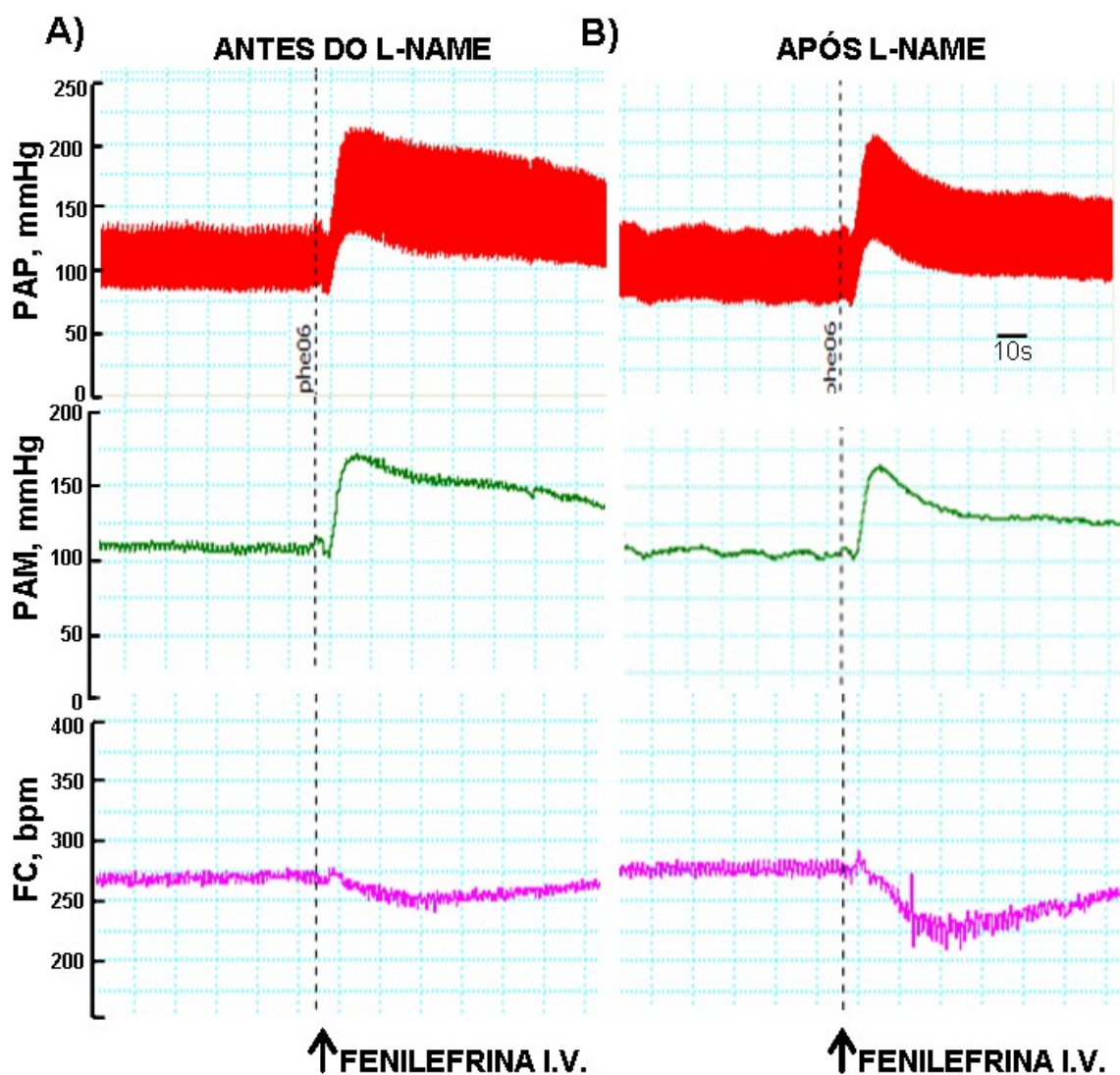


Figura 22: Registro típico da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) ilustrando a bradicardia reflexa de ratos 2R1C após a microinjeção de L-NAME (10nmol). As setas e as linhas tracejadas verticais indicam o momento da injeção intravenosa de fenilefrina (20µg, i.v.).

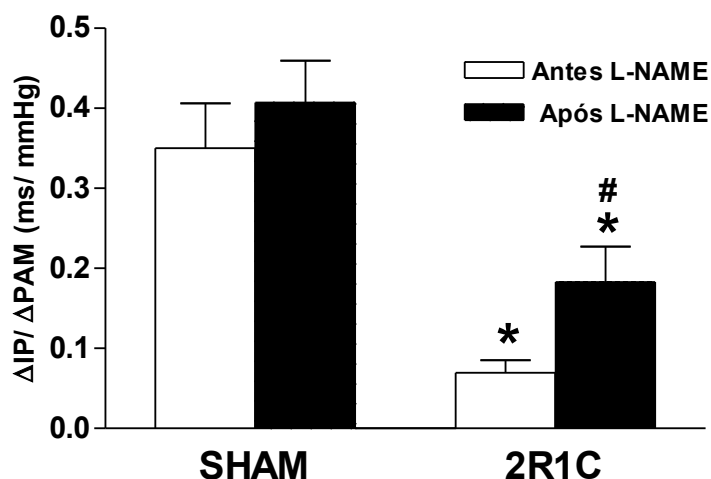


Figura 23: Alterações no índice de sensibilidade da bradicardia barorreflexa ($\Delta IP / \Delta PAM$, ms / mmHg) induzida por aumentos na PAM produzidos pela fenilefrina (i.v) em ratos normotensos SHAM (n=8-6) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=10-8). *P<0,05 em relação à sensibilidade da bradicardia reflexa do grupo SHAM antes da microinjeção de L-NAME. #P<0,05 em comparação com a sensibilidade da bradicardia reflexa antes da microinjeção de L-NAME no grupo 2R1C. (ANOVA seguido de Newman-Keuls)

Tabela XI: Alterações no índice de sensibilidade da bradicardia reflexa ($\Delta IP / \Delta PAM$, ms / mmHg) induzida por aumentos na PAM produzidos pela fenilefrina (i.v), após a microinjeção de L-NAME (10nmol) na CVLM de ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C

	SHAM		2R1C	
	antes L-NAME	após L-NAME	antes L-NAME	após L-NAME
Sensibilidade da Bradicardia reflexa ($\Delta IP / \Delta PAM$, ms/ mmHg)	0,35 ± 0,06	0,41 ± 0,05	0,07 ± 0,01*	0,18 ± 0,04*#
n	10	8	8	8

Valores expressos como média ± erro padrão da média. *P<0,05 em relação à sensibilidade da bradicardia reflexa do grupo SHAM antes da microinjeção de L-NAME. #P<0,05 em comparação com a sensibilidade da bradicardia reflexa antes da microinjeção de L-NAME no grupo 2R1C. (ANOVA seguido de Newman-Keuls)

RATO SHAM

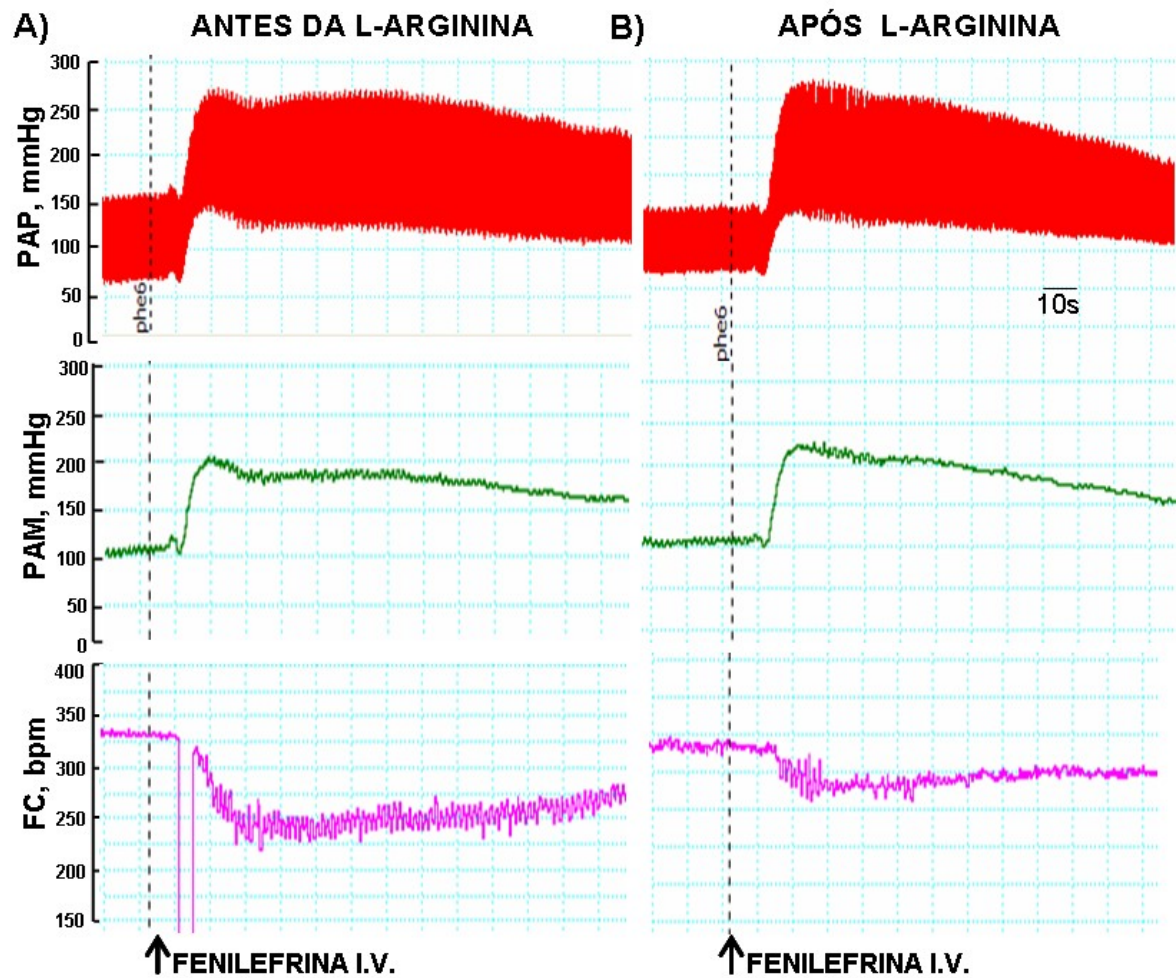


Figura 24: Registro típico da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) ilustrando a bradicardia reflexa dos ratos SHAM (painel B) após a microinjeção de L-arginina (50nmol). As setas e as linhas tracejadas verticais indicam o momento da injeção endovenosa de fenilefrina (20 μ g, i.v.).

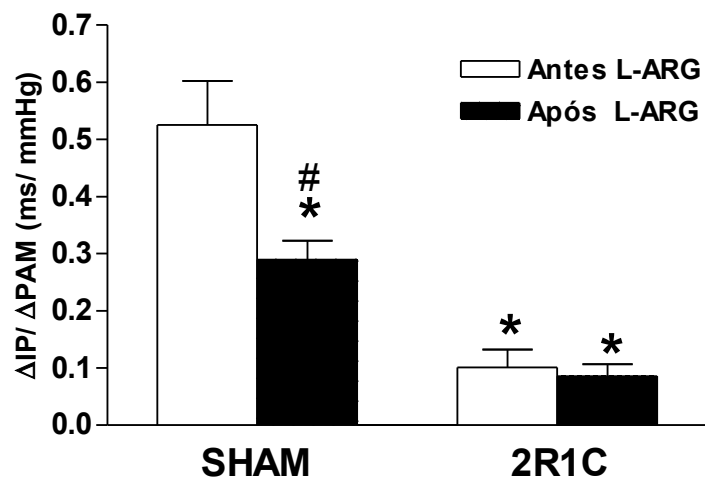


Figura 25: Alterações no índice de sensibilidade da bradicardia barorreflexa ($\Delta IP / \Delta PAM$, ms / mmHg) induzida por aumentos na PAM produzidos pela fenilefrina (i.v) em ratos normotensos SHAM (n=6) e com hipertensão renovascular 2R1C (n=7). *P<0,01 em relação à sensibilidade da bradicardia reflexa do grupo SHAM antes da microinjeção de L-arginina. #P<0,01 em comparação ao grupo 2R1C antes da microinjeção de L-NAME. (ANOVA seguido de Newman-Keuls)

Tabela XII: Alterações no índice de sensibilidade da bradicardia reflexa ($\Delta IP / \Delta PAM$, ms / mmHg) induzida por aumentos na PAM produzidos pela fenilefrina (i.v), após a microinjeção de L-arginina (50nmol) na CVLM de ratos normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C

	SHAM		2R1C	
	antes L-ARG	após L-ARG	antes L-ARG	após L-ARG
Sensibilidade da Bradicardia reflexa ($\Delta IP / \Delta PAM$, ms/ mmHg)	0,52 $\pm$ 0,08	0,29 $\pm$ 0,03 ^{*#}	0,10 $\pm$ 0,03 [*]	0,08 $\pm$ 0,02 [*]
n	6	6	7	7

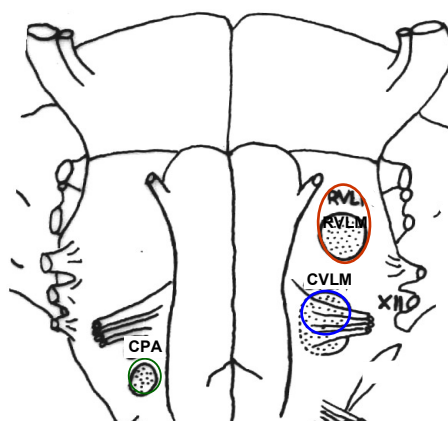
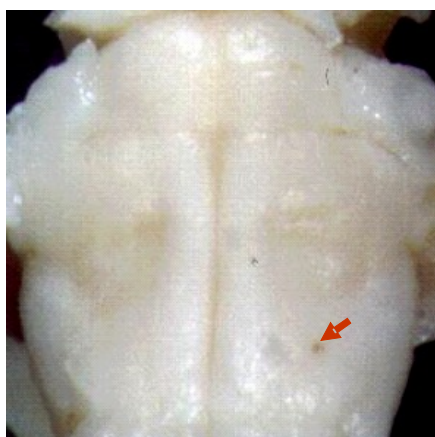
L-ARG= L-arginina. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. *P<0,01 em relação à sensibilidade da bradicardia reflexa do grupo SHAM antes da microinjeção de L-arginina. #P<0,01 em comparação ao grupo 2R1C antes da microinjeção de L-NAME. (ANOVA seguido de Newman-Keuls)

4.2.6 Avaliação Histológica da CVLM

A Figura 26 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.

A análise dos cortes histológicos dos animais deste estudo mostra que as microinjeções de L-NAME, L-arginina e salina, apresentam-se confinadas à porção ventral do núcleo reticular lateral e estão correlacionadas aos esquemas 71 a 73 do Atlas de Paxinos e Watson, 1986.

A



B

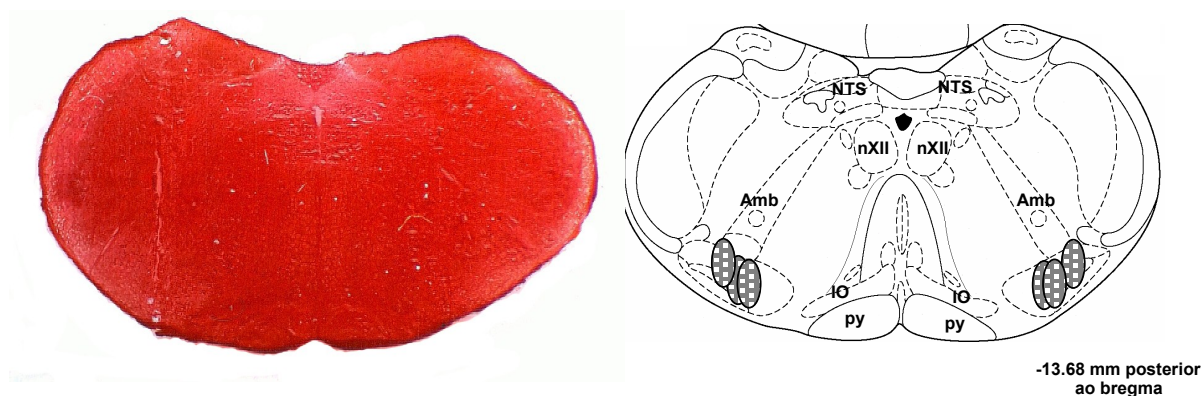


Figura 26: Painel A; Fotografia da superfície ventral do bulbo ilustrando o posicionamento típico (seta vermelha) das microinjeções na CVLM. À direita da foto, diagrama da superfície ventral do bulbo ilustrando a localização das diferentes áreas de controle cardiovascular. Painel B; Fotografia de um corte frontal do bulbo ilustrando o centro da microinjeção em um animal. À direita da foto, cópia do diagrama de corte frontal do bulbo extraído do atlas de Paxinos e Watson (1986), 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 hipoglossos; Py= trato piramidal.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o NO contribua para a menor sensibilidade da bradicardia reflexa apresentada na hipertensão renovascular 2R1C e para a manutenção desta patologia. A microinjeção do inibidor não seletivo de NO, L-NAME, na

CVLM, produziu uma queda na PAM e bradicardia em animais 2R1C e SHAM. Já, a microinjeção do precursor do NO, L-arginina, produziu uma elevação significativa na PAM e alterações variadas na FC em animais hipertensos 2R1C e normotensos SHAM. Adicionalmente, a microinjeção de L-NAME aumentou a sensibilidade da bradicardia reflexa em animais com hipertensão 2R1C, enquanto a microinjeção de L-arginina, na CVLM, diminuiu a sensibilidade da bradicardia reflexa dos ratos normotensos (SHAM). Esses achados em conjunto fornecem fortes evidências de um possível papel inibitório do NO sobre os neurônios da CVLM envolvidos na via do barorreflexo.

Alguns aspectos metodológicos devem ser considerados na interpretação de nossos resultados. Respostas cardiovasculares centrais ou a reatividade das diferentes vias eferentes podem ser modificadas pela anestesia. No entanto, o anestésico uretana é muito utilizado em experimentos com animais, principalmente por causa de sua ação anestésica de longa duração e propriedades relaxantes sobre a musculatura esquelética (Strobel e Wollman, 1969). Além disso, a uretana produz uma condição de anestesia cirúrgica que é caracterizada por apenas uma pequena diminuição da atividade do sistema nervoso autônomo (SNA), tornando este anestésico apropriado para o estudo da função cardiovascular (Maggi e Meli, 1986). A uretana produz depressão tanto das respostas pressoras como depressoras decorrentes da estimulação do SNC. Assim, seu efeito depressor não é seletivo, isto é, tanto as respostas pressoras como depressoras são afetadas de maneira semelhante, ao passo que outros anestésicos (que atuam mimetizando ou aumentando os efeitos do neurotransmissor inibitório ácido γ -aminobutírico, o GABA) abolem seletivamente as respostas depressoras e as convertem, frequentemente em episódios pressores (Lalley, 1980).

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 desse tipo de experimento, uma vez que provocam uma lesão mecânica mais extensa no tecido a ser estudado quando comparado ao pequeno dano produzido pelas micropipetas de vidro usadas em nossos experimentos (Michellini e Bonagamba, 1990; Fontes e cols., 1997). As micropipetas de vidro utilizadas no presente estudo possuem um diâmetro que variam entre 100 a 150 μ m, 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 e isto diminui a influência de estímulos eferentes, entre outros, de estruturas diencefálicas, que interferem nos circuitos bulbares envolvidos no controle barorreflexo (Dampney, 1994b; Dampney e cols., 2002). A utilização da anestesia permite também o posicionamento dos animais em estereotáxico (cabeça em ângulo fixo),

minimizando a interferência de ajustes desencadeados por aferências labirínticas (Yates e cols., 1993) pela movimentação da cabeça no espaço (reflexo de endireitamento) através do reflexo vestibulo-simpático (Kerman e cols., 2000).

A importância clínica de se estudar a hipertensão é que a patologia apresenta grande mortalidade (Isles e cols., 1990; Conlon e cols., 1998) e a maioria das mortes são atribuídas a eventos cardiovasculares (Johansson e cols., 1999). A elevada atividade simpática cardíaca que ocorre nesta doença, ainda torna os pacientes mais susceptíveis à arritmia ventricular e morte súbita, o que piora ainda mais o prognóstico dos mesmos (Meredith e cols., 1991). Além da função cardíaca simpática alterada, os pacientes com hipertensão arterial ainda possuem uma reduzida excreção de catecolaminas (Petersson e cols., 2002). Estas considerações justificam os estudos que são realizados com o objetivo de melhor elucidar o desenvolvimento e a manutenção desta patologia, além de nos permitir entender os mecanismos centrais que regulam a PA.

No presente estudo a pletismografia de cauda foi utilizada para mensurar indiretamente o desenvolvimento da hipertensão renovascular 2R1C. Através desta análise, observou-se que houve um aumento significativo da PA dos animais 2R1C a partir da segunda semana após a cirurgia, quando comparado ao grupo controle (SHAM). Além disso, os altos níveis pressóricos dos animais 2R1C não foram diferentes entre a terceira e quarta semana após a clipagem. Os níveis mais altos de PAM já nas primeiras semanas após as cirurgias 2R1C, possivelmente, devem-se a principal característica desse modelo de hipertensão, a dependência do sistema renina angiotensina (SRA) (Leenen e de Jong, 1971; Lerman e cols., 2005). Os dados mostrando aumentos da PA nas primeiras semanas após cirurgia 2R1C estão de acordo com os estudos anteriores da literatura que mostraram uma elevação substancial dos níveis de Ang II plasmáticos e centrais durante o período inicial de desenvolvimento da hipertensão renovascular (1 a 4 semanas) (Lazartigues e cols., 2004).

A mensuração direta da PAM após 4 semanas da cirurgia 2R1C, através do transdutor de pressão mostrou, como esperado, que os ratos hipertensos 2R1C apresentaram aumento significativo da PAM e não apresentaram alterações significativas em relação à FC, quando comparados aos ratos SHAM. Nossos resultados estão de acordo com estudos da literatura (DeForrest e cols., 1982; Britto e cols., 1997; Cervenka e cols., 2002; Lazartigues e cols., 2004) e com dados anteriores de nosso laboratório (Rodrigues e cols., 2007; Cangussu e cols., 2009).

O SRA possui um importante papel na regulação da PA durante o desenvolvimento da hipertensão renovascular (DeForrest e cols., 1982). Durante a fase inicial da hipertensão 2R1C, (aproximadamente 1 a 4 semanas após a cirurgia) (Sigmon e Beierwaltes, 1998), o desenvolvimento da hipertensão é dependente da atividade da renina e dos níveis elevados de Ang II plasmáticos (Cervenka e cols., 2002; Lazartigues e cols., 2004). 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. Entretanto, o maior fluxo sanguíneo para o rim não-clipado, diminui de forma compensatória sua produção de renina, mas por fatores ainda desconhecidos, esse rim aumenta a produção de Ang II (Navar e cols., 1998).

Plath (1983), Guan e colaboradores (1982) e Navar e colaboradores (1995) mostraram que os efeitos diretos e indiretos do aumento das concentrações de Ang II circulante conjuntamente aos aumentos dos níveis circulantes de aldosterona e da atividade simpática, dependentes da ação da Ang II, contribuem para a incapacidade excretória do rim não-clipado. Na fase crônica da hipertensão 2R1C, a partir da 4ª semana após a cirurgia (Sigmon e Beierwaltes, 1998), 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 vários tecidos (Okamura e cols., 1986; Nishimura e cols., 1992; Cervenka e cols., 2002), 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 (Sigmon e Beierwaltes, 1998). Corroborando com esses estudos, Lazartigues e colaboradores (2004) mostraram que 28 dias após a cirurgia 2R1C em camundongos, os níveis plasmáticos de Ang II estão normalizados, mas ocorre um grande aumento do nível deste peptídeo no bulbo e hipotálamo.

A avaliação do peso dos rins (clipados e não clipados) em nosso estudo foi usada como um parâmetro para caracterização deste modelo de hipertensão. A redução observada do peso do rim clipado (rim esquerdo) foi devido à estenose da artéria renal e consequentemente, diminuição do fluxo sanguíneo para este 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. Para melhor caracterizar a hipertensão renovascular 2R1C de Goldblatt realizamos o cálculo do percentual de diferença entre rins para animais 2R1C, em comparação ao grupo SHAM. Nossos dados mostraram que os animais 2R1C apresentaram um percentual de diferença médio entre rins (clipado e não-clipado), em torno de 40%. Estes dados estão de acordo com estudos recentes realizados em nosso laboratório (Rodrigues e cols., 2007).

No presente estudo, também correlacionamos a PAM basal aferida diretamente pelo transdutor de pressão com o peso úmido relativo do rim direito, percentual de diferença de peso entre rim esquerdo/direito e com o peso úmido relativo do rim esquerdo dos ratos 2R1C. Nossa hipótese era que quanto maior fosse a PAM dos animais 2R1C, maior elevado seria o peso relativo do rim direito e percentual de diferença entre rim esquerdo/direito e menor seria o peso relativo do rim esquerdo. De fato, observamos que a PAM correlacionou-

se positivamente com o peso relativo do rim direito e com o percentual de diferença de peso entre rim esquerdo/direito dos animais 2R1C. No entanto, não houve correlação entre a PAM e o peso relativo do rim esquerdo, sugerindo que o aumento da pressão afeta ou é mais influenciado pelas alterações que ocorrem no rim direito. Além disso, foi observado que ratos hipertensos apresentaram percentuais de diferença entre rins (clipado e não-clipado) variando entre 22 e 60%.

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 deste órgão dos animais 2R1C, quando 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, quando 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 (Hunter e Chien, 1999). A hipertrofia ventricular esquerda pode ser estimulada pelos altos níveis de aldosterona e Ang II circulantes, observados durante a fase aguda de desenvolvimento da hipertensão nesse modelo.

No presente estudo mostramos que a microinjeção do L-NAME (inibidor da síntese de NO) na CVLM produz uma queda na PA e bradicardia em animais normotensos SHAM e com hipertensão renovascular 2R1C. Além disso, a microinjeção de L-arginina (precursor do NO) na CVLM produziu um aumento na PA e alterações variadas na FC (variando entre taquicardia e bradicardia às vezes no mesmo animal) em animais SHAM e 2R1C. Esses dados sugerem que a inibição do NO basal na CVLM, produzida pela microinjeção de L-NAME possa estar causando um aumento da atividade de neurônios da CVLM e consequentemente, uma redução na atividade do SNS, enquanto o aumento dos níveis de NO na CVLM, produzido pela microinjeção de L-arginina, possa estar provocando uma redução na atividade neuronal da CVLM e consequentemente promovendo uma elevação na atividade do SNS. Os dados do presente estudo estão de acordo com vários trabalhos da literatura que mostraram a participação do NO em mecanismos centrais relacionados ao controle do SNS. (Krukoff, 1999; Patel e cols., 2001; Ramchandra e cols., 2005; Tandai-Hiruma e cols., 2005; Carlson e Wyss, 2008) .

O presente estudo também mostrou que o efeito pressor da L-ARGININA na CVLM, foi abolido pela microinjeção prévia de L-NAME na CVLM de ratos SHAM e com hipertensão

2R1C, o que confirma que os efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de L-arginina na CVLM foram realmente devido à elevação dos níveis de NO. Esse dado está em concordância com outro estudo da literatura realizado no PVN que mostrou que a microinjeção de L-NAME aumenta a atividade simpática renal (ASR), PA e FC, enquanto a microinjeção de L-arginina reverte estes efeitos do L-NAME (Patel e cols., 2001). Além disso, o efeito do L-NAME em elevar a ASR, PA e FC foi abolido após a microinjeção de L-arginina no PVN (Patel e cols., 2001). Esses dados, juntamente com os nossos, confirmam a especificidade da L-arginina em aumentar os níveis de NO na CVLM.

Em tecidos cerebrais sobre condições normais, o NO se origina predominantemente de duas fontes: nNOS e eNOS. Acredita-se que esta via de controle de áreas centrais pelo NO envolva neurônios excitatórios glutamatérgicos (Garthwaite, 1991) e inibitórios GABAérgicos (Bains e Ferguson, 1997; Zhang e cols., 2002; Li e cols., 2003).

A produção de NO em áreas centrais foi mencionada estar ligada, pelo menos em parte, ao receptor NMDA, do glutamato (Garthwaite, 1991). Os receptores NMDA podem promover a ativação da nNOS com um pico de 5 a 15 minutos, retornando aos níveis basais após 60 minutos. (Do e cols., 2002). Esse processo foi descrito em várias regiões centrais como hipocampus, núcleo estriado, hipotálamo e locus ceruleus (Maura e cols., 2000; Fedele e cols., 2001; Trabace e cols., 2004). Uma interação inversa entre o NO e glutamato também foi observada. Estudos “in vivo” em ratos utilizando-se doadores de NO, inibidores de NO e agonistas de receptor NMDA do glutamato sugerem que o NO aumente a liberação de glutamato em várias áreas do SNC (Prast e cols., 1998). Tem sido sugerido que o NO possa atuar como uma molécula que estimula retrogradamente a liberação de glutamato através de uma via dependente de GMPc (guanosina monofosfato cíclico)

Por outro lado, a maioria dos estudos da literatura mostraram que o NO promove a ativação de neurônios inibitórios GABAérgicos. A estimulação de fibras GABAérgicas pelo NO tem sido documentada em núcleos centrais como PVN (Krukoff e cols., 1997; Vacher e cols., 2003), NTS (Sakai e cols., 2000; Hirooka e cols., 2003), RVLM (Kishi e cols., 2002; Kishi e cols., 2003; Hirooka, 2004) e CVLM (Shapoval e cols., 1991; Krukoff e cols., 1995; Lage e cols., 1999).

A perfusão no fluido cérebro espinhal do PVN com o NO mostrou aumentos nas concentrações de alguns aminoácidos no líquido perfundido, incluindo o neurotransmissor inibitório GABA. Logo, foi proposto que os efeitos do NO no PVN podem ser mediados pela liberação deste neurotransmissor inibitório GABA (Zhang e Patel, 1998). A microinjeção de nitroprussiato de sódio no PVN produz diminuição da ASR, PA e FC, efeitos estes, que foram eliminados após o bloqueio do sistema do GABA com bicuculina, um antagonista de receptor A do GABA (Zhang e Patel, 1998). A microinjeção de L-NAME no PVN produz aumentos na ASR e na PA (Zhang e Patel, 1998). Esses efeitos simpato-excitatórios do L-

NAME no PVN foram abolidos pela ativação do sistema do GABA com muscimol, um agonista do receptor GABA. Além disso, estudos recentes de eletrofisiologia indicam que o NO pode inibir neurônios parvocelulares do PVN (Stern e cols., 2003; Stern, 2004).

Bains e Ferguson em 1997 mostraram que a microinjeção de um doador de NO, S-nitroso N-acetilpenicilamina (SNAP) ou o precursor da síntese do NO (L-arginina) aumentaram a frequência de potenciais pós-sinápticos inibitórios no PVN. Esse aumento na frequência de potenciais inibitórios foi atribuído às ações diretas do NO no terminal pré-sináptico. Nesse estudo, foi atribuída ao NO a capacidade de estimular a liberação de neurotransmissores, independentemente da estimulação do cálcio, através da modificação da interação entre proteínas sinápticas que regulam a liberação de neurotransmissores (Meffert e cols., 1996). Bains e Ferguson (1997) ainda sugeriram a possibilidade de um mecanismo pós-sináptico de ação do NO, através do aumento da condutância do receptor A do GABA, evidenciando dois mecanismos sinérgicos de ação do NO, pré e pós-sináptico. Assim, o NO poderia atuar diretamente em nível do receptor A do GABA através do aumento da condutância do receptor, de maneira similar a sua interação com grupos tióis localizados no receptor NMDA. Ambos os efeitos são responsáveis pelo aumento da atividade de neurônios inibitórios GABAérgicos (Bains e Ferguson, 1997).

O NO pode modular a transmissão GABAérgica induzindo alteração da excitabilidade dos neurônios GABAérgicos (por exemplo, causando a despolarização da membrana) ou pela modulação direta da maquinaria de liberação dos neurotransmissores. Em terminais pré-sinápticos a liberação de neurotransmissores são frequentemente regulados por mudanças nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} ou pela modulação do Ca^{2+} externo (Zanzinger e cols., 1995). A via NO-GMPc tem sido mostrada na ativação da liberação de Ca^{2+} em células da glia (Willmott e cols., 2000). Wang e colaboradores (2006) mostraram que o NO produziu alterações relacionadas ao transportador GABA em neurônios GABAérgicos, incluindo variações relacionadas ao Ca^{2+} e Na^+ . Esses efeitos foram abolidos pelo inibidor da guanilato ciclase solúvel (sGC), ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) que impediu a elevação de Ca^{2+} intracelular e a despolarização induzida pelo NO em neurônios GABAérgicos.

A relação entre o NO e o NTS ainda não está completamente estabelecida. Os estudos de Wang e colaboradores (2007) e Pajolla e colaboradores (2009) mostraram que o NO no NTS pode atuar sobre neurônios glutamatérgicos excitatórios e GABAérgicos inibitórios. Wang e colaboradores (2007) utilizando registros eletrofisiológicos de neurônios através da técnica “patch clamp” (técnica para observação da atividade elétrica de membranas celulares) observaram que sub-populações de neurônios do NTS apresentaram aumento da frequência de potenciais pós-sinápticos inibitórios (estimulação elétrica de neurônios GABAérgicos) e de potenciais pós-sinápticos excitatórios (estimulação elétrica de

neurônios glutamatérgicos) após a microdialise de solução aquosa de NO (NOaq) ou do doador de NO, dietilamina NONOate (DEA/NO). Neste mesmo estudo, a aplicação de ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel, sGC), aboliu os potenciais pós-sinápticos inibitórios e excitatórios, sugerindo um mecanismo de ação direto do NO nestes neurônios do NTS. Pajolla e colaboradores (2009) através de cortes do tronco cerebral avaliaram as concentrações de NO no NTS através da técnica de luz fluorescente (DAF-2 DA). Após a pré-incubação destes cortes do NTS com bicuculina (antagonista do receptor A do neurotransmissor GABA) e ácido Kinurênico (antagonista dos receptores ionotrópicos do neurotransmissor glutamato), os autores, deste estudo, observaram que ambas as drogas diminuíram a fluorescência basal do NO no NTS, sugerindo que os receptores glutamato e do GABA estão envolvidos com a liberação de NO no NTS.

Wang e colaboradores (2006) fizeram culturas de fatias do tronco cerebral de ratos e utilizaram um vetor adenoviral para que neurônios GABAérgicos emitissem fluorescência quando analisados por microscopia confocal. Neste estudo, a aplicação do doador do NO, DEA/NO, promoveu um aumento do cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ em somas e dendritos de todos os neurônios GABAérgicos testados. Adicionalmente, foi observado neste mesmo estudo, que o doador do NO, DEA/NO promoveu uma despolarização de neurônios GABAérgicos. Ambos, aumento do influxo de Ca^{2+} e despolarização que ocorreram em neurônios GABAérgicos em resposta à perfusão de DEA/NO no NTS, foram abolidos pelo inibidor da sGC (guanilato ciclase solúvel), ODQ. Os autores deste estudo também observaram que o aumento dos estoques intracelulares de cálcio após a perfusão com o doador DEA/NO em neurônios do NTS são atribuídos ao ativador endógeno cADPR, visto que o antagonista deste componente, o 8-Br-cADPR, bloqueou os aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ induzidos pela perfusão de DEA/NO no NTS. Sendo assim, os autores deste estudo concluíram que a ativação de neurônios GABAérgicos do NTS, que ocorre devido ao aumento dos níveis de NO, pode acontecer através da via NO-cGMP-cADPR- Ca^{2+} .

Waki e colaboradores (2003) observaram que o bloqueio crônico da eNOS no NTS aumentou a sensibilidade do barorreflexo e doares de NO e L-arginina diminuíram a função barorreflexa de ratos através de um mecanismo sensível ao ODQ em preparação coração-tronco cerebral isolados de ratos (maneira "in vitro" de se estudar o sistema nervoso e sistema cardiovascular) (Paton e cols., 2001). Estes dados, juntamente com os anteriormente descritos, confirmam que o NO no NTS é capaz ativar neurônios inibitórios GABAérgicos. (Wang e cols., 2006).

Na RVLM, o aumento da produção de NO induzido por uma superexpressão de eNOS (promovida através de transferência de adenovírus para esta região) diminui a PA e FC devido à inibição da atividade do SNS (Kishi e cols., 2001; Kishi e cols., 2002; Kishi e cols., 2003) confirmando que o NO na RVLM também é um agente predominantemente

inibitório (Patel e cols., 2001; Martins-Pinge e cols., 2007). Em outro estudo, Zanzinger e colaboradores (1995) mostraram que a inibição do NO pela administração de L-NNA (inibidor de NOS), na RVLM, produziu um aumento da atividade do SNS e PA em gatos desnervados e em ratos com barorreflexo intacto (Lin e cols., 1999). Além disso, a microinjeção de L-arginina ou o doador de NO, nitroprussiato de sódio, na RVLM, produziram uma diminuição na PA e ASR em gatos (Zanzinger e cols., 1995). Em 2007, Martins-Pinge e colaboradores mostraram que o NO derivado da nNOS diminui a eficácia da transmissão glutamatérgica (mediada por iNOS) na RVLM (Martins-Pinge e cols., 2007). Outros estudos também mostraram que o NO estimula a transmissão gabaérgica da RVLM, causando uma diminuição da atividade neuronal da RVLM em ratos SHR (Kagiyama e cols., 1998; Chan e cols., 2001; Kishi e cols., 2002; Gamboa e cols., 2008) e melhorando a sensibilidade do barorreflexo (Kishi e cols., 2003; Wang e cols., 2003).

Na CVLM, Shapoval e colaboradores (1991) mostraram que as microinjeções unilaterais de nitroprussiato de sódio (um doador de NO) e L-arginina (precursor da síntese de óxido nítrico) em gatos anestesiados produziram um aumento na pressão arterial média (PAM) e atividade do SNS, enquanto a microinjeção de L-NMMA, um inibidor não seletivo das isoformas de NOS, produziu efeitos opostos. Resultados semelhantes foram encontrados por Yang e colaboradores (1996) e Lage e colaboradores (1999) que mostraram que a microinjeção do L-NAME e L-NNA (inibidores não seletivos das isoformas de NOS) na CVLM de ratos normotensos produziram hipotensão, enquanto a microinjeção de L-arginina reverteu os efeitos produzidos pela microinjeção de L-NAME na CVLM (Yang e cols., 1996), além de promover um aumento da PA de ratos normotensos (Lage e cols., 1999). Esses estudos da literatura sobre a ação inibitória do NO no PVN, NTS, RVLM e CVLM estão de acordo com nosso presente estudo em que as microinjeções de L-NAME e L-arginina na CVLM provocaram respectivamente, queda e aumento da PA, tanto em animais SHAM, como em animais 2R1C, o que reforça a idéia que o NO possua um papel inibitório sobre os neurônios da CVLM. Entretanto, nosso estudo é o primeiro em que são realizadas microinjeções de drogas precursoras e inibidoras do NO na CVLM de ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

Nosso presente estudo mostrou ainda que apesar da microinjeção de L-arginina induzir aumento da PA, causou alterações variadas sobre a FC tanto em ratos SHAM, como em ratos 2R1C. Essas alterações variadas na FC induzida pela L-arginina estão de acordo com dados da literatura (Lage e cols., 1999). Em 2001, Kishi e colaboradores utilizando a técnica de transferência de adenovírus, para induzir uma superexpressão de gene para eNOS na RVLM, mostraram que o aumento do NO na RVLM promoveu a liberação de ambos glutamato e GABA, mensurados através da técnica de microdiálise. Entretanto, o aumento dos níveis de NO na RVLM produziu queda na PA e FC. Como já é bem conhecido

que o glutamato é um neurotransmissor excitatório e o GABA inibitório central (Bowery e cols., 1987) e como ambos foram liberados durante a superexpressão de eNOS na RVLM, os autores deste estudo sugeriram que a atividade GABAérgica induziu um efeito predominante sobre a atividade glutamatérgica, resultando na redução da atividade do SNS. Baseando-nos neste estudo, uma possível explicação para nossos dados seria que o aumento do NO na CVLM, induzido pela L-arginina, poderia promover a liberação de ambos glutamato (neurotransmissor excitatório) e GABA (neurotransmissor inibitório), sendo que o efeito sobre a PA seria predominante sobre neurônios GABAérgicos e sobre a FC seria o resultado da ativação tanto de neurônios excitatórios glutamatérgicos como neurônios inibitórios GABAérgicos, o que explicaria a variabilidade da FC após a microinjeção da L-arginina na CVLM. Isso pode ocorrer devido a existência de diferentes grupos de neurônios dentro da CVLM (Sved e cols., 2000; Colombari e cols., 2001).

De fato, várias observações sugerem que a CVLM é uma área funcionalmente heterogênea, visto que esta região contém pelo menos duas e provavelmente mais, populações distintas de neurônios envolvidos com diversos componentes da regulação cardiovascular (Colombari e cols., 2001). Estudos da literatura (Cravo e cols., 1991; Sved e cols., 2000; Colombari e cols., 2001) sugerem que a CVLM possa conter duas regiões funcionalmente distintas relacionadas ao controle da PA e do barorreflexo. Estes estudos mostraram que a microinjeção de ácido kaínico (agente que provoca destruição neuronal) na CVLM inativou a atividade neuronal desta região e aumentou a PA e atividade nervosa esplâncnica, mas produziu dois padrões diferentes de respostas a respeito do barorreflexo. Microinjeções de ácido kaínico localizadas mais rostralmente na CVLM (ao nível do óbex) bloquearam a simpatoinibição mediada pela ativação dos barorreceptores e respostas depressoras. Por outro lado, microinjeções deste ácido na CVLM mais caudal não afetaram o reflexo barorreceptor, mesmo se observando uma elevação na PA após a lesão neuronal. Foi observado também, que a inibição da CVLM ainda aumentou a atividade do SNS e PA mesmo após a deservação de fibras aferentes barorreceptoras (Cravo e Morrison, 1993), sugerindo uma atividade neuronal basal, mesmo na ausência de sinais aferentes vagais. Além disso, após lesão aguda do NTS, a inibição da CVLM ou bloqueio dos receptores gabaérgicos na RVLM, ainda promovem aumentos na PA (Dampney e cols., 1988; Gieroba e Blessing, 1992). Esses dados sugerem uma divisão anatômica funcional da CVLM em CVLM rostral (CVLMr), envolvida no controle simpático e mediando o reflexo barorreceptor e CVLM caudal (CVLMc), envolvida no controle da atividade simpática, mas não no controle do reflexo barorreceptor (Sved e cols., 2000).

Registros extracelulares confirmaram que a metade rostral da CVLM (CVLMr) está envolvida no controle simpático dependente do barorreflexo. Isto porque, (1) os neurônios da CVLMr são ativados pela estimulação elétrica dos barorreceptores periféricos ou aumentos

da PA; (2) neurônios da CVLMr, que se projetam diretamente para a RVLM, apresentam um aumento de atividade após estimulação dos barorreceptores periféricos; (3) a latência entre a estimulação dos barorreceptores e estimulação da CVLM, combinada com o atraso da conexão CVLM-RVLM, é aproximadamente igual a latência entre a estimulação dos barorreceptores e a inibição da RVLM (Jeske e cols., 1993).

No estudo em que lesões com ácido Kaínico foram produzidas na região mais caudal da CVLM (CVLMc) (Cravo e Morrison, 1993) foi observado que os neurônios atingidos foram principalmente os grupos de neurônios noradrenérgicos A1, não participantes do circuito neural do barorreflexo (Sved e cols., 2000; Colombari e cols., 2001). A PA, nesta situação, apresentou-se elevada, mas constatou-se que os reflexos cardiovasculares permaneciam intactos (Sved e cols., 2000). A hipótese que a CVLM pode influenciar a PA independentemente do reflexo barorreceptor é também consistente com dados anatômicos e de eletrofisiologia (Jeske e cols., 1993; Badoer e cols., 1994). Muitos dos neurônios da CVLM que se projetam para a RVLM não são ativados pelo aumento da atividade aferente barorreceptora (Jeske e cols., 1993; Badoer e cols., 1994). Adicionalmente, o percentual de neurônios da CVLM que se projetam para a RVLM e expressam a proteína FOS em resposta a ativação do barorreceptor é imensamente menor na metade caudal da CVLM (Badoer e cols., 1994). Esses dados mostram que a CVLM possui outras fontes de ativação independentes do NTS cardiovascular e barorreflexo (Sapru e Wang, 1976; Schreihöfer e Guyenet, 2002; Mandel e Schreihöfer, 2006; 2008). Essa via é pobremente estudada no que se refere a sua importância na regulação da PA.

Os nossos dados mostraram ainda que a bradicardia reflexa dos animais com hipertensão renovascular 2R1C foi menor em comparação com ratos normotensos SHAM, o que está de acordo com dados anteriores de nosso laboratório (Rodrigues e cols., 2007; Cangussu e cols., 2009) e com estudos prévios da literatura (Moreira e cols., 1988; Matsumura e cols., 1989; Kumagai e cols., 1990; Britto e cols., 1997; Krieger e cols., 1999).

Em adição, nossos dados mostraram que as microinjeções unilaterais do inibidor do NO, L-NAME e precursor do NO, L-arginina na CVLM produziram respectivamente, um aumento da sensibilidade da bradicardia reflexa de animais 2R1C e diminuição da sensibilidade da bradicardia reflexa dos ratos SHAM.

A redução do reflexo pressoreceptor durante a hipertensão está associada ao aumento da atividade do SNS (Whitescarver e cols., 1990; Lucini e cols., 1994; Head, 1995; DiBona, 2004; Grassi e cols., 2004; Salgado e cols., 2007). O NO foi mostrado ser um modulador da atividade do SNS, principalmente devido à sua maior expressão em áreas do SNC, durante estados patológicos que apresentam um aumento da atividade do SNS, como a hipertensão. (Takeda e Bunag, 1980; Arribas e cols., 1996; Cabassi e cols., 2002).

Através de técnicas histológicas, a NOS foi encontrada em diversas estruturas neurônais da via do barorreflexo (Mizukawa e cols., 1988; Dun e cols., 1993; Ceccatelli e cols., 1994). Há evidências substanciais vindas de estudos que utilizaram uma variedade de métodos como histoquímica NADPH-diaforase, detecção imunohistoquímica de NOS, hibridização “in situ” do RNA mensageiro (mRNA) da NOS, autoradiografia e western blot da presença de NOS em importantes núcleos centrais associados com o circuito cardíaco barorreceptor central, como amígdala, PVN, NTS, RVLM e CVLM (Dampney, 1994a; Dun e cols., 1994; Kishimoto e cols., 1996; Krukoff e Khalili, 1997; Iwase e cols., 1998; Sanchez e cols., 1999) durante estados patológicos, como a hipertensão (Vincent e Kimura, 1992; De Vente e cols., 1998; Fletcher e cols., 2006).

Durante a hipertensão, a expressão gênica da nNOS foi relatada estar aumentada na VLM em ratos SHR. Clavier e colaboradores (1994) e Plochocka-Zulinska e Krukoff (1997) mostraram que aumentos da expressão gênica de nNOS no hipotálamo, medula dorsal e CVLM se correlacionaram com aumentos da PA em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). As mudanças na expressão gênica de nNOS que foram encontradas em SHR adultos sugeriram que a produção de NO esteja alterada em regiões centrais específicas em resposta ao aumento da atividade do SNS e da PA (Plochocka-Zulinska e Krukoff, 1997).

Em 1995, Krukoff e colaboradores utilizaram a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) semiquantitativa para avaliar os níveis de nNOS na RVLM e CVLM de ratos com hipertensão 2R1C em relação aos ratos SHAM. Os resultados deste estudo mostraram que a CVLM apresenta aumentos na expressão gênica de nNOS nos ratos com hipertensão 2R1C após 3 semanas de clipagem da artéria renal. Nesse mesmo estudo não foram encontradas diferenças na expressão de nNOS na RVLM de ratos com hipertensão 2R1C em relação aos ratos SHAM. As alterações descritas para nNOS na CVLM de ratos 2R1C foram atribuídas aos aumentos da expressão gênica dentro de neurônios que normalmente já expressavam esse genes e não o recrutamento de novas populações de neurônios após a hipertensão (Krukoff e cols., 1995). Esta informação pode ser confirmada pelos estudos de Simonian e Herbison (1996) e Kantzides e Badoer (2005) em ratos normotensos.

Simonian e Herbison (1996) utilizando anticorpos policlonais específicos para nNOS, encontraram que de todos neurônios positivos para nNOS encontrados no bulbo, somente 2% foram na RVLM e a maioria destes neurônios positivos revelados por imunofluorescência (53%) situavam-se na CVLM.

Kantzides e Badoer (2005) encontraram que aproximadamente 8% dos neurônios da CVLM que projetam para RVLM são imunoreativos para nNOS. Esses neurônios estão localizados por toda a CVLM. O papel funcional dessa via é ainda obscuro, embora já esteja bem estabelecido que a microinjeção de doadores e inibidores de NOS na CVLM podem produzir variações significativas na PA (Shapoval e cols., 1991; Yang e cols., 1996; Krukoff,

1998; Lage e cols., 1999) como já mencionado. Estes estudos (Simonian e Herbison, 1996; Kantzides e Badoer, 2005) mostraram que durante a hipertensão ocorre a superexpressão de nNOS na CVLM e que este aumento de nNOS ocorre em neurônios que em condições não patológicas já expressavam genes para esta isoforma de NOS.

Embora o presente estudo não tenha utilizado técnicas para mensuração direta dos níveis de expressão das isoformas de NOS e/ou dosagem dos níveis de NO ou neurotransmissores na CVLM, acredita-se que a CVLM de animais com hipertensão renovascular 2R1C possua níveis aumentados de NO, sobretudo em neurônios da CVLM dependentes do controle do barorreflexo. Esse aumento da expressão de isoformas de NOS que ocorre na CVLM, em resposta a hipertensão, pode ser um dos responsáveis pela manutenção da hipertensão renovascular 2R1C e pela baixa sensibilidade da bradicardia reflexa apresentada durante a hipertensão. Em nosso estudo, a microinjeção de L-NAME parece ter inibido as altas concentrações de NO na CVLM de ratos com hipertensão 2R1C, aumentando a sensibilidade da bradicardia reflexa destes animais. Por outro lado, a microinjeção de L-arginina na CVLM mimetizou, em animais SHAM, o aumento do NO que ocorre durante a hipertensão e com isso diminuiu a sensibilidade da bradicardia reflexa destes animais.

Estas informações são reforçadas também pelos nossos dados referentes ao tempo de duração dos efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de L-NAME e L-arginina na CVLM. Em animais 2R1C observamos que o tempo de duração da bradicardia produzida pela microinjeção de L-NAME foi inferior ao tempo de duração em animais controle (SHAM). Associado a esse fato, a duração do efeito hipertensor da microinjeção de L-arginina e das alterações variadas produzidas pela mesma na FC foram superiores em animais 2R1C, quando comparado aos ratos normotensos (SHAM). Isso mostra um menor tempo de inibição do NO pelo L-NAME e a potencialização da duração dos efeitos cardiovasculares produzidos pela L-arginina em animais com hipertensão 2R1C, o que corrobora com os dados já descritos da literatura (Krukoff e cols., 1995) que mostraram que estes animais possuem maior expressão de NOS na CVLM, em comparação aos ratos SHAM.

Níveis aumentados de NO na CVLM poderiam levar ao aumento da liberação de neurotransmissores inibitórios, como o GABA (Getting e cols., 1996) em interneurônios da CVLM, que por sua vez diminuiriam a atividade de neurônios que partem para a RVLM, através de sinapses inibitórias. Adicionalmente, concentrações aumentadas de NO na CVLM podem elevar os níveis de subprodutos do metabolismo do NO, como peroxinitrito (ONOO^-) que também participa parcialmente da liberação do GABA induzida pelo NO (Guix e cols., 2005). Estas evidências fornecem suporte para nossa hipótese de que na hipertensão renovascular, altos níveis de NO na CVLM, sejam responsáveis pelo um aumento da

liberação de GABA.

O aumento da liberação de GABA na CVLM promovido pelo NO poderia prejudicar as interações existentes entre neurônios desta região com outros núcleos do SNC relacionados ao barorreflexo. Logo, algumas vias neurônais que podem ser afetadas pelos aumentos da expressão do NO são: (1) a já bem conhecida via inibitória GABAérgica existente entre CVLM e RVLM (Smith e Barron, 1990b; Muratani e cols., 1993), (2) a projeção excitatória dependente do barorreflexo do NTS comissural para a CVLM (Colombari e cols., 2001), ou mesmo (3) as conexões existentes entre a CVLM e o NA (McKittrick e Calaresu, 1997), que é uma região que ativa o SNP e com isso é fundamental na resposta bradicardica que ocorre após a estimulação dos barorreceptores periféricos.

Os dados apresentados da literatura, juntamente aos nossos dados do presente estudo fornecem fortes evidências que o NO, agindo sobre neurônios da CVLM, possa estar diretamente envolvido na baixa sensibilidade do barorreflexo que ocorre durante a hipertensão renovascular (Sved e cols., 2000; Pinho e cols., 2006).

Em resumo, os dados do presente estudo sustentam a hipótese que em animais com hipertensão 2R1C, (4 semanas após cirurgia de indução da hipertensão) ocorra uma elevação dos níveis de NO na CVLM, que pode se dar pelo aumento da expressão de isoformas de NOS já relatada em estudos da literatura (Krukoff e cols., 1995; Plochocka-Zulinska e Krukoff, 1997; Krukoff, 1999) durante a hipertensão. Esse aumento do NO na CVLM, durante a hipertensão, pode ser responsável pela elevação da atividade de neurônios GABAérgicos e pelo aumento da liberação do neurotransmissor inibitório GABA, que por sua vez diminuiria a atividade de grupos neurônais da CVLM, comprometendo as interações existentes entre esta região e outras áreas do circuito do barorreflexo como RVLM, NTS e NA que participam do controle da atividade do sistema nervoso autônomo. O resultado global da atuação do NO na CVLM seria a redução da sensibilidade do barorreflexo e a manutenção da hipertensão renovascular 2R1C.

6. PERSPECTIVAS

Diversos estudos mostraram que os animais com hipertensão apresentam um aumento da atividade do SNS e reduzida sensibilidade do barorreflexo (Moreira e cols., 1988; Kumagai e cols., 1990; Britto e cols., 1997; Cangussu e cols., 2009). Isso parece estar estritamente relacionado com aumento de componentes do SRA (Berenguer e cols., 1991; Morishita e cols., 1991; Yoshida e cols., 1991; Niederberger e cols., 1995; Jung e cols.,

2004) e com a superexpressão de NOS (Krukoff e cols., 1995; Plochocka-Zulinska e Krukoff, 1997; Krukoff, 1999) que ocorre durante esta patologia.

No modelo de hipertensão renovascular unilateral 2R1C, a estenose da artéria renal estimula o SRA. A contribuição do SRA neste modelo varia dependendo do tempo decorrido após a constrição da artéria renal (Martinez-Maldonado, 1991). Como já mencionado, nesse modelo de hipertensão, os níveis de Ang II estão aumentados na circulação na fase aguda após a cirurgia (de 1 a 4 semanas). Na fase crônica (mais que 4 semanas após a cirurgia de colocação do clipe) os níveis de Ang II circulantes já estão normais, mas altos níveis de Ang II centrais são detectados (Krukoff e cols., 1995; Duka e cols., 2001; Galli e Phillips, 2001; Lazartigues e cols., 2004). Além disso, é interessante observar que algumas áreas do SNC providas de barreira hemato-encefálica mais permeável (órgãos circunventriculares), estão suscetíveis à modulação pelas angiotensinas circulantes do SRA, cujos níveis estão aumentados em ratos com hipertensão 2R1C, o que pode exercer influência sobre a modulação central do barorreflexo.

A elevação dos componentes do SRA em áreas de controle do barorreflexo bulbar pode estar estritamente relacionada ao aumento da atividade do SNS e reduzida sensibilidade do barorreflexo encontrada em animais 2R1C. O aumento da atividade neuronal da RVLM (Chan e cols., 1991; Boone e McMillen, 1994; Suzuki e cols., 1994; Minson e cols., 1996) e reduzido tônus GABAérgico da CVLM para esta região (Smith e Barron, 1990b; a; Colombari e cols., 2001) que ocorrem durante a hipertensão também parecem estar ligados às alterações na expressão de componentes do SRA, nestas regiões.

Na RVLM, que possui um controle direto sobre neurônios pré-motores simpáticos da medula espinhal, foi mostrado que aumentos das concentrações locais de Ang II ativam a via simpática bulboespinhal durante a hipertensão (Niederberger e cols., 1995; Jenkins e cols., 1997; Kagiya e cols., 2001).

Os componentes do SRA também atuam sobre neurônios da CVLM durante a hipertensão (Ferreira e cols., 2008). Dados anteriores de nosso laboratório (Alzamora e cols., 2002; 2006; Cangussu e cols., 2009) mostraram que as microinjeções de Ang II e Ang-(1-7) na CVLM produzem uma redução significativa da PA. Foi mostrado também que a Ang-(1-7) na CVLM diminui a sensibilidade do barorreflexo, enquanto a microinjeção de Ang II nesta região apresenta efeitos opostos (Alzamora e cols., 2002; 2006). Além disso, em 2009, Cangussu e colaboradores mostraram que a microinjeção de A779 [antagonista de receptor MAS da Ang-(1-7)] aumenta a sensibilidade da bradicardia reflexa de ratos com hipertensão renovascular 2R1C, sugerindo que a Ang-(1-7) endógena na CVLM, pode ter uma influência negativa sobre a sensibilidade do barorreflexo na hipertensão renovascular (Cangussu e cols., 2009). Esses dados confirmam os importantes efeitos cardiovasculares de componentes do SRA na CVLM, principalmente durante a hipertensão.

Trabalhos da literatura já correlacionaram os efeitos dos peptídeos do SRA com o NO. No NTS foi mostrado que a Ang II pode estimular aumentos nas concentrações de NO (McQuillan e cols., 1994; Chin e cols., 1999; Wallerath e cols., 1999). O NO, também já foi apontado em diversos estudos (Calka e Block, 1993; Gironacci e cols., 2000; Santos e cols., 2008; Xia e Lazartigues, 2008; Zhang e cols., 2008) como participante das ações intracelulares da Ang-(1-7).

Portanto, acreditamos que as alterações cardiovasculares produzidas pelo NO na CVLM durante a hipertensão renovascular 2R1C, possam estar diretamente relacionadas ao aumento da atividade do SRA local. A nossa hipótese é que o efeito da Ang-(1-7) na CVLM em diminuir a sensibilidade da bradicardia reflexa (Alzamora e cols., 2002; 2006; Cangussu e cols., 2009) talvez seja mediado pelo NO, que também mostrou efeitos inibitórios sobre a CVLM no presente estudo, inclusive diminuindo a sensibilidade da bradicardia reflexa quando em níveis aumentados na CVLM. A melhora da sensibilidade do barorreflexo promovida pela Ang II na CVLM, também pode envolver um mecanismo mediado pelo NO, mas o mecanismo de ação mais provável para a melhora da sensibilidade do barorreflexo, promovida por este peptídeo na CVLM, talvez seja o que envolva o superóxido (O_2^-), já mostrado em vários estudos como mensageiro das ações intracelulares da Ang II (Zanzinger, 2002; Gao e cols., 2004; Mayorov e cols., 2004; Chan e cols., 2005; Mayorov, 2007a; Chan e cols., 2009; Oliveira-Sales e cols., 2009). A futura dosagem de peptídeos do SRA e seus respectivos receptores na CVLM, assim como a avaliação da expressão de nNOS, eNOS e iNOS e níveis de superóxido ou espécies anti-oxidantes como a enzima superóxido dismutase nesta região, durante a hipertensão 2R1C, serão fundamentais para o elucidação de nossas hipóteses. Estudos estão sendo realizados em nosso laboratório com o objetivo de esclarecer estes questionamentos.

7. SUMÁRIO

Em síntese, os resultados do presente estudo mostraram que:

Caracterização do modelo de hipertensão:

Os animais 2R1C apresentaram em relação aos SHAM:

- Uma elevação da PAM basal (pletismografia) a partir da segunda semana após cirurgia;
- Redução do peso relativo do rim esquerdo (clipado);
- Aumento do peso relativo do rim direito (não clipado);
- Elevação do peso relativo do coração e ventrículo esquerdo;
- Maior PAM aferida diretamente pelo transdutor de pressão.

Efeitos cardiovasculares promovidos pelas microinjeções de L-NAME e L-arginina

- A microinjeção de L-NAME na CVLM produziu queda na PAM e FC em animais 2R1C e SHAM;
- Já a microinjeção de L-arginina na CVLM causou elevação da PAM e alterações variadas na FC em animais 2R1C e SHAM;
- Os animais 2R1C apresentaram um menor tempo de duração da queda na FC produzida pelo L-NAME na CVLM e um maior tempo de duração dos efeitos cardiovasculares produzidos pela L-arginina na CVLM

Sensibilidade da bradicardia Reflexa

- A sensibilidade da bradicardia reflexa dos animais 2R1C foi menor quando comparada aos ratos normotensos SHAM;
- A microinjeção do L-NAME na CVLM aumentou sensibilidade da bradicardia reflexa dos animais 2R1C;
- Já a microinjeção de L-arginina na CVLM reduziu a sensibilidade da bradicardia reflexa dos animais SHAM.

8. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que níveis elevados de NO na CVLM contribuem para a reduzida sensibilidade da bradicardia reflexa que ocorre na hipertensão renovascular 2R1C. E além disso, os presentes dados sugerem que o aumento do NO na CVLM pode participar da gênese e/ ou manutenção da hipertensão que ocorre neste modelo.

9. REFERÊNCIAS

- Agarwal, S. K. e Calaresu, F. R. *Monosynaptic connection from caudal to rostral ventrolateral medulla in the baroreceptor reflex pathway*. Brain Res. v.555, n.1: p.70-4. 1991.
- Agarwal, S. K., Gelsema, A. J. e Calaresu, F. R. *Neurons in rostral VLM are inhibited by chemical stimulation of caudal VLM in rats*. Am J Physiol. v.257, n.2 Pt 2: p.R265-70. 1989.
- Agarwal, S. K., Gelsema, A. J. e Calaresu, F. R. *Inhibition of rostral VLM by baroreceptor activation is relayed through caudal VLM*. Am J Physiol. v.258, n.5 Pt 2: p.R1271-8. 1990.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E. e Knowles, R. G. *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J. v.357, n.Pt 3: p.593-615. 2001.
- Almeida, A. P., Frabregas, B. C., Madureira, M. M., Santos, R. J., Campagnole-Santos, M. J. e Santos, R. A. *Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart*. Braz J Med Biol Res. v.33, n.6: p.709-13. 2000.
- Alzamora, A. C., Santos, R. A. e Campagnole-Santos, M. J. *Hypotensive effect of ANG II and ANG-(1-7) at the caudal ventrolateral medulla involves different mechanisms*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. v.283, n.5: p.R1187-95. 2002.
- Alzamora, A. C., Santos, R. A. e Campagnole-Santos, M. J. *Baroreflex modulation by angiotensins at the rat rostral and caudal ventrolateral medulla*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. v.290, n.4: p.R1027-34. 2006.
- Ambuhl, P., Felix, D., Imboden, H., Khosla, M. C. e Ferrario, C. M. *Effects of angiotensin analogues and angiotensin receptor antagonists on paraventricular neurones*. Regul Pept. v.38, n.2: p.111-20. 1992.
- Armstrong, W. E., Warach, S., Hatton, G. I. e McNeill, T. H. *Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis*. Neuroscience. v.5, n.11: p.1931-58. 1980.
- Arribas, S. M., Alonso, M. J., Marin, J., Fernandes, F., Llergo, J. L., Sanchez-Ferrer, C. F. e Salaices, M. *Noradrenergic transmission in the tail artery of hypertensive rats transgenic for the mouse renin gene Ren-2*. J Auton Pharmacol. v.16, n.2: p.69-77. 1996.
- Averill, D. B. e Diz, D. I. *Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata*. Brain Res Bull. v.51, n.2: p.119-28. 2000.
- Badoer, E., McKinley, M. J., Oldfield, B. J. e Mcallen, R. M. *Localization of barosensitive neurons in the caudal ventrolateral medulla which project to the rostral ventrolateral medulla*. Brain Res. v.657, n.1-2: p.258-68. 1994.

- Bains, J. S. e Ferguson, A. V. *Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic inputs to type I neurones of the rat paraventricular nucleus*. J Physiol. v.499 (Pt 3): p.733-46. 1997.
- Benarroch, E. E. *Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease*. Clin Auton Res. v.15, n.4: p.254-63. 2005.
- Berenguer, L. M., Garcia-Estan, J., Ubeda, M., Ortiz, A. J. e Quesada, T. *Role of renin-angiotensin system in the impairment of baroreflex control of heart rate in renal hypertension*. J Hypertens. v.9, n.12: p.1127-33. 1991.
- Blessing, W. W. e Reis, D. J. *Evidence that GABA and glycine-like inputs inhibit vasodepressor neurons in the caudal ventrolateral medulla of the rabbit*. Neurosci Lett. v.37, n.1: p.57-62. 1983.
- Boone, J. B., Jr. e Mcmillen, D. *Proenkephalin gene expression is altered in the brain of spontaneously hypertensive rats during the development of hypertension*. Brain Res Mol Brain Res. v.24, n.1-4: p.320-6. 1994.
- Bowery, N. G., Hudson, A. L. e Price, G. W. *GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system*. Neuroscience. v.20, n.2: p.365-83. 1987.
- Braam, B., Navar, L. G. e Mitchell, K. D. *Modulation of tubuloglomerular feedback by angiotensin II type I receptors during the development of Goldblatt hypertension*. Hypertension. v.25, n.6: p.1232-7. 1995.
- Bredt, D. S. e Snyder, S. H. *Nitric oxide: a physiologic messenger molecule*. Annu Rev Biochem. v.63: p.175-95. 1994.
- Britto, R. R., Santos, R. A., Fagundes-Moura, C. R., Khosla, M. C. e Campagnole-Santos, M. J. *Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats*. Hypertension. v.30, n.3 Pt 2: p.549-56. 1997.
- Brooks, V. L., Haywood, J. R. e Johnson, A. K. *Translation of salt retention to central activation of the sympathetic nervous system in hypertension*. Clin Exp Pharmacol Physiol. v.32, n.5-6: p.426-32. 2005.
- Brosnihan, K. B., Li, P. e Ferrario, C. M. *Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide*. Hypertension. v.27, n.3 Pt 2: p.523-8. 1996.
- Brown, G. C. e Cooper, C. E. *Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase*. FEBS Lett. v.356, n.2-3: p.295-8. 1994.
- Cabassi, A., Vinci, S., Cantoni, A. M., Quartieri, F., Moschini, L., Cavazzini, S., Cavatorta, A. e Borghetti, A. *Sympathetic activation in adipose tissue and skeletal muscle of hypertensive rats*. Hypertension. v.39, n.2 Pt 2: p.656-61. 2002.
- Calka, J. e Block, C. H. *Angiotensin-(1-7) and nitric oxide synthase in the hypothalamo-neurohypophyseal system*. Brain Res Bull. v.30, n.5-6: p.677-85. 1993.

- Campagnole-Santos, MJ; Haibara, AS. *Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial*. rev bras hipertens., 8: 30-40. 2001.
- Campos, R. R., Carillo, B. A., Oliveira-Sales, E. B., Silva, A. M., Silva, N. F., Futuro Neto, H. A. e Bergamaschi, C. T. *Role of the caudal pressor area in the regulation of sympathetic vasomotor tone*. Braz J Med Biol Res. v.41, n.7: p.557-62. 2008.
- Cangussu, L. M., De Castro, U. G., Do Pilar Machado, R., Silva, M. E., Ferreira, P. M., Dos Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J. e Alzamora, A. C. *Angiotensin-(1-7) antagonist, A-779, microinjection into the caudal ventrolateral medulla of renovascular hypertensive rats restores baroreflex bradycardia*. Peptides. v.30, n.10: p.1921-7. 2009.
- Cao, W. H. e Morrison, S. F. *Differential chemoreceptor reflex responses of adrenal preganglionic neurons*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. v.281, n.6: p.R1825-32. 2001.
- Carden, W. B., Guido, W., Godwin, D. W. e Bickford, M. E. *Thalamocortical cells in the cat pulvinar nucleus transiently express nitric oxide synthase during development*. Neurosci Lett. v.351, n.2: p.87-90. 2003.
- Carlson, S. H. e Wyss, J. M. *Neurohormonal regulation of the sympathetic nervous system: new insights into central mechanisms of action*. Curr Hypertens Rep. v.10, n.3: p.233-40. 2008.
- Ceccatelli, S., Lundberg, J. M., Zhang, X., Aman, K. e Hokfelt, T. *Immunohistochemical demonstration of nitric oxide synthase in the peripheral autonomic nervous system*. Brain Res. v.656, n.2: p.381-95. 1994.
- Cervenka, L., Horacek, V., Vaneckova, I., Hubacek, J. A., Oliverio, M. I., Coffman, T. M. e Navar, L. G. *Essential role of AT1A receptor in the development of 2K1C hypertension*. Hypertension. v.40, n.5: p.735-41. 2002.
- Chan, J. Y., Wang, L. L., Wu, K. L. e Chan, S. H. *Reduced functional expression and molecular synthesis of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats*. Circulation. v.104, n.14: p.1676-81. 2001.
- Chan, R. K., Chan, Y. S. e Wong, T. M. *Electrophysiological properties of neurons in the rostral ventrolateral medulla of normotensive and spontaneously hypertensive rats*. Brain Res. v.549, n.1: p.118-26. 1991.
- Chan, R. K. e Sawchenko, P. E. *Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry*. J Neurosci. v.18, n.1: p.371-87. 1998.
- Chan, S. H., Hsu, K. S., Huang, C. C., Wang, L. L., Ou, C. C. e Chan, J. Y. *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. v.97, n.8: p.772-80. 2005.

- Chan, S. H., Wu, C. A., Wu, K. L., Ho, Y. H., Chang, A. Y. e Chan, J. Y. *Transcriptional upregulation of mitochondrial uncoupling protein 2 protects against oxidative stress-associated neurogenic hypertension*. *Circ Res*. v.105, n.9: p.886-96. 2009.
- Chin, S. Y., Pandey, K. N., Shi, S. J., Kobori, H., Moreno, C. e Navar, L. G. *Increased activity and expression of Ca(2+)-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats*. *Am J Physiol*. v.277, n.5 Pt 2: p.F797-804. 1999.
- Clavier, N., Tobin, J. R., Kirsch, J. R., Izuta, M. e Traystman, R. J. *Brain nitric oxide synthase activity in normal, hypertensive, and stroke-prone rats*. *Stroke*. v.25, n.8: p.1674-7; discussion 1677-8. 1994.
- Collins, R., Peto, R., Macmahon, S., Hebert, P., Fiebach, N. H., Eberlein, K. A., Godwin, J., Qizilbash, N., Taylor, J. O. e Hennekens, C. H. *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*. v.335, n.8693: p.827-38. 1990.
- Colombari, E., Sato, M. A., Cravo, S. L., Bergamaschi, C. T., Campos, R. R., Jr. e Lopes, O. U. *Role of the medulla oblongata in hypertension*. *Hypertension*. v.38, n.3 Pt 2: p.549-54. 2001.
- Conlon, P. J., Athirakul, K., Kovalik, E., Schwab, S. J., Crowley, J., Stack, R., Mccants, C. B., Jr., Mark, D. B., Bashore, T. M. e Albers, F. *Survival in renal vascular disease*. *J Am Soc Nephrol*. v.9, n.2: p.252-6. 1998.
- Coote, J. H. *A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney*. *Exp Physiol*. v.90, n.2: p.169-73. 2005.
- Cravo, S. L. e Morrison, S. F. *The caudal ventrolateral medulla is a source of tonic sympathoinhibition*. *Brain Res*. v.621, n.1: p.133-6. 1993.
- Cravo, S. L., Morrison, S. F. e Reis, D. J. *Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla*. *Am J Physiol*. v.261, n.4 Pt 2: p.R985-94. 1991.
- Dampney, R. A. *Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system*. *Physiol Rev*. v.74, n.2: p.323-64. 1994a.
- Dampney, R. A. *The subretrofacial vasomotor nucleus: anatomical, chemical and pharmacological properties and role in cardiovascular regulation*. *Prog Neurobiol*. v.42, n.2: p.197-227. 1994b.
- Dampney, R. A., Blessing, W. W. e Tan, E. *Origin of tonic GABAergic inputs to vasopressor neurons in the subretrofacial nucleus of the rabbit*. *J Auton Nerv Syst*. v.24, n.3: p.227-39. 1988.
- Dampney, R. A., Fontes, M. A., Hirooka, Y., Horiuchi, J., Potts, P. D. e Tagawa, T. *Role of angiotensin II receptors in the regulation of vasomotor neurons in the ventrolateral medulla*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. v.29, n.5-6: p.467-72. 2002.

De Gasparo, M. *New basic science initiatives with the angiotensin II receptor blocker valsartan*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. v.1, n.2 Suppl: p.S3-5. 2000.

De Vente, J., Hopkins, D. A., Markerink-Van Ittersum, M., Emson, P. C., Schmidt, H. H. e Steinbusch, H. W. *Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain*. Neuroscience. v.87, n.1: p.207-41. 1998.

DeForrest, J. M., Knappenberger, R. C., Antonaccio, M. J., Ferrone, R. A. e Creekmore, J. S. *Angiotensin II is a necessary component for the development of hypertension in the two kidney, one clip rat*. Am J Cardiol. v.49, n.6: p.1515-7. 1982.

Dibona, G. F. *The sympathetic nervous system and hypertension: recent developments*. Hypertension. v.43, n.2: p.147-50. 2004.

Dinerman, J. L., Dawson, T. M., Schell, M. J., Snowman, A. e Snyder, S. H. *Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A. v.91, n.10: p.4214-8. 1994.

Do, K. Q., Grima, G., Benz, B. e Salt, T. E. *Glial-neuronal transfer of arginine and S-nitrosothiols in nitric oxide transmission*. Ann N Y Acad Sci. v.962: p.81-92. 2002.

Duka, I., Kintsurashvili, E., Gavras, I., Johns, C., Bresnahan, M. e Gavras, H. *Vasoactive potential of the b(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension*. Circ Res. v.88, n.3: p.275-81. 2001.

Dun, N. J., Dun, S. L. e Forstermann, U. *Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat pontine medullary neurons*. Neuroscience. v.59, n.2: p.429-45. 1994.

Dun, N. J., Dun, S. L., Wu, S. Y., Forstermann, U., Schmidt, H. H. e Tseng, L. F. *Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat, mouse, cat and squirrel monkey spinal cord*. Neuroscience. v.54, n.4: p.845-57. 1993.

Elfering, S. L., Sarkela, T. M. e Giulivi, C. *Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem. v.277, n.41: p.38079-86. 2002.

Faria-Silva, R., Duarte, F. V. e Santos, R. A. *Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats*. Hypertension. v.46, n.4: p.948-52. 2005.

Fedele, E., Marchi, M. e Raiteri, M. *In vivo NO/cGMP signalling in the hippocampus*. Neurochem Res. v.26, n.8-9: p.1069-78. 2001.

Feldberg, W. e Guertzenstein, P. G. *Blood pressure effects of leptazol applied to the ventral surface of the brain stem of cats*. J Physiol. v.372: p.445-56. 1986.

Feldman, J. L. e Ellenberger, H. H. *Central coordination of respiratory and cardiovascular control in mammals*. Annu Rev Physiol. v.50: p.593-606. 1988.

- Feldman, P. D. e Moises, H. C. *Electrophysiological evidence for alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in solitary tract nucleus*. Am J Physiol. v.254, n.4 Pt 2: p.H756-62. 1988.
- Felix, D., Khosla, M. C., Barnes, K. L., Imboden, H., Montani, B. e Ferrario, C. M. *Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7)*. Hypertension. v.17, n.6 Pt 2: p.1111-4. 1991.
- Fernandes, L., Fortes, Z. B., Nigro, D., Tostes, R. C., Santos, R. A. e Catelli De Carvalho, M. H. *Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo*. Hypertension. v.37, n.2 Part 2: p.703-9. 2001.
- Ferrario, C. M., Chappell, M. C., Tallant, E. A., Brosnihan, K. B. e Diz, D. I. *Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7)*. Hypertension. v.30, n.3 Pt 2: p.535-41. 1997.
- Ferreira, P. M., Alzamora, A. C., Santos, R. A. e Campagnole-Santos, M. J. *Hemodynamic effect produced by microinjection of angiotensins at the caudal ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats*. Neuroscience. v.151, n.4: p.1208-16. 2008.
- Fletcher, J., Moody, W. E., Chowdhary, S. e Coote, J. H. *NO-cGMP pathway at ventrolateral medullary cardiac inhibitory sites enhances the baroreceptor reflex bradycardia in the rat*. Brain Res. v.1123, n.1: p.125-34. 2006.
- Fontes, M. A., Martins Pinge, M. C., Naves, V., Campagnole-Santos, M. J., Lopes, O. U., Khosla, M. C. e Santos, R. A. *Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats*. Brain Res. v.750, n.1-2: p.305-10. 1997.
- Freeman, E. J., Chisolm, G. M., Ferrario, C. M. e Tallant, E. A. *Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth*. Hypertension. v.28, n.1: p.104-8. 1996.
- Furchgott, R. F., Cherry, P. D., Zawadzki, J. V. e Jothianandan, D. *Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries*. J Cardiovasc Pharmacol. v.6 Suppl 2: p.S336-43. 1984.
- Gallagher, P. E., Ferrario, C. M. e Tallant, E. A. *MAP kinase/phosphatase pathway mediates the regulation of ACE2 by angiotensin peptides*. Am J Physiol Cell Physiol. v.295, n.5: p.C1169-74. 2008.
- Galli, S. M. e Phillips, M. I. *Angiotensin II AT(1A) receptor antisense lowers blood pressure in acute 2-kidney, 1-clip hypertension*. Hypertension. v.38, n.3 Pt 2: p.674-8. 2001.
- Gamboa, A., Shibao, C., Diedrich, A., Paranjape, S. Y., Farley, G., Christman, B., Raj, S. R., Robertson, D. e Biaggioni, I. *Excessive nitric oxide function and blood pressure regulation in patients with autonomic failure*. Hypertension. v.51, n.6: p.1531-6. 2008.

Gao, L., Wang, W., Li, Y. L., Schultz, H. D., Liu, D., Cornish, K. G. e Zucker, I. H. *Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase*. Circ Res. v.95, n.9: p.937-44. 2004.

Garthwaite, J. *Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system*. Trends Neurosci. v.14, n.2: p.60-7. 1991.

Garthwaite, J., Charles, S. L. e Chess-Williams, R. *Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain*. Nature. v.336, n.6197: p.385-8. 1988.

Getting, S. J., Segieth, J., Ahmad, S., Biggs, C. S. e Whitton, P. S. *Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo*. Brain Res. v.717, n.1-2: p.196-9. 1996.

Gieroba, Z. J. e Blessing, W. W. *Effect of nucleus tractus solitarius lesions on cardiovascular responses elicited from the caudal ventrolateral medulla*. J Auton Nerv Syst. v.39, n.2: p.97-104. 1992.

Gironacci, M. M., Vatta, M., Rodriguez-Fermepin, M., Fernandez, B. E. e Pena, C. *Angiotensin-(1-7) reduces norepinephrine release through a nitric oxide mechanism in rat hypothalamus*. Hypertension. v.35, n.6: p.1248-52. 2000.

Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R. F. e Summerville, W. W. *Studies on Experimental Hypertension : I. the Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia*. J Exp Med. v.59, n.3: p.347-379. 1934.

Gordon, F. J. e Mccann, L. A. *Pressor responses evoked by microinjections of L-glutamate into the caudal ventrolateral medulla of the rat*. Brain Res. v.457, n.2: p.251-8. 1988.

Grassi, G., Seravalle, G., Bertinieri, G., Turri, C., Dell'oro, R., Stella, M. L. e Mancia, G. *Sympathetic and reflex alterations in systo-diastolic and systolic hypertension of the elderly*. J Hypertens. v.18, n.5: p.587-93. 2000.

Grassi, G., Seravalle, G., Dell'oro, R., Facchini, A., Ilardo, V. e Mancia, G. *Sympathetic and baroreflex function in hypertensive or heart failure patients with ventricular arrhythmias*. J Hypertens. v.22, n.9: p.1747-53. 2004.

Green, D. J., Maiorana, A., O'driscoll, G. e Taylor, R. *Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans*. J Physiol. v.561, n.Pt 1: p.1-25. 2004.

Guan, S., Fox, J., Mitchell, K. D. e Navar, L. G. *Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats*. Hypertension. v.20, n.6: p.763-7. 1992.

Guertzenstein, P. G. e Lopes, O. U. *Cardiovascular responses evoked from the nicotine-sensitive area on the ventral surface of the medulla oblongata in the cat*. J Physiol. v.347: p.345-60. 1984.

Guertzenstein, P. G. e Silver, A. *Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions*. J Physiol. v.242, n.2: p.489-503. 1974.

Guix, F. X., Uribesalgo, 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.

Guyenet, P. G. *The sympathetic control of blood pressure*. Nat Rev Neurosci. v.7, n.5: p.335-46. 2006.

Guyenet, P. G., Filtz, T. M. e Donaldson, S. R. *Role of excitatory amino acids in rat vagal and sympathetic baroreflexes*. Brain Res. v.407, n.2: p.272-84. 1987.

Guyenet, P. G., Stornetta, R. L., Weston, M. C., Mcquiston, T. e Simmons, J. R. *Detection of amino acid and peptide transmitters in physiologically identified brainstem cardiorespiratory neurons*. Auton Neurosci. v.114, n.1-2: p.1-10. 2004.

Harmer, D., Gilbert, M., Borman, R. e Clark, K. L. *Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme*. FEBS Lett. v.532, n.1-2: p.107-10. 2002.

Hartung, H. P., Jung, S., Stoll, G., Zielasek, J., Schmidt, B., Archelos, J. J. e Toyka, K. V. *Inflammatory mediators in demyelinating disorders of the CNS and PNS*. J Neuroimmunol. v.40, n.2-3: p.197-210. 1992.

Head, G. A. *Baroreflexes and cardiovascular regulation in hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol. v.26 Suppl 2: p.S7-16. 1995.

Hirooka, Y. *Adenovirus-mediated gene transfer into the brain stem to examine cardiovascular function: role of nitric oxide and Rho-kinase*. Prog Biophys Mol Biol. v.84, n.2-3: p.233-49. 2004.

Hirooka, Y., Polson, J. W. e Dampney, R. A. *Pressor and sympathoexcitatory effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla*. J Hypertens. v.14, n.11: p.1317-24. 1996.

Hirooka, Y., Sakai, K., Kishi, T., Ito, K., Shimokawa, H. e Takeshita, A. *Enhanced depressor response to endothelial nitric oxide synthase gene transfer into the nucleus tractus solitarii of spontaneously hypertensive rats*. Hypertens Res. v.26, n.4: p.325-31. 2003.

Horiuchi, M., Akishita, M. e Dzau, V. J. *Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system*. Hypertension. v.33, n.2: p.613-21. 1999.

Horn, T., Smith, P. M., McLaughlin, B. E., Bause, L., Marks, G. S., Pittman, Q. J. e Ferguson, A. V. *Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications*. Am J Physiol. v.266, n.1 Pt 2: p.R306-13. 1994.

Howe, P. R. *Blood pressure control by neurotransmitters in the medulla oblongata and spinal cord*. J Auton Nerv Syst. v.12, n.2-3: p.95-115. 1985.

Huang, W. C., Ploth, D. W. e Navar, L. G. *Angiotensin-mediated alterations in nephron function in Goldblatt hypertensive rats*. Am J Physiol. v.243, n.6: p.F553-60. 1982.

Hunter, J. J. e Chien, K. R. *Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure*. N Engl J Med. v.341, n.17: p.1276-83. 1999.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. e Chaudhuri, G. *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A. v.84, n.24: p.9265-9. 1987.

Imamura, A., Mackenzie, H. S., Lacy, E. R., Hutchison, F. N., Fitzgibbon, W. R. e Ploth, D. W. *Effects of chronic treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor or an angiotensin receptor antagonist in two-kidney, one-clip hypertensive rats*. Kidney Int. v.47, n.5: p.1394-402. 1995.

Isles, C., Main, J., O'connell, J., Brown, I., Findlay, J., Stewart, R. e Wilkinson, R. *Survival associated with renovascular disease in Glasgow and Newcastle: a collaborative study*. Scott Med J. v.35, n.3: p.70-3. 1990.

Iwase, K., Iyama, K., Akagi, K., Yano, S., Fukunaga, K., Miyamoto, E., Mori, M. e Takiguchi, M. *Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridization*. Brain Res Mol Brain Res. v.53, n.1-2: p.1-12. 1998.

Jenkins, T. A., Chai, S. Y. e Mendelsohn, F. A. *Effect of angiotensin II on striatal dopamine release in the spontaneous hypertensive rat*. Clin Exp Hypertens. v.19, n.5-6: p.645-58. 1997.

Jeske, I., Morrison, S. F., Cravo, S. L. e Reis, D. J. *Identification of baroreceptor reflex interneurons in the caudal ventrolateral medulla*. Am J Physiol. v.264, n.1 Pt 2: p.R169-78. 1993.

Johansson, M., Herlitz, H., Jensen, G., Rundqvist, B. e Friberg, P. *Increased cardiovascular mortality in hypertensive patients with renal artery stenosis. Relation to sympathetic activation, renal function and treatment regimens*. J Hypertens. v.17, n.12 Pt 1: p.1743-50. 1999.

Jung, J. Y., Lee, J. U. e Kim, W. J. *Enhanced activity of central adrenergic neurons in two-kidney, one clip hypertension in Sprague-Dawley rats*. Neurosci Lett. v.369, n.1: p.14-8. 2004.

Kagiyama, S., Tsuchihashi, T., Abe, I. e Fujishima, M. *Cardiovascular effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of rats*. Brain Res. v.757, n.1: p.155-8. 1997.

Kagiyama, S., Tsuchihashi, T., Abe, I. e Fujishima, M. *Enhanced depressor response to nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats*. Hypertension. v.31, n.4: p.1030-4. 1998.

- Kagiyama, S., Varela, A., Phillips, M. I. e Galli, S. M. *Antisense inhibition of brain renin-angiotensin system decreased blood pressure in chronic 2-kidney, 1 clip hypertensive rats*. Hypertension. v.37, n.2 Part 2: p.371-5. 2001.
- Kanai, A. J., Pearce, L. L., Clemens, P. R., Birdier, L. A., Vanbibber, M. M., Choi, S. Y., De Groat, W. C. e Peterson, J. *Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection*. Proc Natl Acad Sci U S A. v.98, n.24: p.14126-31. 2001.
- Kantzides, A. e Badoer, E. *nNOS-containing neurons in the hypothalamus and medulla project to the RVLM*. Brain Res. v.1037, n.1-2: p.25-34. 2005.
- Kaschina, E. e Unger, T. *Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function*. Blood Press. v.12, n.2: p.70-88. 2003.
- Kawashima, K., Miwa, Y. e Fujimoto, K. *Possible involvement of an impaired baroreflex mechanism but not the renin-angiotensin system and vasopressin in the enhanced pressor responsiveness to physostigmine in spontaneously hypertensive rats*. Gen Pharmacol. v.18, n.3: p.327-30. 1987.
- Kerman, I. A., Mcallen, R. M. e Yates, B. J. *Patterning of sympathetic nerve activity in response to vestibular stimulation*. Brain Res Bull. v.53, n.1: p.11-6. 2000.
- Ketch, T., Biaggioni, I., Robertson, R. e Robertson, D. *Four faces of baroreflex failure: hypertensive crisis, volatile hypertension, orthostatic tachycardia, and malignant vagotonia*. Circulation. v.105, n.21: p.2518-23. 2002.
- Kishi, T., Hirooka, Y., Ito, K., Sakai, K., Shimokawa, H. e Takeshita, A. *Cardiovascular effects of overexpression of endothelial nitric oxide synthase in the rostral ventrolateral medulla in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Hypertension. v.39, n.2: p.264-8. 2002.
- Kishi, T., Hirooka, Y., Kimura, Y., Sakai, K., Ito, K., Shimokawa, H. e Takeshita, A. *Overexpression of eNOS in RVLM improves impaired baroreflex control of heart rate in SHRSP. Rostral ventrolateral medulla. Stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Hypertension. v.41, n.2: p.255-60. 2003.
- Kishi, T., Hirooka, Y., Sakai, K., Shigematsu, H., Shimokawa, H. e Takeshita, A. *Overexpression of eNOS in the RVLM causes hypotension and bradycardia via GABA release*. Hypertension. v.38, n.4: p.896-901. 2001.
- Kishimoto, J., Tsuchiya, T., Emson, P. C. e Nakayama, Y. *Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats*. Brain Res. v.720, n.1-2: p.159-71. 1996.
- Krieger, E. M., Brum, P. C. e Negrao, C. E. *State-of-the-Art lecture: influence of exercise training on neurogenic control of blood pressure in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension. v.34, n.4 Pt 2: p.720-3. 1999.

Krukoff, T. L. *Central regulation of autonomic function: no brakes?* Clin Exp Pharmacol Physiol. v.25, n.6: p.474-8. 1998.

Krukoff, T. L. *Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions.* Brain Res Brain Res Rev. v.30, n.1: p.52-65. 1999.

Krukoff, T. L., Gehlen, F., Ganten, D. e 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. v.26, n.1: p.171-6. 1995.

Krukoff, T. L. e Khalili, P. *Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain.* J Comp Neurol. v.377, n.4: p.509-19. 1997.

Krukoff, T. L., Mactavish, D. e Jhamandas, J. H. *Activation by hypotension of neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that project to the brainstem.* J Comp Neurol. v.385, n.2: p.285-96. 1997.

Kubes, P. e Granger, D. N. *Nitric oxide modulates microvascular permeability.* Am J Physiol. v.262, n.2 Pt 2: p.H611-5. 1992.

Kumagai, H., Suzuki, H., Ryuzaki, M., Matsukawa, S. e Saruta, T. *Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity is potentiated at early phase of two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension in conscious rabbits.* Circ Res. v.67, n.6: p.1309-22. 1990.

Lage, R. C., Campagnole-Santos, M. J., Fontes, M. A. e Santos, R. A. *Cardiovascular effects produced by nitric oxide-related drugs in the caudal ventrolateral medulla.* Neuroreport. v.10, n.4: p.731-5. 1999.

Lalley, P. M. *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. v.215, n.2: p.418-25. 1980.

Lazartigues, E., Lawrence, A. J., Lamb, F. S. e Davisson, R. L. *Renovascular hypertension in mice with brain-selective overexpression of AT1a receptors is buffered by increased nitric oxide production in the periphery.* Circ Res. v.95, n.5: p.523-31. 2004.

Leenen, F. H. e De Jong, W. *A solid silver clip for induction of predictable levels of renal hypertension in the rat.* J Appl Physiol. v.31, n.1: p.142-4. 1971.

Lerman, L. O., Chade, A. R., Sica, V. e Napoli, C. *Animal models of hypertension: an overview.* J Lab Clin Med. v.146, n.3: p.160-73. 2005.

Levy, B. I. *How to explain the differences between renin angiotensin system modulators.* Am J Hypertens. v.18, n.9 Pt 2: p.134S-141S. 2005.

Lewko, B. e Stepinski, J. *Cyclic GMP signaling in podocytes.* Microsc Res Tech. v.57, n.4: p.232-5. 2002.

- Li, Y., Zhang, W. e Stern, J. E. *Nitric oxide inhibits the firing activity of hypothalamic paraventricular neurons that innervate the medulla oblongata: role of GABA*. Neuroscience. v.118, n.3: p.585-601. 2003.
- Lima, C. V., Paula, R. D., Resende, F. L., Khosla, M. C. e Santos, R. A. *Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats*. Hypertension. v.30, n.3 Pt 2: p.542-8. 1997.
- Lin, H. C., Wan, F. J., Kang, B. H., Wu, C. C. e Tseng, C. J. *Systemic administration of lipopolysaccharide induces release of nitric oxide and glutamate and c-fos expression in the nucleus tractus solitarii of rats*. Hypertension. v.33, n.5: p.1218-24. 1999.
- Lin, L. H. e Talman, W. T. *Soluble guanylate cyclase and neuronal nitric oxide synthase colocalize in rat nucleus tractus solitarii*. J Chem Neuroanat. v.29, n.2: p.127-36. 2005.
- Lucini, D., Pagani, M., Mela, G. S. e Malliani, A. *Sympathetic restraint of baroreflex control of heart period in normotensive and hypertensive subjects*. Clin Sci (Lond). v.86, n.5: p.547-56. 1994.
- Machado, R. D., Santos, R. A. e Andrade, S. P. *Opposing actions of angiotensins on angiogenesis*. Life Sci. v.66, n.1: p.67-76. 2000.
- Magaldi, J.B. *Relatório de um estudo sobre nutrição realizado sob os auspícios dos "Fundos Universitários de Pesquisa para Defesa Nacional"*. São Paulo Médico, 207, 1944.
- Maggi, C. A. e Meli, A. *Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system*. Experientia. v.42, n.3: p.292-7. 1986.
- Maiese, K. e Boccone, L. *Neuroprotection by peptide growth factors against anoxia and nitric oxide toxicity requires modulation of protein kinase C*. J Cereb Blood Flow Metab. v.15, n.3: p.440-9. 1995.
- Mandel, D. A. e Schreihöfer, A. M. *Central respiratory modulation of barosensitive neurones in rat caudal ventrolateral medulla*. J Physiol. v.572, n.Pt 3: p.881-96. 2006.
- Mandel, D. A. e Schreihöfer, A. M. *Glutamatergic inputs to the CVLM independent of the NTS promote tonic inhibition of sympathetic vasomotor tone in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. v.295, n.4: p.H1772-9. 2008.
- Marletta, M. A., Yoon, P. S., Iyengar, R., Leaf, C. D. e Wishnok, J. S. *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate*. Biochemistry. v.27, n.24: p.8706-11. 1988.
- Martinez-Maldonado, M. *Pathophysiology of renovascular hypertension*. Hypertension. v.17, n.5: p.707-19. 1991.

Martins-Pinge, M. C., Baraldi-Passy, I. e Lopes, O. U. *Excitatory effects of nitric oxide within the rostral ventrolateral medulla of freely moving rats*. Hypertension. v.30, n.3 Pt 2: p.704-7. 1997.

Martins-Pinge, M. C., Garcia, M. R., Zoccal, D. B., Crestani, C. C. e Pingue-Filho, P. *Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats*. Auton Neurosci. v.131, n.1-2: p.65-9. 2007.

Masaki, H., Kurihara, T., Yamaki, A., Inomata, N., Nozawa, Y., Mori, Y., Murasawa, S., Kizima, K., Maruyama, K., Horiuchi, M., Dzau, V. J., Takahashi, H., Iwasaka, T., Inada, M. e Matsubara, H. *Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects*. J Clin Invest. v.101, n.3: p.527-35. 1998.

Masuda, N., Terui, N., Koshiya, N. e 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. v.34, n.2-3: p.103-17. 1991.

Matsumura, K., Tsuchihashi, T., Kagiya, S., Abe, I. e Fujishima, M. *Role of nitric oxide in the nucleus of the solitary tract of rats*. Brain Res. v.798, n.1-2: p.232-8. 1998.

Matsumura, Y., Hasser, E. M. e Bishop, V. S. *Central effect of angiotensin II on baroreflex regulation in conscious rabbits*. Am J Physiol. v.256, n.3 Pt 2: p.R694-700. 1989.

Maura, G., Marcoli, M., Pepicelli, O., Rosu, C., Viola, C. e Raiteri, M. *Serotonin inhibition of the NMDA receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway in human neocortex slices: involvement of 5-HT(2C) and 5-HT(1A) receptors*. Br J Pharmacol. v.130, n.8: p.1853-8. 2000.

Mayorov, D. N. *Brain superoxide as a key regulator of the cardiovascular response to emotional stress in rabbits*. Exp Physiol. v.92, n.3: p.471-9. 2007a.

Mayorov, D. N. *Nitric oxide synthase inhibition in rostral ventrolateral medulla attenuates pressor response to psychological stress in rabbits*. Neurosci Lett. v.424, n.2: p.89-93. 2007b.

Mayorov, D. N., Head, G. A. e De Matteo, R. *Tempol attenuates excitatory actions of angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla during emotional stress*. Hypertension. v.44, n.1: p.101-6. 2004.

Mckittrick, D. J. e Calaresu, F. R. *Reciprocal connection between nucleus ambiguus and caudal ventrolateral medulla*. Brain Res. v.770, n.1-2: p.213-20. 1997.

Mcquillan, L. P., Leung, G. K., Marsden, P. A., Kostyk, S. K. e Kourembanas, S. *Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms*. Am J Physiol. v.267, n.5 Pt 2: p.H1921-7. 1994.

- Meffert, M. K., Calakos, N. C., Scheller, R. H. e Schulman, H. *Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions*. Neuron. v.16, n.6: p.1229-36. 1996.
- Meredith, I. T., Broughton, A., Jennings, G. L. e Esler, M. D. *Evidence of a selective increase in cardiac sympathetic activity in patients with sustained ventricular arrhythmias*. N Engl J Med. v.325, n.9: p.618-24. 1991.
- Michelini, L. C. e Bonagamba, L. G. *Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats*. Hypertension. v.15, n.2 Suppl: p.I45-50. 1990.
- Minson, J., Arnolda, L., Llewellyn-Smith, I., Pilowsky, P. e Chalmers, J. *Altered c-fos in rostral medulla and spinal cord of spontaneously hypertensive rats*. Hypertension. v.27, n.3 Pt 1: p.433-41. 1996.
- Minson, J. B., Llewellyn-Smith, I. J., Arnolda, L. F., Pilowsky, P. M. e Chalmers, J. P. *C-fos expression in central neurons mediating the arterial baroreceptor reflex*. Clin Exp Hypertens. v.19, n.5-6: p.631-43. 1997.
- Mizukawa, K., Vincent, S. R., Mcgeer, P. L. e Mcgeer, E. G. *Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-diaphorase-positive neurons in cat cerebral white matter*. Brain Res. v.461, n.2: p.274-81. 1988.
- Monti, J. M. e Jantos, H. *Effects of L-arginine and SIN-1 on sleep and waking in the rat during both phases of the light-dark cycle*. Life Sci. v.75, n.17: p.2027-34. 2004.
- Moreira, E. D., De Oliveira, M. e Krieger, E. M. *Impaired baroreflex control of heart rate in high-renin renal hypertension*. J Hypertens. v.6, n.8: p.619-25. 1988.
- Morishita, R., Higaki, J., Okunishi, H., Tanaka, T., Ishii, K., Nagano, M., Mikami, H., Ogihara, T., Murakami, K. e Miyazaki, M. *Changes in gene expression of the renin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats*. J Hypertens. v.9, n.2: p.187-92. 1991.
- Mungrue, I. N., Bredt, D. S., Stewart, D. J. e Husain, M. *From molecules to mammals: what's NOS got to do with it?* Acta Physiol Scand. v.179, n.2: p.123-35. 2003.
- Muratani, H., Ferrario, C. M. e Averill, D. B. *Ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats: role of angiotensin II*. Am J Physiol. v.264, n.2 Pt 2: p.R388-95. 1993.
- Murphy, A. Z., Ennis, M., Shipley, M. T. e Behbehani, M. M. *Directionally specific changes in arterial pressure induce differential patterns of fos expression in discrete areas of the rat brainstem: a double-labeling study for Fos and catecholamines*. J Comp Neurol. v.349, n.1: p.36-50. 1994.
- Murphy, S. *Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS*. Glia. v.29, n.1: p.1-13. 2000.

- Nagase, S., Takemura, K., Ueda, A., Hirayama, A., Aoyagi, K., Kondoh, M. e 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*. v.233, n.1: p.150-3. 1997.
- Natarajan, M. e Morrison, S. F. *Adrenal epinephrine secretion is not regulated by sympathoinhibitory neurons in the caudal ventrolateral medulla*. *Brain Res*. v.827, n.1-2: p.169-75. 1999.
- Navar, L. G., Von Thun, A. M., Zou, L., El-Dahr, S. S. e Mitchell, K. D. *Enhancement of intrarenal angiotensin II levels in 2 kidney 1 clip and angiotensin II induced hypertension*. *Blood Press Suppl*. v.2: p.88-92. 1995.
- Navar, L. G., Zou, L., Von Thun, A., Tarng Wang, C., Imig, J. D. e Mitchell, K. D. *Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension*. *News Physiol Sci*. v.13: p.170-176. 1998.
- Niederberger, M., Aubert, J. F., Nussberger, J., Brunner, H. R. e Waeber, B. *Sympathetic nerve activity in conscious renal hypertensive rats treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor or an angiotensin II antagonist*. *J Hypertens*. v.13, n.4: p.439-45. 1995.
- Nishimura, M., Milsted, A., Block, C. H., Brosnihan, K. B. e Ferrario, C. M. *Tissue renin-angiotensin systems in renal hypertension*. *Hypertension*. v.20, n.2: p.158-67. 1992.
- Obayashi, M., Yano, M., Kohno, M., Kobayashi, S., Tanigawa, T., Hironaka, K., Ryouke, T. e Matsuzaki, M. *Dose-dependent effect of ANG II-receptor antagonist on myocyte remodeling in rat cardiac hypertrophy*. *Am J Physiol*. v.273, n.4 Pt 2: p.H1824-31. 1997.
- Okamura, T., Miyazaki, M., Inagami, T. e Toda, N. *Vascular renin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats*. *Hypertension*. v.8, n.7: p.560-5. 1986.
- Oliveira-Sales, E. B., Nishi, E. E., Carillo, B. A., Boim, M. A., Dolnikoff, M. S., Bergamaschi, C. T. e Campos, R. R. *Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension*. *Am J Hypertens*. v.22, n.5: p.484-92. 2009.
- Pajolla, G. P., Accorsi-Mendonca, D., Rodrigues, G. J., Bendhack, L. M., Machado, B. H. e Lunardi, C. N. *Fluorescent indication that nitric oxide formation in NTS neurons is modulated by glutamate and GABA*. *Nitric Oxide*. v.20, n.3: p.207-16. 2009.
- Patel, K. P., Li, Y. F. e Hirooka, Y. *Role of nitric oxide in central sympathetic outflow*. *Exp Biol Med (Maywood)*. v.226, n.9: p.814-24. 2001.
- Paton, J. F., Deuchars, J., Ahmad, Z., Wong, L. F., Murphy, D. e Kasparov, S. *Adenoviral vector demonstrates that angiotensin II-induced depression of the cardiac baroreflex is mediated by endothelial nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii of the rat*. *J Physiol*. v.531, n.Pt 2: p.445-58. 2001.

- Paula, R. D., Lima, C. V., Khosla, M. C. e Santos, R. A. *Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats*. Hypertension. v.26, n.6 Pt 2: p.1154-9. 1995.
- Paxinos, G., Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press. 1986.
- Pender, M. P. e Rist, M. J. *Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia*. Glia. v.36, n.2: p.137-44. 2001.
- Petersson, M. J., Rundqvist, B., Johansson, M., Eisenhofer, G., Lambert, G., Herlitz, H., Jensen, G. e Friberg, P. *Increased cardiac sympathetic drive in renovascular hypertension*. J Hypertens. v.20, n.6: p.1181-7. 2002.
- Pinho, D., Sousa, T., Morato, M., Tavares, I. e Albino-Teixeira, A. *Lesion of the caudal ventrolateral medulla prevents the induction of hypertension by adenosine receptor blockade in rats*. Brain Res. v.1073-1074: p.374-82. 2006.
- Plochocka-Zulinska, D. e Krukoff, T. L. *Increased gene expression of neuronal nitric oxide synthase in brain of adult spontaneously hypertensive rats*. Brain Res Mol Brain Res. v.48, n.2: p.291-7. 1997.
- Ploth, D. W. *Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney, one-clip renal vascular hypertension*. Am J Physiol. v.245, n.2: p.F131-41. 1983.
- Porter, J. P. e Brody, M. J. *Neural projections from paraventricular nucleus that subserve vasomotor functions*. Am J Physiol. v.248, n.3 Pt 2: p.R271-81. 1985.
- Porter, J. P. e Brody, M. J. *A comparison of the hemodynamic effects produced by electrical stimulation of subnuclei of the paraventricular nucleus*. Brain Res. v.375, n.1: p.20-9. 1986.
- Portillo, F., Carrasco, M. e Vallo, J. J. *Separate populations of neurons within the paraventricular hypothalamic nucleus of the rat project to vagal and thoracic autonomic preganglionic levels and express c-Fos protein induced by lithium chloride*. J Chem Neuroanat. v.14, n.2: p.95-102. 1998.
- Prast, H. e Philippu, A. *Nitric oxide as modulator of neuronal function*. Prog Neurobiol. v.64, n.1: p.51-68. 2001.
- Prast, H., Tran, M. H., Fischer, H. e Philippu, A. *Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA*. J Neurochem. v.71, n.1: p.266-73. 1998.
- Pyner, S. e Coote, J. H. *Identification of an efferent projection from the paraventricular nucleus of the hypothalamus terminating close to spinally projecting rostral ventrolateral medullary neurons*. Neuroscience. v.88, n.3: p.949-57. 1999.

- Ramchandra, R., Barrett, C. J. e Malpas, S. C. *Nitric oxide and sympathetic nerve activity in the control of blood pressure*. Clin Exp Pharmacol Physiol. v.32, n.5-6: p.440-6. 2005.
- Ranson, R. N., Motawei, K., Pyner, S. e Coote, J. H. *The paraventricular nucleus of the hypothalamus sends efferents to the spinal cord of the rat that closely appose sympathetic preganglionic neurones projecting to the stellate ganglion*. Exp Brain Res. v.120, n.2: p.164-72. 1998.
- Rees, D. D., Palmer, R. M. e Moncada, S. *Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure*. Proc Natl Acad Sci U S A. v.86, n.9: p.3375-8. 1989.
- Rees, D. D., Palmer, R. M., Schulz, R., Hodson, H. F. e Moncada, S. *Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo*. Br J Pharmacol. v.101, n.3: p.746-52. 1990.
- Ritter, S., Bugarith, K. e Dinh, T. T. *Immunotoxic destruction of distinct catecholamine subgroups produces selective impairment of glucoregulatory responses and neuronal activation*. J Comp Neurol. v.432, n.2: p.197-216. 2001.
- Rodrigues, M. C., Campagnole-Santos, M. J., Machado, R. P., Silva, M. E., Rocha, J. L., Ferreira, P. M., Santos, R. A. e Alzamora, A. C. *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. v.28, n.7: p.1375-82. 2007.
- Sakai, K., Hirooka, Y., Matsuo, I., Eshima, K., Shigematsu, H., Shimokawa, H. e Takeshita, A. *Overexpression of eNOS in NTS causes hypotension and bradycardia in vivo*. Hypertension. v.36, n.6: p.1023-8. 2000.
- Salgado, H. C., Barale, A. R., Castania, J. A., Machado, B. H., Chapleau, M. W. e Fazan, R., Jr. *Baroreflex responses to electrical stimulation of aortic depressor nerve in conscious SHR*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. v.292, n.1: p.H593-600. 2007.
- Sanchez, F., Moreno, M. N., Vacas, P., Carretero, J. e Vazquez, R. *Swim stress enhances the NADPH-diaphorase histochemical staining in the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. Brain Res. v.828, n.1-2: p.159-62. 1999.
- Santos, R. A., Brosnihan, K. B., Jacobsen, D. W., Dicorleto, P. E. e Ferrario, C. M. *Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium*. Hypertension. v.19, n.2 Suppl: p.II56-61. 1992.
- Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J. e Andrade, S. P. *Angiotensin-(1-7): an update*. Regul Pept. v.91, n.1-3: p.45-62. 2000.
- Santos, R. A., Ferreira, A. J., Pinheiro, S. V., Sampaio, W. O., Touyz, R. e Campagnole-Santos, M. J. *Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs*. Expert Opin Investig Drugs. v.14, n.8: p.1019-31. 2005.
- Santos, R. A., Ferreira, A. J. e Simoes, E. S. A. C. *Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis*. Exp Physiol. v.93, n.5: p.519-27. 2008.

- Saper, C. B., Reis, D. J. e Joh, T. *Medullary catecholamine inputs to the anteroventral third ventricular cardiovascular regulatory region in the rat*. Neurosci Lett. v.42, n.3: p.285-91. 1983.
- Sapru, H. N. e Wang, S. C. *Modification of aortic baroreceptor resetting in the spontaneously hypertensive rat*. Am J Physiol. v.230, n.3: p.664-74. 1976.
- Sasamura, H., Hein, L., Krieger, J. E., Pratt, R. E., Kobilka, B. K. e Dzau, V. J. *Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome*. Biochem Biophys Res Commun. v.185, n.1: p.253-9. 1992.
- Scher, A. M. *Carotid and aortic regulation of arterial blood pressure. George A. Brown Memorial Lecture*. Circulation. v.56, n.4 Pt 1: p.521-8. 1977.
- Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Nakane, M., Gorsky, L. D., Forstermann, U. e Murad, F. *Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A. v.88, n.2: p.365-9. 1991.
- Schreihofer, A. M. e Guyenet, P. G. *The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla*. Clin Exp Pharmacol Physiol. v.29, n.5-6: p.514-21. 2002.
- Schreihofer, A. M., Ito, S. e Sved, A. F. *Brain stem control of arterial pressure in chronic arterial baroreceptor-denervated rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. v.289, n.6: p.R1746-55. 2005.
- Schulz, R., Rassaf, T., Massion, P. B., Kelm, M. e Balligand, J. L. *Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis*. Pharmacol Ther. v.108, n.3: p.225-56. 2005.
- Schuman, E. M. e Madison, D. V. *A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation*. Science. v.254, n.5037: p.1503-6. 1991.
- Shafton, A. D., Ryan, A. e Badoer, E. *Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat*. Brain Res. v.801, n.1-2: p.239-43. 1998.
- Shaltout, H. A., Westwood, B. M., Averill, D. B., Ferrario, C. M., Figueroa, J. P., Diz, D. I., Rose, J. C. e Chappell, M. C. *Angiotensin metabolism in renal proximal tubules, urine, and serum of sheep: evidence for ACE2-dependent processing of angiotensin II*. Am J Physiol Renal Physiol. v.292, n.1: p.F82-91. 2007.
- Shapoval, L. N., Sagach, V. F. e Pobegailo, L. S. *Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat*. Neurosci Lett. v.132, n.1: p.47-50. 1991.
- Sigmon, D. H. e Beierwaltes, W. H. *Influence of nitric oxide in the chronic phase of two-kidney, one clip renovascular hypertension*. Hypertension. v.31, n.2: p.649-56. 1998.

- Simon, O. R., Basuray, B. N., West, W. L. e Copeland, R. *Interaction between the baroreflex and anterior hypothalamic stimulation. Demonstration of a noradrenergic involvement.* Neuropharmacology. v.24, n.7: p.665-75. 1985.
- Simonian, S. X. e Herbison, A. E. *Localization of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity within sub-populations of noradrenergic A1 and A2 neurons in the rat.* Brain Res. v.732, n.1-2: p.247-52. 1996.
- Smith, J. K. e Barron, K. W. *Cardiovascular effects of L-glutamate and tetrodotoxin microinjected into the rostral and caudal ventrolateral medulla in normotensive and spontaneously hypertensive rats.* Brain Res. v.506, n.1: p.1-8. 1990a.
- Smith, J. K. e Barron, K. W. *The rostral and caudal ventrolateral medulla in young spontaneously hypertensive rats.* Brain Res. v.506, n.1: p.153-8. 1990b.
- Steckelings, U. M., Kaschina, E. e Unger, T. *The AT2 receptor--a matter of love and hate.* Peptides. v.26, n.8: p.1401-9. 2005.
- Stern, J. E. *Nitric oxide and homeostatic control: an intercellular signalling molecule contributing to autonomic and neuroendocrine integration?* Prog Biophys Mol Biol. v.84, n.2-3: p.197-215. 2004.
- Stern, J. E., Li, Y. e Zhang, W. *Nitric oxide: a local signalling molecule controlling the activity of pre-autonomic neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.* Acta Physiol Scand. v.177, n.1: p.37-42. 2003.
- Stornetta, R. L. e Guyenet, P. G. *Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla projecting to thoracic spinal cord in relation to monoaminergic brainstem neurons.* J Comp Neurol. v.407, n.3: p.367-80. 1999.
- Strawn, W. B., Ferrario, C. M. e Tallant, E. A. *Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury.* Hypertension. v.33, n.1 Pt 2: p.207-11. 1999.
- Strobel, G. E. e Wollman, H. *Pharmacology of anesthetic agents.* Fed Proc. v.28, n.4: p.1386-403. 1969.
- Stuehr, D. J., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. F. e Nathan, C. F. *Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein.* Proc Natl Acad Sci U S A. v.88, n.17: p.7773-7. 1991.
- Suhr, F., Porten, S., Hertrich, T., Brixius, K., Schmidt, A., Platen, P. e Bloch, W. *Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes.* Nitric Oxide. v.20, n.2: p.95-103. 2009.
- Suzuki, J., Matsubara, H., Urakami, M. e Inada, M. *Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy.* Circ Res. v.73, n.3: p.439-47. 1993.

- Suzuki, S., Pilowsky, P., Minson, J., Arnold, L., Llewellyn-Smith, I. J. e Chalmers, J. *c-fos antisense in rostral ventral medulla reduces arterial blood pressure*. Am J Physiol. v.266, n.4 Pt 2: p.R1418-22. 1994.
- Sved, A. F., Blessing, W. W. e Reis, D. J. *Caudal ventrolateral medulla can alter vasopressin and arterial pressure*. Brain Res Bull. v.14, n.3: p.227-32. 1985.
- Sved, A. F., Ito, S. e Madden, C. J. *Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation*. Brain Res Bull. v.51, n.2: p.129-33. 2000.
- Swanson, L. W. e Sawchenko, P. E. *Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei*. Annu Rev Neurosci. v.6: p.269-324. 1983.
- Takeda, K. e Bunag, R. D. *Augmented sympathetic nerve activity and pressor responsiveness in DOCA hypertensive rats*. Hypertension. v.2, n.1: p.97-101. 1980.
- Tallant, E. A., Diz, D. I. e Ferrario, C. M. *State-of-the-Art lecture. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle*. Hypertension. v.34, n.4 Pt 2: p.950-7. 1999.
- Talman, W. T., Dragon, D. N., Ohta, H. e Lin, L. H. *Nitroxidergic influences on cardiovascular control by NTS: a link with glutamate*. Ann N Y Acad Sci. v.940: p.169-78. 2001.
- Tanaka, J., Hayashi, Y., Watai, T., Fukami, Y., Johkoh, R. e Shimamune, S. *AI noradrenergic modulation of AV3V inputs to PVN neurosecretory cells*. Neuroreport. v.8, n.14: p.3147-50. 1997.
- Tandai-Hiruma, M., Horiuchi, J., Sakamoto, H., Kemuriyama, T., Hirakawa, H. e Nishida, Y. *Brain neuronal nitric oxide synthase neuron-mediated sympathoinhibition is enhanced in hypertensive Dahl rats*. J Hypertens. v.23, n.4: p.825-34. 2005.
- Tatoyan, A. e Giulivi, C. *Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria*. J Biol Chem. v.273, n.18: p.11044-8. 1998.
- Teng, B., Murthy, K. S., Kuemmerle, J. F., Grider, J. R., Sase, K., Michel, T. e Makhoul, G. M. *Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells*. Am J Physiol. v.275, n.2 Pt 1: p.G342-51. 1998.
- Touyz, R. M. *Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?* Hypertension. v.44, n.3: p.248-52. 2004.
- Trabace, L., Cassano, T., Tucci, P., Steardo, L., Kendrick, K. M. e Cuomo, V. *The effects of nitric oxide on striatal serotonergic transmission involve multiple targets: an in vivo microdialysis study in the awake rat*. Brain Res. v.1008, n.2: p.293-8. 2004.
- Trabace, L. e Kendrick, K. M. *Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation*. J Neurochem. v.75, n.4: p.1664-74. 2000.

Tseng, C. J., Liu, H. Y., Lin, H. C., Ger, L. P., Tung, C. S. e Yen, M. H. *Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats*. Hypertension. v.27, n.1: p.36-42. 1996.

Tucker, D. C., Saper, C. B., Ruggiero, D. A. e Reis, D. J. *Organization of central adrenergic pathways: I. Relationships of ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord*. J Comp Neurol. v.259, n.4: p.591-603. 1987.

Unger, T. *Blood pressure lowering and renin-angiotensin system blockade*. J Hypertens Suppl. v.21, n.6: p.S3-7. 2003.

Vacher, C. M., Hardin-Pouzet, H., Steinbusch, H. W., Calas, A. e De Vente, J. *The effects of nitric oxide on magnocellular neurons could involve multiple indirect cyclic GMP-dependent pathways*. Eur J Neurosci. v.17, n.3: p.455-66. 2003.

Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A. e Tummino, P. *Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase*. J Biol Chem. v.277, n.17: p.14838-43. 2002.

Vincent, S. R. e Kimura, H. *Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain*. Neuroscience. v.46, n.4: p.755-84. 1992.

Waki, H., Kasparov, S., Wong, L. F., Murphy, D., Shimizu, T. e Paton, J. F. *Chronic inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity in nucleus tractus solitarii enhances baroreceptor reflex in conscious rats*. J Physiol. v.546, n.Pt 1: p.233-42. 2003.

Wallerath, T., Witte, K., Schafer, S. C., Schwarz, P. M., Prellwitz, W., Wohlfart, P., Kleinert, H., Lehr, H. A., Lemmer, B. e Forstermann, U. *Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension*. Proc Natl Acad Sci U S A. v.96, n.23: p.13357-62. 1999.

Wang, S., Paton, J. F. e Kasparov, S. *Differential sensitivity of excitatory and inhibitory synaptic transmission to modulation by nitric oxide in rat nucleus tractus solitarii*. Exp Physiol. v.92, n.2: p.371-82. 2007.

Wang, S., Teschemacher, A. G., Paton, J. F. e Kasparov, S. *Mechanism of nitric oxide action on inhibitory GABAergic signaling within the nucleus tractus solitarii*. Faseb J. v.20, n.9: p.1537-9. 2006.

Wang, Y., Patel, K. P., Cornish, K. G., Channon, K. M. e Zucker, I. H. *nNOS gene transfer to RVLM improves baroreflex function in rats with chronic heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. v.285, n.4: p.H1660-7. 2003.

Whitescarver, S. A., Ott, C. E. e Kotchen, T. A. *Parasympathetic impairment of baroreflex control of heart rate in Dahl S rats*. Am J Physiol. v.259, n.1 Pt 2: p.R76-83. 1990.

World Health Organization (WHO). *International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension*. *Jornal of Hypertension*. 21:1983-1992. 2003.

Wiencken, A. E. e Casagrande, V. A. *Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex*. *Glia*. v.26, n.4: p.280-90. 1999.

Wiesinger, H. *Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system*. *Prog Neurobiol*. v.64, n.4: p.365-91. 2001.

Willette, R. N., Punnen-Grandy, S., Krieger, A. J. e Sapru, H. N. *Differential regulation of regional vascular resistance by the rostral and caudal ventrolateral medulla in the rat*. *J Auton Nerv Syst*. v.18, n.2: p.143-51. 1987.

Williams, J. R., Harrison, T. R. e Grollman, A. *A Simple Method for Determining the Systolic Blood Pressure of the Unanesthetized Rat*. *J Clin Invest*. v.18, n.3: p.373-6. 1939.

Willmott, N. J., Wong, K. e Strong, A. J. *A fundamental role for the nitric oxide-G-kinase signaling pathway in mediating intercellular Ca(2+) waves in glia*. *J Neurosci*. v.20, n.5: p.1767-79. 2000.

Wright, J. W. e Harding, J. W. *Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses*. *Neurosci Biobehav Rev*. v.18, n.1: p.21-53. 1994.

Wu, G. e Morris, S. M., Jr. *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond*. *Biochem J*. v.336 (Pt 1): p.1-17. 1998.

Xia, H. e Lazartigues, E. *Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions*. *J Neurochem*. v.107, n.6: p.1482-94. 2008.

Yamamoto, T., Shimoyama, N. e Mizuguchi, T. *Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw*. *Anesth Analg*. v.77, n.5: p.886-90. 1993.

Yang, L. M., He, R. R. e Ho, S. Y. *[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*. v.48, n.4: p.368-76. 1996.

Yates, B. J., Goto, T. e Bolton, P. S. *Responses of neurons in the rostral ventrolateral medulla of the cat to natural vestibular stimulation*. *Brain Res*. v.601, n.1-2: p.255-64. 1993.

Yoshida, K., Takata, M., Ueno, H., Tomoda, F., Yasumoto, K., Iida, H. e Sasayama, S. *Sympathetic and renin-angiotensin system in conscious rabbits with two-kidney, one clip hypertension*. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. v.33, n.9: p.879-84. 1991.

Yu, D. e Gordon, F. J. *Anatomical evidence for a bi-neuronal pathway connecting the nucleus tractus solitarius to caudal ventrolateral medulla to rostral ventrolateral medulla in the rat.* Neurosci Lett. v.205, n.1: p.21-4. 1996.

Zanzinger, J. *Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress.* Auton Neurosci. v.98, n.1-2: p.24-7. 2002.

Zanzinger, J., Czachurski, J. e Seller, H. *Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in the RVLM by nitric oxide.* Am J Physiol. v.268, n.4 Pt 2: p.R958-62. 1995.

Zhang, K., Li, Y. F. e Patel, K. P. *Reduced endogenous GABA-mediated inhibition in the PVN on renal nerve discharge in rats with heart failure.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. v.282, n.4: p.R1006-15. 2002.

Zhang, K. e Patel, K. P. *Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA.* Am J Physiol. v.275, n.3 Pt 2: p.R728-34. 1998.

Zhang, T. X. e Ciriello, J. *Effect of paraventricular nucleus lesions on arterial pressure and heart rate after aortic baroreceptor denervation in the rat.* Brain Res. v.341, n.1: p.101-9. 1985.

Zhang, Y., Lu, J., Shi, J., Lin, X., Dong, J., Zhang, S., Liu, Y. e 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. v.42, n.5-6: p.593-600. 2008.

10. ANEXOS

Anexo I

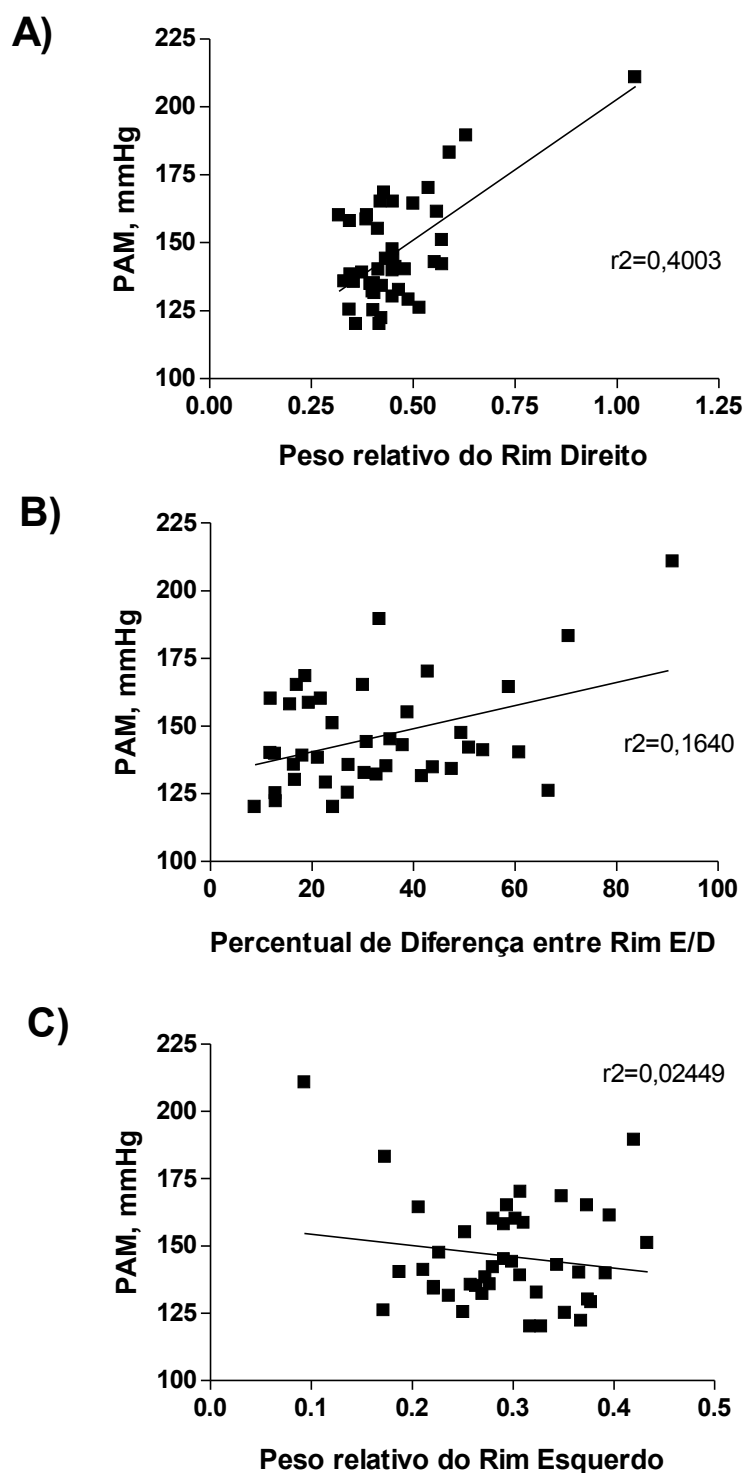


Figura 27: Correlação da PAM basal (mmHg) medida de forma direta (pelo transdutor) com o peso úmido relativo do rim direito (painel A, n=42), percentual de diferença de peso úmido relativo entre rim esquerdo/direito (painel B, n=41) e com o peso úmido

relativo do rim esquerdo (painel C, n=42) de ratos com hipertensão renovascular 2R1C. *p<0,01 em comparação PAM (regressão linear).

Anexo II

PRODUÇÃO CIENTÍFICA ASSOCIADA A ESTA DISSERTAÇÃO

Artigos publicados

CANGUSSU, LM ; De Castro, UG. ; MACHADO, RP ; FERREIRA, PM ; SILVA, ME ; CAMPAGNOLE-SANTOS, MJ ; [SANTOS, RAS](#) ; ALZAMORA, AC . **Angiotensin-(1-7) antagonist, A-779, microinjection into the caudal ventrolateral medulla of renovascular hypertensive rats restores baroreflex bradycardia.** Peptides (New York, N.Y. 1980), v. 30, p. 1921-1927, 2009.

Trabalhos apresentados em eventos internacionais

De Castro, UG; DE SOUSA, GG; SOARES, ER; MACHADO, RP; ISOUDI, MC; SILVA, ME; FERREIRA, PM; CAMPAGNOLE-SANTOS, MJ; [SANTOS, RAS](#); ALZAMORA, AC. **Participação do óxido nítrico no efeito hipotensor induzido pelas microinjeções de ang II e ang-(1-7) na cvlm em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.** In: Inter-American Society Of Hypertension XVIIIth Scientific Sessions / XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2009, Belo Horizonte MG. Anais do Inter-American Society Of Hypertension XVIIIth Scientific Sessions / XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2009.

Trabalhos apresentados em eventos nacionais

De Castro, UG; DE SOUSA, GG; SOARES, ER; MACHADO, RP; ISOUDI, MC; SILVA, ME; FERREIRA, PM; CAMPAGNOLE-SANTOS, MJ; [SANTOS, RAS](#); ALZAMORA, AC. **O óxido nítrico participa do efeito hipotensor induzido pela angiotensina II na cvlm em ratos com hipertensão renal?** IV ENCONTRO REGIONAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL- FESBE. 2009.

De Castro, UG; MACHADO, RP; ISOUDI, MC; SILVA, ME; SOARES, AC; CAMPAGNOLE-SANTOS, MJ; ALZAMORA, AC. **Efeito do óxido nítrico sobre o efeito hipotensor induzido pela ang-(1-7) na cvlm em ratos com hipertensão renal.** In: XIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2009, OURO PRETO MG. Anais do XIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2009

DE SOUSA, GG; De Castro, UG; MACHADO, RP; ISOUDI, MC; SILVA, ME; CAMPAGNOLE-SANTOS, MJ; [SANTOS, RAS](#); ALZAMORA, AC. **Microinjeção de L-NAME na cvlm altera a responsividade da ang-(1-7) em ratos normotensos e com hipertensão renovascular 2R1C.** In: XVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP, 2009, Ouro Preto-MG. Anais do XVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP, 2009.

DOS SANTOS, AS; DE SOUSA, GG; De Castro, UG; MACHADO, RP; ISOUDI, MC; SILVA, ME; [SANTOS, RAS](#); CAMPAGNOLE-SANTOS, MJ; ALZAMORA, AC. **Efeito do L-NAME sobre a sensibilidade da bradicardia reflexa em ratos com hipertensão renovascular 2R1C**. In: XVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP, 2009, Ouro Preto-MG. Anais do XVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP, 2009.

De Castro, UG; MACHADO, RP; ISOUDI, MC; SILVA, ME; [SANTOS, RAS](#); CAMPAGNOLE-SANTOS, MJ; ALZAMORA, AC. **Envolvimento do óxido nítrico no efeito hipotensor induzido pela ang-(1-7) na cvlm em ratos com hipertensão renal**. In: XVI Encontro de Pesquisa em Fisiologia e Farmacologia, 2008, Belo Horizonte-MG. Anais do XVI Encontro de Pesquisa em Fisiologia e Farmacologia, 2008.