

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

**EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS POR ANTAGONISTAS
ANGIOTENSINÉRGICOS NO BULBO VENTROLATERAL DE RATOS COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

Luiza Michelle Cangussu

Ouro Preto – MG

2008

Luiza Michelle Cangussu

**EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS POR ANTAGONISTAS
ANGIOTENSINÉRGICOS NO BULBO VENTROLATERAL DE RATOS COM
HIPERTENSÃO RENOVASULAR**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andréia Carvalho Alzamora

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raquel do Pilar Machado

*Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação 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.*

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Hipertensão** do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com o auxílio da CAPES, PROPP-UFOP, FAPEMIG-REDE TOXIFAR e PRONEX-CNPq.

*“Vá até onde puder ver; quando lá chegar poderá ver ainda
mais longe.”*

GOETHE

*Dedico este trabalho à minha mãe, por seu amor
incondicional.*

Agradecimentos

A **Deus**, razão do meu viver, só a Ele louvor , glória e honra.

A **Mamãe, Jenner e família**, pelo apoio, incentivo e carinho.

A minha orientadora **Prof^ª. Dr^ª. Andréia Carvalho Alzamora**, pelos ensinamentos, paciência, amizade e por todos esses anos de convívio... obrigada por viver comigo parte de minhas alegrias e tristezas durante esse tempo.

A minha co-orientadora **Prof^ª. Dr^ª. Raquel do Pilar Machado**, pelos ensinamentos, amizade, ajuda e carinho... obrigada, você é um exemplo para mim.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva, Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Ferreira** e a **Prof^ª. Dr^ª. Lissandra** , pela amizade, ajuda e carinho.

A **Prof^ª. Dr^ª. Maria José Campagnole dos Santos** e ao **Prof. Dr. Robson Santos** pela contribuição inestimável na realização desse estudo.

A **Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Martins Carneiro** por sua ajuda na realização da análise histológica.

Aos meus irmãos da **IDAB, ABU e Presbiteriana**, por caminharem comigo na fé.

Aos companheiros do **Laboratório de Hipertensão – Amanda, Analina, Carolina, Edvaldo, Elton, Enyara, Everton, Gilberto, Giselle, Janete, José Luiz, Juliana, Luciana, Karina, Miriam, Pámela, Rosana, Sara, Sheyla, Uberdan, Vinícius (in memorian)** - pela amizade, incentivo, ensinamentos e diversão.

A **Regina, Danilo e toda turma do prédio**, pela acolhida.

As amigas de **República – Patrícia, Marília, Lorena, Poliana, Rafaela, Lorene e Júnea** , por dividirem comigo as alegrias e tristezas de cada dia.

Aos queridos amigos **Alexandre, Juliano, Mário, Glauco, Priscila, Milena e Luciano**, por tornarem mais felizes esse tempo em Ouro Preto.

As grandes e eternas amigas **Mirelli, Sara e Anne**, pelo carinho.

A **Cida**, pela dedicação e simpatia.

Ao **Hernani e Paulo**, pela contribuição nas tarefas do laboratório.

Ao **Jair e Maria**, pela ajuda nos trabalhos.

Aos **professores e colegas do NUPEB** pelo convívio, ensinamentos e auxílio.

Ao **animais** que com inocência sacrificam suas vidas pela ciência.

Resumo

Os peptídeos do sistema renina-angiotensina (SRA) agem como importantes neuromoduladores sobre a regulação da pressão arterial no bulbo ventrolateral (VLM). A hipertensão renovascular (2R1C) é caracterizada por apresentar altos níveis da Angiotensina (Ang) II um importante componente do SRA. Assim, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar os efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de Ang II e Ang-(1-7) e seus respectivos antagonistas na VLM caudal (CVLM) e rostral (RVLM) de ratos com hipertensão renovascular (2R1C) e normotensos (SHAM).

Ratos machos Fisher (150 a 200g) foram anestesiados com uma mistura de quetamina (50 mg/ kg, ip) e xilazina (5 mg/ kg, ip) para cirurgia 2R1C ou fictícia (SHAM). Após 30 dias, os animais 2R1C e SHAM foram anestesiados com uretana (1,2 g/ kg, ip), posicionados em aparelho estereotático para exposição de bulbo e instrumentados para registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A sensibilidade da bradicardia reflexa foi avaliada através de doses crescentes de fenilefrina (i.v). Ao final dos experimentos os animais foram sacrificados, os rins foram pesados (peso corrigido pela massa corpórea do animal) e o cérebro submetido à análise histológica.

Os ratos 2R1C apresentaram maior porcentagem de redução do rim esquerdo (clipado) em relação ao rim direito ($33 \pm 2 \%$, n=36) e aumento da PAM (143 ± 3 mmHg, n=38) em relação aos ratos SHAM ($0,3 \pm 0,6 \%$, n=33 e 103 ± 2 mmHg, n=33, respectivamente).

A microinjeção de Ang II e Ang-(1-7) na CVLM produziu respostas depressoras similares nos animais 2R1C (-10 ± 1 mmHg, n=5 e -14 ± 2 mmHg, n=8, respectivamente) e em animais SHAM (-11 ± 1 mmHg, n= 6 e -14 ± 2 mmHg, n= 8, respectivamente). Entretanto, a microinjeção na RVLM produziu respostas de maior magnitude nos animais hipertensos 2R1C tanto para Ang II (21 ± 2 mmHg, n=10 em comparação à 11 ± 1 mmHg, n=7; grupo SHAM) como para Ang-(1-7) (21 ± 2 mmHg, n=7 em comparação à 12 ± 1 mmHg, n=4; grupo SHAM).

A microinjeção do antagonista de receptor AT1, losartan, na CVLM não produziu alterações na PAM tanto nos animais 2R1C como nos animais SHAM. Na RVLM, no

entanto, o losartan produziu efeito pressor tanto nos animais 2R1C (14 ± 3 mmHg, n=14) como nos animais SHAM (14 ± 5 mmHg, n=7). O antagonista de receptor MAS, o A-779, na CVLM produziu efeito hipotensor em animais hipertensos 2R1C (-12 ± 3 mmHg, n=6), enquanto em animais SHAM (-5 ± 2 mmHg, n=8) o efeito hipotensor do A-779 na CVLM foi semelhante ao efeito da salina. Diferentemente, na RVLM, o efeito pressor observado após o A-779 foi semelhante ao da salina tanto nos animais 2R1C como nos ratos SHAM. Estes antagonistas (losartan e A-779) aboliram o efeito depressor (CVLM) e pressor (RVLM) de seus respectivos agonistas, Ang II e Ang-(1-7), por até 30 minutos. Não foram observadas alterações significativas na FC após a microinjeção tanto dos peptídeos como de seus antagonistas na CVLM ou na RVLM.

A bradicardia reflexa nos animais com hipertensão 2R1C foi menor ($p < 0,05$) ($0,19 \pm 0,05$ ms/ mmHg, n=15) em relação aos animais normotensos SHAM ($0,42 \pm 0,01$ ms/ mmHg, n=15). A microinjeção do A-779 na CVLM melhorou a bradicardia reflexa em ratos 2R1C ($0,44 \pm 0,04$ ms/mmHg, n=7). Entretanto o A-779 na CVLM não alterou a bradicardia reflexa em animais SHAM ($0,35 \pm 0,04$ ms/ mmHg n=7). Já o bloqueio de receptores AT1 de Ang II na CVLM não alterou a modulação do controle baroreflexo tanto em animais hipertensos 2R1C como em ratos SHAM.

Assim, os resultados apresentados nesse estudo sugerem alterações na expressão de receptores para Ang-(1-7) na CVLM no estabelecimento da hipertensão, podendo contribuir para a baixa sensibilidade do controle do barorreflexo em ratos com hipertensão renovascular. Além disso, os resultados mostraram ainda, que não ocorrem alterações na responsividade para as angiotensinas na CVLM em ratos 2R1C, diferentemente no entanto na RVLM, ocorre uma maior responsividade para ANG II e Ang-(1-7) em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

Abstract

The peptides of the rennin-angiotensin (RAS) act as important neuromodulators on the regulation of blood pressure in ventrolateral medulla (VLM). High levels of angiotensin II, an important component of rennin-angiotensin system, is present in renovascular hypertension. Thus, in the present study, we evaluated the cardiovascular effects produced by angiotensin II and angiotensin-(1-7) and their antagonist microinjections at the caudal (CVLM) and rostral (RVLM) ventrolateral medulla in renovascular hypertensive rats (2R1C) and normotensive (SHAM).

Male Fisher rats (weighting 150 to 200) were anesthetized by a mixture of ketamine (50 mg/kg, ip) and xylazine (5 mg/kg, ip) for the 2R1C or SHAM surgery. 30 days after the surgeries, the 2R1C and SHAM animals were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.), placed onto stereotaxic apparatus, the dorsal surface of the brainstem was instrumented for mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) measurements. The baroreflex bradycardia sensitivity was evaluated by bolus injections of phenylephrine before and 5-10 minutes after CVLM microinjection of losartan or A779. At the end of the experiments the animals were sacrificed and the brain and kidneys were collected. The kidneys were weighed (dry organ weight/body weight) and the brain was sent for histological analysis.

The percentage of mass reduction in the clipped kidney increased ($33 \pm 2 \%$, $n=36$) compared to SHAM groups ($0,3 \pm 0,6 \%$, $n=33$) and the basal MAP level of 2R1C group was significantly higher than SHAM (143 ± 3 mmHg, $n=38$) compared to SHAM group (103 ± 2 mmHg, $n=33$).

The Ang-(1-7) and Ang II microinjections into the CVLM produced similar depressor effect in 2R1C (-14 ± 2 mmHg, $n=7$ and $-10 \pm 0,9$ mmHg, $n=8$, respectively) and SHAM (-14 ± 2 mmHg, $n=8$ and -11 ± 1 mmHg, $n=6$, respectively). However, Ang-(1-7) and Ang II RVLM microinjection in 2R1C induce higher pressor effect (21 ± 2 mmHg, $n=7$ and 21 ± 2 mmHg, $n=10$, respectively) compared to the effect in SHAM (12 ± 1 mmHg, $n=4$ and 11 ± 1 mmHg, $n=7$, respectively).

The microinjection of A-779 at the CVLM produced a depressor effect in 2K1C (-12 ± 3 mmHg, n=6) but not in SHAM rats (-5 ± 2 mmHg, n=8). In contrast, microinjection of the AT1 receptor antagonist, losartan, into the CVLM did not change MAP in 2K1C or in SHAM rats. However in RVLM, A-779 MAP effect was not different from saline in 2K1c or SHAM rats. But, losartan produced a pressor effect in 2K1C (14 ± 3 mmHg, n=14) and in SHAM rats (14 ± 5 mmHg, n=14). The microinjection of losartan or A-779 abolished the depressor (CVLM) or pressor (RVLM) effects induced by microinjections of Ang II or Ang-(1-7), respectively.

The reflex bradycardia was significantly reduced in 2K1C rats ($0,19 \pm 0,05$ ms/mmHg, n=15) in comparison to the SHAM animals ($0,42 \pm 0,01$ ms/mmHg, n=15). The CVLM microinjection of A779 improved the sensitivity of reflex bradycardia in 2K1C ($0,44 \pm 0,04$ ms/mmHg). On the other hand, losartan into the CVLM didn't have effect on reflex bradycardia either in 2K1C or in SHAM rats.

These results of the present study suggest changes in the receptor expression of Ang-(1-7) at the CVLM in the establishment of the hypertension, wich may contribute to the low sensitivity of the baroreflex control of heart rate in renovascular hypertensive rats. In addition, these results showed no changes in the responsiveness to angiotensin into CVLM in 2K1C. Howerver into RVLM Ang II and Ang-(1-7) microinjections showed the greater responsiveness in 2K1C rats.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Visão corrente do SRA..... | 23 |
| Figura 2: Representação esquemática do protocolo I..... | 40 |
| Figura 3: Representação esquemática do protocolo II..... | 41 |
| Figura 4: Peso dos rins direito e esquerdo de ratos 2R1C e SHAM (Grupo CVLM)..... | 43 |
| Figura 5: Porcentagem de redução do peso seco do rim esquerdo de ratos SHAM e 2R1C (Grupo CVLM)..... | 44 |
| Figura 6: Registros típicos da PAP, FC e PAM de ratos 2R1C e SHAM (Grupo CVLM)..... | 45 |
| Figura 7: PAM e FC basais em ratos 2R1C e SHAM (Grupo CVLM)..... | 46 |
| Figura 8: Efeito da Ang II, losartan e salina na CVLM sobre a PAM e FC em ratos 2R1C e SHAM..... | 49 |
| Figura 9: Efeito da microinjeção sucessiva de Ang II na CVLM sobre a PAM e FC em ratos 2R1C e SHAM..... | 51 |
| Figura 10: Efeito do bloqueio dos receptores AT1 na CVLM sobre a PAM e FC em ratos 2R1C e SHAM..... | 54 |
| Figura 11: Avaliação da bradicardia reflexa antes e após a microinjeção do losartan na CVLM em ratos 2R1C e SHAM..... | 56 |
| Figura 12: Efeito da Ang-(1-7), A-779 e Salina na CVLM sobre a PAM e FC em ratos 2R1C e SHAM..... | 59 |
| Figura 13: Efeito do bloqueio dos receptores para Ang-(1-7) na CVLM sobre a PAM e FC em ratos com 2R1C e SHAM..... | 62 |
| Figura 14: Avaliação da bradicardia reflexa antes e após a microinjeção do A-779 na CVLM em ratos 2R1C e SHAM..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 15: Esquemas e fotografia ilustrando as localizações das microinjeções na CVLM..... | 65 |
| Figura 16: Peso dos rins direito e esquerdo de ratos 2R1C e SHAM (Grupo RVLM)..... | 66 |
| Figura 17: Porcentagem de redução do peso seco do rim esquerdo de ratos SHAM e 2R1C (Grupo RVLM)..... | 67 |
| Figura 18: Registros típicos da PAP, FC e PAM de ratos 2R1C e SHAM (Grupo RVLM)..... | 68 |
| Figura 19: PAM e FC basais de ratos 2R1C e SHAM (Grupo RVLM)..... | 69 |
| Figura 20: Efeito da Ang II, losartan e salina na RVLM sobre a PAM e FC em ratos 2R1C e SHAM..... | 71 |
| Figura 21: Efeito do bloqueio dos receptores AT1 na RVLM sobre a PAM e FC em ratos 2R1C e SHAM..... | 74 |
| Figura 22: Efeito da Ang-(1-7), A-779 e Salina na RVLM sobre a PAM e FC em ratos 2R1C e SHAM..... | 76 |
| Figura 23: Efeito do bloqueio de receptores de Ang-(1-7) na RVLM sobre a PAM e FC em ratos 2R1C e SHAM..... | 79 |
| Figura 24: Esquemas e fotografia ilustrando a localização das microinjeções na RVLM..... | 80 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Porcentagem de redução do peso seco do rim esquerdo de ratos SHAM e 2R1C (Grupo CVLM)..... | 44 |
| Tabela 2: Valores basais de PAM, FC e alterações de FC produzidas pela Ang II, losartan e salina na CVLM em ratos 2R1C e SHAM..... | 48 |
| Tabela 3: Valores basais de PAM, FC e alterações de PAM e FC produzidas pelo losartan na CVLM sobre microinjeções sucessivas de Angiotensina II na CVLM em ratos 2R1C e SHAM..... | 53 |
| Tabela 4: Avaliação da bradicardia reflexa antes e após a microinjeção do losartan em ratos 2R1C e SHAM..... | 55 |
| Tabela 5: Valores basais de PAM, FC e alterações de FC produzidas pela Ang-(1-7), A-779 e salina na CVLM em ratos 2R1C e SHAM..... | 58 |
| Tabela 6: Valores basais de PAM, FC e alterações de PAM e FC produzidas pelo A-779 na CVLM sobre microinjeções sucessivas de Ang-(1-7) na CVLM em animais 2R1C e SHAM..... | 61 |
| Tabela 7: Avaliação da bradicardia reflexa antes e após a microinjeção do A-779 na CVLM em ratos 2R1C e SHAM..... | 63 |
| Tabela 8: Porcentagem de redução do peso seco do rim esquerdo de ratos SHAM e 2R1C (Grupo RVLM)..... | 67 |
| Tabela 9: Valores basais de PAM, FC e alterações de FC produzidas pela microinjeção de Ang II, losartan e salina na RVLM em ratos 2R1C e SHAM..... | 70 |
| Tabela 10: Valores basais de PAM, FC e alterações de PAM e FC produzidas pelo losartan na RVLM sobre microinjeções sucessivas de Ang II na RVLM em ratos 2R1C e SHAM..... | 73 |
| Tabela 11: Valores basais de PAM, FC e alterações de FC produzidas pela Ang-(1-7), A-779 e salina na RVLM em ratos 2R1C e SHAM..... | 75 |

| | |
|--|----|
| Tabela 12: Valores basais de PAM, FC e alterações de FC produzidas pelo A-779 na RVLM sobre microinjeções sucessivas de Ang-(1-7) na RVLM em ratos 2R1C e SHAM..... | 78 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - micrograma

µL - microlitro

µm - micrômetro

2R1C – hipertensão renal do tipo dois-rins, um clip de Goldblatt

Ang II – angiotensina II

Ang-(1-7) – angiotensina-(1-7)

Ang III – angiotensina III

ANOVA – análise de variância

AT₁ – receptor angiotensinérgico do tipo 1 para Ang II

AT_{1A} – receptor angiotensinérgico do tipo 1, subtipo A para Ang II

AT_{1B} – receptor angiotensinérgico do tipo 1, subtipo B para Ang II

AT₂ – receptor angiotensinérgico do tipo 2 para Ang II

MAS – receptor angiotensinérgico para Ang-(1-7)

bpm – batimentos por minuto

CVLM – bulbo ventrolateral caudal

RVLM – bulbo ventrolateral rostral

DC – débito cardíaco

dL - decilitro

ECA – enzima conversora de angiotensina

EPM – erro padrão da média

FC – frequência cardíaca

i.p. - intraperitoneal

i.v. – intravenosa

mmHg – milímetros de mercúrio

NA – núcleo ambíguo

PA – pressão arterial

PAM – pressão arterial média

PAP – pressão arterial pulsátil

RVP – resistência vascular periférica

SHAM – grupo submetido à cirurgia fictícia, grupo normotenso

SHR – rato espontaneamente hipertenso

SNA – sistema nervoso autônomo

SNS – sistema nervoso simpático

SNP – sistema nervoso parasimpático

SRA – sistema renina angiotensina

UI – unidades internacionais

Δ – delta, variação

Sumário

| | |
|--|-----------|
| 1- Introdução..... | 21 |
| 2- Objetivos..... | 33 |
| 2.1- Objetivo Geral..... | 33 |
| 2.2-Objetivos Específicos..... | 33 |
| 3-Animais, Material e Métodos..... | 34 |
| 3.1-Animais | 34 |
| 3.2- Produção da hipertensão arterial renino-dependente (2R1C)..... | 34 |
| 3.3- Drogas e Preparo de soluções..... | 35 |
| 3.3.1- Preparo dos peptídeos e antagonistas..... | 35 |
| 3.3.2- Preparo da Fenilefrina..... | 35 |
| 3.4- Confeção e implantação das Cânulas Vasculares..... | 36 |
| 3.5- Traqueostomia..... | 36 |
| 3.6- Procedimento para Exposição do Bulbo..... | 37 |
| 3.7- Registro da Pressão Arterial..... | 37 |
| 3.8- Procedimento de Microinjeção no Bulbo Ventrolateral..... | 38 |
| 3.9- Teste da Sensibilidade do Controle Reflexo da FC..... | 38 |
| 3.10- Protocolo Experimental..... | 40 |
| 3.11- Histologia..... | 42 |
| 3.12- Análise Estatística..... | 42 |
| 4- Resultados..... | 43 |
| 4.1- Avaliação dos efeitos cardiovasculares de animais submetidos à microinjeção de angiotensinas e antagonistas angiotensinérgicos na CVLM..... | 43 |
| 4.1.1- Avaliação do peso seco dos rins de ratos 2R1C e ratos SHAM..... | 43 |
| 4.1.2- Avaliação da PAM e FC em ratos 2R1C e em ratos SHAM..... | 45 |
| 4.2- Efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de Ang II na CVLM de ratos 2R1C e SHAM..... | 47 |
| 4.2.1- Efeito da microinjeção de Ang II e losartan na CVLM sobre a PAM e FC.... | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.2- Efeito de microinjeções sucessivas de Ang II na CVLM sobre a PAM e FC..... | 50 |
| 4.2.3- Estudo do bloqueio dos receptores AT1 na CVLM pelo losartan sobre microinjeções sucessivas de Ang II na CVLM sobre a PAM e FC..... | 52 |
| 4.2.4- Efeito da microinjeção do losartan na CVLM sobre a bradicardia reflexa..... | 55 |
| 4.3- Efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de Ang-(1-7) na CVLM de ratos 2R1C e SHAM..... | 57 |
| 4.3.1- Efeito da microinjeção de Ang-(1-7) e A-779 na CVLM sobre a PAM e FC..... | 57 |
| 4.3.2- Efeito do A-779 na CVLM sobre microinjeções sucessivas de Ang-(1-7) na CVLM sobre a PAM e FC..... | 60 |
| 4.3.3- Efeito da microinjeção do A-779 na CVLM sobre a bradicardia reflexa..... | 63 |
| 4.4- Análise histológica da CVLM..... | 65 |
| 4.5- Avaliação dos efeitos cardiovasculares de animais submetidos a microinjeção de angiotensinas e antagonistas angiotensinérgicos na RVLM..... | 66 |
| 4.5.1- Avaliação do peso seco dos rins de ratos 2R1C e ratos SHAM..... | 66 |
| 4.5.2- Avaliação da PAM e FC em ratos 2R1C e SHAM..... | 68 |
| 4.6- Efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de Ang II na RVLM de ratos 2R1C e SHAM..... | 70 |
| 4.6.1- Efeito da microinjeção de Ang II e losartan na RVLM sobre a PAM e FC..... | 70 |
| 4.6.2- Estudo do bloqueio dos receptores AT1 na RVLM pelo losartan sobre microinjeções sucessivas de Ang II na RVLM sobre a PAM e FC..... | 72 |
| 4.7- Efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de Ang-(1-7) na RVLM de ratos 2R1C e SHAM..... | 75 |
| 4.7.1- Efeito da microinjeção de Ang-(1-7) e A-779 na RVLM sobre a PAM e FC..... | 77 |

| | |
|--|-----------|
| 4.7.2- Estudo do efeito do A-779 na RVLM sobre microinjeções sucessivas de Ang-(1-7) na RVLM sobre a PAM e FC..... | 80 |
| 4.8- Análise histológica na RVLM..... | 81 |
| 5- Discussão..... | 93 |
| 6- Conclusões..... | 95 |
| 7- Referências Bibliográficas..... | 92 |

1.Introdução

A regulação da pressão arterial (PA) é uma das funções fisiológicas mais complexas que depende de ações integradas dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino. A manutenção dos níveis pressóricos dentro de uma faixa de normalidade depende de variações do débito cardíaco (DC) ou da resistência periférica vascular (RPV) ou de ambos. Um grande número de estudos tem demonstrado o papel crítico do sistema nervoso no desenvolvimento e manutenção de diferentes modelos de hipertensão. Em particular aumento na atividade do nervo simpático parece contribuir para a patogênese da hipertensão (TAKEDA e BUNAG, 1980; ARRIBAS e cols., 1996; CABASSI e cols., 2002; LEENEN e cols., 2002).

Diferentes mecanismos de controles estão envolvidos não só na manutenção da PA como na variação, momento a momento, da PA. Estes mecanismos regulam o calibre e a reatividade vascular, a distribuição de fluido, dentro e fora, dos vasos e o DC (IRIGOYEN e cols., 2001). A regulação efetiva da PA é o resultado da atividade de sistemas de retroalimentação que operam em curto e em longo prazo. O principal mecanismo de controle em curto prazo é desempenhado pelos reflexos que são originados nos pressorreceptores arteriais e nos receptores de estiramento da região cardiopulmonar (CAMPAGNOLE-SANTOS e cols., 2001) e em longo prazo, pelo sistema renina angiotensina (SRA).

O SRA é o maior regulador da PA agindo periféricamente e centralmente. As angiotensinas começam a ser formadas pela hidrólise do angiotensinogênio pela renina para formar o decapeptídeo, angiotensina (Ang) I (Figura 1). A remoção de dois aminoácidos da extremidade carboxi-terminal pela enzima conversora de angiotensina (ECA) resulta na formação do principal efector do SRA, a Ang II. No coração de humanos, a maior parte da Ang I é convertida a Ang II por uma via alternativa, denominada quimases (URATA e cols., 1990; ROKS, 1999). A contribuição da ECA e das quimases para a formação da Ang II varia significativamente nas diferentes espécies e tecidos, dentro de uma mesma espécie (WU e cols., 2005).

Recentemente um novo componente biologicamente ativo do SRA foi descoberto (Figura 1). A quebra da Ang II através da remoção da fenilalanina da porção carboxi-terminal da Ang II resulta na formação da Ang-(1-7). Esta conversão é eficientemente catalisada pela recém descoberta ECA2, um análogo da ECA (HARMER, 2002; VICKERS e cols., 2002) bem como pela prolil-endopeptidase e carboxipeptidases. Acredita-se que a ECA2 exerça um papel importante na formação de Ang-(1-7) tecidual, como indicado pelo concomitante aumento da expressão da ECA2 e do conteúdo de Ang-(1-7) nos túbulos proximais renais de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (CAREY e SIRAGY, 2003). Além dessa via, a Ang-(1-7) pode ser formada diretamente da Ang I, uma conversão mediada por várias enzimas como a proliendopeptidase nas células vasculares (SANTOS e cols., 1992), endopeptidase neutral (YAMAMOTO e cols., 1994) na circulação e no rim (SHALTOUT e cols., 2006) e oligopeptidases (CHAPPEL e cols., 1994) nas células do músculo liso vascular. A Ang-(1-7) por sua vez pode ser degradada em Ang-(1-5) por ação da ECA (FERRARIO, 1998).

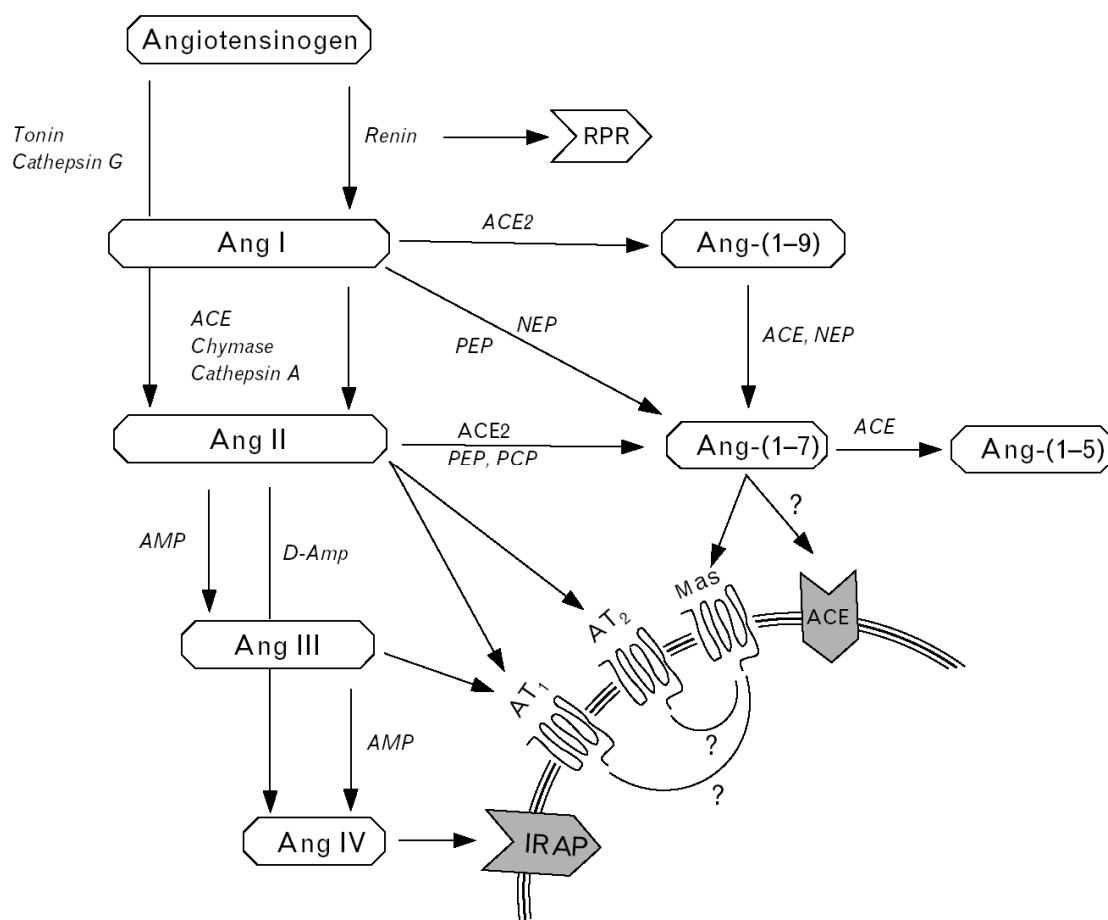


Figura 1: Visão corrente do SRA. ACE: enzima conversora de angiotensina; Ang: Angiotensina; PEP: prolil-endopeptidase, PCP: prolil-carboxipeptidase; NEP: endopeptidase neutra; AMP: aminopeptidases; IRAP: aminopeptidase regulada por insulina; RPR: receptor prorenina-renina; AT1 e AT2: receptores para Ang II; MAS: receptor para Ang-(1-7). (SANTOS e FERREIRA, 2007).

A Ang II atua principalmente através de dois subtipos de receptores, o AT1 e o AT2 (GASPARO e cols., 2000; KASCHINA e UNGER, 2003). O receptor AT1 media os efeitos fisiológicos clássicos bem como os efeitos patológicos da Ang II, incluindo a regulação da PA e o balanço hidroeletrólítico, comportamentos associados à sede e ingestão de sódio, proliferação celular e angiogênese. Duas classes de subtipos do receptor AT1

foram identificadas em ratos e camundongos, os receptores AT1A e ATB (SASAMURA e cols., 1992).

Os efeitos induzidos pela interação da Ang II ao 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; SCHIAVONE e cols.,1991; AMBÜHL e cols., 1992; WRIGHT e cols., 1994; SAAD e CAMARGO, 2003; STECKELING e cols., 2005). A ligação da Ang II a esses receptores 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. Além disso, os receptores AT2 apresentam níveis aumentados em processos patofisiológicos tais como o infarto do miocárdio e a hipertensão. O bloqueio agudo dos receptores AT2 aumenta os níveis de PA na hipertensão 2R1C em camundongos “knockout” para receptores AT1, sugerindo que sob algumas condições, os receptores AT2 participam da regulação aguda da PAM (CERVENKA e cols., 2002). O heptapeptídeo Ang III tem afinidade pelos subtipos de receptores AT1 e AT2 similar à Ang II. Por causa de sua meia-vida curta, tem sido difícil demonstrar suas funções (HARDING e FELIX,1987). Na literatura, além do AT1 e AT2, existe a descrição de outros subtipos de receptores para Ang como o AT4 presente em células endoteliais e músculo liso vascular, receptor para Ang IV (HARDING e cols.,1992) e acredita-se que a Ang-(3-7) também possa interagir com este receptor (WRIGHT e cols.,1995).

A Ang (1-7) foi considerada o componente do RAS com maior efeito pleitrópico (SANTOS e cols., 2000; HÖCHT e cols., 2006). 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 e 2005). Nos vasos, além de potenciar a ação vasodilatadora da bradicinina (BK) (PAULA e cols.,1995; LIMA e cols.,1997; BROSNIHAN e cols., 1996; ALMEIDA e cols 2000; FERNANDES e cols., 2001) inibe o crescimento de células musculares lisas (FREEMAN e cols.,1996; TALLANT., 1999;

STRAW e cols.,1999; MACHADO e cols., 2000). Estudos (CHAPPELL e cols.,1998; ALMEIDA e cols., 2000; SANTOS e cols., 2000; FARIA-SILVA e cols., 2005) têm mostrado que estes efeitos anti-hipertensivos estão associados à liberação de óxido nítrico (NO).

Nos rins, a Ang-(1-7) pode influenciar o balanço de sódio e água através de seus efeitos diuréticos e natriuréticos bem como influenciar a atividade do SRA local (SIMÕES & SILVA e cols., 1997; FERRARIO & IYER, 1998; PAULA e cols., 1999; KUCHARWICZ e cols., 2002). No coração, a Ang-(1-7) possui efeito cardioprotetor, prevenindo a redução da função cardíaca e redução da pressão ventricular diastólica final pós-infarto do miocárdio (FERREIRA e cols 2001; LOOT e cols 2002, FERREIRA e SANTOS, 2005). Recentemente, foi demonstrada (GROBE e cols, 2007) sua ação anti-trombótica, além da observação de que ventrículos com insuficiência cardíaca apresentam níveis aumentados de Ang-(1-7), reforçando a ação cardioprotetora deste peptídeo (ZISMAN e cols., 2003).

A Ang (1-7) atua via seu receptor específico, MAS (SANTOS e cols., 2003), entretanto existem evidências para uma interação funcional do receptor MAS com os receptores AT1 e AT2 no coração e rim de camundongos (PINHEIRO e cols., 2004; KOSTENIS e cols., 2005; CASTRO e cols., 2005). Vários estudos têm mostrado que a oposição da Ang-(1-7) aos efeitos da Ang II está aumentada em modelos animais com hipertensão (FERRARIO, 1998; CHAPPELL e cols., 1998; HÖCHT e cols., 2006). BENTER e cols. (1995) mostraram através da infusão de Ang-(1-7) na jugular de animais SHR e WKY que esse heptapeptídeo causou uma sustentada e significativa redução na concentração de vasopressina plasmática acompanhada por diurese e natriurese em animais SHR mas não em WKY, demonstrando que a Ang-(1-7) é capaz de atenuar a vasoconstrição da Ang II em ratos SHR, mas não em ratos normotensos. HÖCHT e cols. (2006) também mostraram que a administração de Ang-(1-7) juntamente com a Ang II no hipotálamo bloqueia a resposta pressora da Ang II de ratos SHR, mas não em ratos WKY.

O antagonista seletivo para a Ang-(1-7) foi caracterizado como um heptapeptídeo análogo D-Ala⁷-Ang-(1-7), (A-779). Este composto não apresentou atividade agonista

intrínseca em várias preparações biológicas testadas (SANTOS e cols.,1994). O efeito antiurético da Ang-(1-7) em ratos com sobrecarga hídrica e os efeitos cardiovasculares produzidos por administração central de Ang-(1-7) são bloqueados pelo A-779 (SANTOS e cols.,1994; FONTES e cols., 1994; FERNANDES e cols., 2001; MAIA e cols., 2004; SAMPAIO e cols., 2006).

A interrelação entre os peptídeos do SRA e o SNC foi demonstrada pela primeira vez por estudos de BICKERTON e BUCKLEY (1961). A confirmação da existência do SRA cerebral se deu com o avanço dos métodos moleculares para detecção do mRNA. Altos níveis de angiotensinogênio e de seu mRNA foram encontrados em áreas importantes do cérebro envolvida na regulação cardiovascular central como hipotálamo e tronco cerebral (LENKEI e cols., 1997; BADER e cols., 2001). Há várias evidências (ANDREATTA e cols., 1988; ALLEN e cols., 1988; DAMPNEY, 1994; AVERILL, 2000; SANTOS e cols., 2000; MURATAMI, 1991 e 1993; SESOKO, 1995; ALZAMORA e cols., 2002 e 2006) mostrando que os peptídeos do RAS exerçam um papel modulatório sobre mecanismos neurais de controle da PA como na resposta do reflexo pressoreceptor.

Os pressorreceptores arteriais são os mais importantes mecanismos de controle reflexo da PA, momento a momento. São mecanorreceptores constituídos por terminações nervosas livres que se situam na adventícia de grandes vasos (aorta e carótida) e que são estimulados por deformações das paredes desses vasos, normalmente provocadas pela onda de pressão na parede vascular. (KRIEGER, 1964; KRIEGER e cols., 1999; MICHELINI, 2000).

As fibras pressorreceptoras carotídeas e aórticas, sensíveis à distensão vascular, formam o nervo do seio carotídeo e o nervo depressor aórtico, que se unem respectivamente ao glossofaríngeo e ao vago, e se projetam ao bulbo (SCHER e cols., 1977). Dessa forma, as alterações na atividade desses receptores decorrentes de variações da PA convergem para o núcleo do trato solitário (nTS), onde é realizada a primeira sinapse no SNC. A informação periférica é processada no nTS e sinais eferentes são gerados no circuito neuronal intrínseco do nTS e transmitidos via conexões com as áreas de controle

autônomo bulbar para determinar o grau de atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) (FELDMAN e ELLEMBERGER, 1988; FELDMAN e MOISÉS, 1988).

O bulbo ventrolateral (VLM) é uma área importante para a regulação das funções cardiovasculares e respiratórias. A VLM rostral (RVLM) exerce vasopressão através de neurônios adrenérgicos bulboespinhais do grupo de células adrenérgicas C1, presentes nessa região (KALIA e cols., 1985). A VLM caudal (CVLM) exerce vasodilatação e contém um grupo de células noradrenérgicas A1 (DAY e cols., 1983; KALIA e cols., 1985; MURUGAIAN e cols., 1989). Enquanto a RVLM é um centro simpatoexcitatório, a CVLM é um centro simpatoinibitório por conter projeções neuronais inibitórias ascendentes para a RVLM. Este circuito neuronal inclui ainda uma projeção neuronal excitatória do nTS para a CVLM e uma conexão neuronal recíproca entre a CVLM e núcleo ambíguo (NA) (MACHADO e BRODY, 1992; MCKITRICK e CALARESU, 1997). O NA por sua vez contém neurônios pré-ganglionares parassimpáticos que projetam para o coração (AGARWAL e CALARESU, 1991). Os peptídeos angiotensinérgicos modulam os neurônios da VLM, incluindo as partes rostral e caudal. A Ang II e Ang-(1-7) microinjetada na RVLM e CVLM agem como agentes excitatórios tanto em animais anestesiados (AVERILL e cols., 1994; MURATAMI, 1993; SESOKO, 1995; ALZAMORA e cols., 2002 e 2006) como em animais não anestesiados (FONTES e cols., 1997; BECKER e cols., 2005).

A alta densidade de receptores para Ang II foi demonstrada no VLM (CVLM e RVLM) em diversas espécies, incluindo humanos (MENDELSON e cols., 1988; ALLEN e cols., 1988; DAMPNEY e cols., 1994; DAMPNEY e cols., 2002). A microinjeção da Ang II na RVLM leva a aumento da PA (ANDREATTA e cols., 1988; ALLEN e cols., 1988; SASAKI e DAMPNEY, 1990; SILVA e cols., 1993; FONTES e cols., 1994; AVERILL e cols., 1994), acompanhado por aumento na atividade simpática renal que é mediada pelos receptores AT1 (HIROOKA e cols., 1997; AVERILL e cols., 1994).

A microinjeção da Ang-(1-7) na RVLM produz efeitos cardiovasculares em diferentes espécies. Diversas evidências sugerem que o MAS é o mediador do efeito da Ang-(1-7) na VLM (AVERILL e cols., 1999; WRIGHT e HARDING, 1995; SANTOS e

cols., 2003; SANTOS e cols., 1994; FONTES e cols., 1997). Um estudo recente usando imunofluorescência no SNC de ratos mostrou que o receptor MAS está presente em áreas relacionadas ao controle cardiovascular no cérebro, incluindo a CVLM e RVLM (BECKER e cols., 2007).

Semelhante à RVLM, diversos estudos mostraram que os peptídeos angiotensinogênicos endógenos ativam os neurônios depressores da CVLM (POTTS e cols., 2000; POTTS e cols., 2002). A microinjeção da Ang-(1-7) na CVLM produz resposta depressora que é inibida pelo A-779 (SILVA e cols., 1993; FONTES e cols., 1997; ALZAMORA e cols., 2002; POTTS e cols., 2002; WANG e cols., 2005).

O efeito depressor da Ang II na CVLM já está bem estabelecido. Alguns trabalhos na literatura (MURATANI, 1991 e 1993) mostraram que a magnitude da queda de pressão produzida pela microinjeção da Ang II na CVLM é maior em ratos SHR que em animais normotensos. No entanto, estudos do nosso laboratório mostraram que o efeito depressor da Ang II em ratos 2R1C na CVLM é semelhante aos animais normotensos (RODRIGUES e cols., 2007). Em adição, FERREIRA e colaboradores (2008) mostraram em ratos SHR que o efeito depressor da Ang II na CVLM é semelhante em ratos normotensos.

ALZAMORA e colaboradores (2002) mostraram em ratos normotensos que a Ang II e a Ang-(1-7) na CVLM produziu quedas similares da PA, determinadas por diminuição da RPV através de mecanismos diferentes. Enquanto o efeito da Ang II depende principalmente da diminuição do tônus simpático, o efeito da Ang-(1-7) envolve a ativação de uma via nitroxidérgica.

O losartan, antagonista não peptídico de receptor AT1 para Ang II, tem sido amplamente usado no tratamento da hipertensão (BÉCHIR e cols., 2005). O losartan é capaz de diminuir a PA em SHR, mas não age em animais normotensos e em ratos hipertensos modelo acetato deoxicorticosterona (DOCA) independente de renina (WONG e cols., 1990). O tratamento terapêutico com losartan em pacientes com hipertensão essencial melhorou significativamente a sensibilidade barorreflexa (CHERN., 2006). Em pacientes hipertensos, o tratamento com losartan durante 12 semanas reduziu a atividade simpática muscular e melhorou a sensibilidade baroreceptora. Os níveis de Ang II

plasmáticos aumentam com o losartan, refletindo o bloqueio do receptor (BÉCHIR e cols., 2005). Além disso, o aumento de Ang II provocado pelo losartan pode sofrer ação da ECA2 e ser convertida em seu contraregulador Ang-(1-7) (HARMER e cols., 2002; VICKERS e cols. 2002).

BERGAMASCHI e cols. (2002) mostraram em ratos Wistar que na hipertensão induzida pelo tratamento crônico de L-NAME, o losartan microinjetado bilateralmente na RVLM não causou nenhuma alteração na PA. Em experimentos realizados com ratos transgênicos (mREN2)27, que apresentam uma acentuada atividade do SRA central, a microinjeção de antagonista AT1 específico, CV11974, resultou em diminuição significativa na PA (FONTES e cols., 2000).

Entretanto em ratos acordados, a microinjeção de antagonistas de receptor AT1 como o losartan, na RVLM, resultou em aumento da PA (FONTES e cols., 1997). Esse efeito pressor não parece ser inespecífico, uma vez que, é abolido nos animais transgênicos (L-680), que possuem baixa concentração de angiotensinogênico no cérebro (BALTATU e cols., 2001). Estudo realizado por FONTES e DAMPNEY (2001) mostrou que a microinjeção do antagonista L-158,809, em condições de hipóxia, onde a atividade dos neurônios da RVLM está aumentada, resultou em aumento da PA e atividade simpática.

LIMA e colaboradores (1999) utilizando ratos wistar anestesiados submetidos a hemorragia demonstraram que a microinjeção do antagonista de receptor AT1, losartan, e do antagonista inespecífico, sarthran, na RVLM reduzem a queda na PA provocada pela hemorragia. HU e cols., (2002) utilizando técnica de imunofluorescência combinada com microscopia confocal, mostraram a presença de receptores AT1 em neurônios glutamatérgicos e gabaérgicos na RVLM de ratos wistar. Além disso, esses autores mostraram que a imunoreatividade para receptores AT1 é maior na RVLM de SHR. Esses resultados sugerem a possibilidade da Ang II estimular, na RVLM, a atividade tanto de neurônios excitatórios, como inibitórios. Em conjunto esses dados sugerem que o papel modulatório da Ang II na RVLM sobre a atividade simpática periférica possa ser resultado do balanço entre a estimulação excitatória (neurônios glutamatérgico) e inibitória (neurônios GABAérgicos) provocada por esse peptídeo.

Diversos estudos têm demonstrado que na hipertensão ocorre a redução da sensibilidade barorreflexa (MOREIRA e cols., 1988; MATSUMURA e cols., 1989; KUMAGAI e cols., 1990; BRITTO e cols., 1997 e KRIEGER e cols., 1999). Adicionalmente sugere-se que a sensibilidade barorreflexa seja um fator prognóstico adverso em pacientes com doenças cardíacas tais como infarto do miocárdio, falência cardíaca congestiva e em populações em geral (CHERN, 2006).

Já está bem estabelecido que a Ang II periféricamente ou centralmente modula essa sensibilidade barorreflexa (FERRARIO e cols., 1986; REID,1984). A Ang II exerce uma influência inibitória sobre o controle reflexo da FC tanto após administração periférica como após administração em alguns centros cerebrais em animais normotensos e hipertensos (FERRARIO e cols., 1986; CULMAN e cols 1995; AVERILL e DIZ, 2000; MCKINLEY e cols. 2001; DAMPNEY e cols.2002). Este efeito parece ser acompanhado de diminuição do tônus parassimpático para o coração e excitação do tônus vascular simpático (LUMBERS e cols.,1979).

BERECEK e cols.(1983) mostraram que a infusão central (ICV) ou periférica de inibidor da ECA em SHR e WKY produziu facilitação do reflexo pressorreceptor, sugerindo que a Ang II endógena diminua a sensibilidade do barorreflexo e conseqüentemente participe da fisiopatologia desse modelo de hipertensão. Outro estudo mostrou que a injeção de Ang II no nTS atenuou a sensibilidade do reflexo pressorreceptor em ratos SHR e WKY (CASTO e PHILLIPS,1986). CAMPAGNOLE e colaboradores (1988) mostraram que a inibição da Ang II endógena ao nível no nTS, através da microinjeção do antagonista de Ang II, Sar1Thr8-Ang II, melhorou a sensibilidade do controle reflexo da FC em ratos normotensos. MICHELINI (1990) mostrou em ratos acordados que a microinjeção de Ang II no nTS atenuou o barorreflexo enquanto a microinjeção de seu antagonista losartan melhora o controle barorreflexo da FC.

Diferentemente da Ang II, a Ang-(1-7) não interfere na modulação do barorreflexo quando injetada periféricamente (CAMPAGNOLE-SANTOS e cols., 1992). BERECEK e cols. (1991) mostraram que a infusão ICV do antagonista seletivo da Ang-(1-7), A-779, não alterou significativamente o controle barorreflexo da FC em SHR. CAMPAGNOLE-

SANTOS e cols. (1992) mostraram que a infusão da Ang-(1-7) ICV produziu significativa facilitação do controle barorreflexo em animais normotensos. Esse mesmo efeito sobre o barorreflexo foi mostrado com microinjeções de Ang-(1-7) no nTS em animais normotensos e SHR (CHAVES e cols., 2000).

Estudos de nosso laboratório (ALZAMORA e cols., 2006) também mostraram que os peptídeos angiotensinérgicos atuam de forma diferente na CVLM. Enquanto a microinjeção de Ang II facilita a bradicardia reflexa, a microinjeção de Ang-(1-7) na CVLM diminui a bradicardia reflexa em ratos normotensos (Wistar).

O envolvimento desses peptídeos do SRA no desenvolvimento da hipertensão arterial foi demonstrado em diversos estudos (WEYHENMEYER e PHILLIPS, 1982; GANTEN e cols., 1983; HERMANN e cols., 1984; PHILLIPS e KIMURA, 1988; SHIBATA e cols., 1993; TAMURA e cols., 1996). Com o objetivo de evidenciar a importância do SRA na patogênese da hipertensão, vários modelos animais têm sido utilizados. A hipertensão arterial pode ser produzida experimentalmente através da estenose da artéria renal, perinefrite, compressão renal ou coarctação da aorta nos animais com um ou dois rins. Nesses modelos de hipertensão, o aumento inicial da PA ocorre devido à elevação dos níveis plasmáticos de renina e Ang II (BRODY e cols., 1991). GOLDBLATT (1934) demonstrou a participação do rim como agente primário no aparecimento da hipertensão. Dois tipos de hipertensão arterial foram descritas, inicialmente, pelo pesquisador. Em seus modelos animais ele desenvolveu a hipertensão renovascular, um rim, um clip (1R1C) e dois rins, um clip (2R1C). Nesses dois modelos o SRA é o responsável pelo desenvolvimento inicial da hipertensão. No modelo de hipertensão 2R1C, faz-se a constrição da artéria renal enquanto o rim contra lateral é mantido intacto. Esse modelo é caracterizado por uma redução no fluxo do rim que está com sua artéria clipada. Essa redução do fluxo renal é que ativa o SRA

Os níveis de Ang II nesse modelo estão aumentados na circulação na fase aguda após a cirurgia. Na fase crônica (~28 dias após a cirurgia de colocação do clipe) os níveis de Ang II plasmáticos estão normais, mas altos níveis de Ang II no cérebro são detectados

(GALLI e cols,2001; DUKA e cols, 2002; LAZARTIGUES e cols., 2004) sugerindo um importante papel do SRA cerebral na manutenção da hipertensão nesse modelo.

Diante do exposto e considerando que não existem dados na literatura que mostrem a atuação dos peptídeos angiotensinérgicos endógenos na VLM sobre a PAM e sobre o controle barorreflexo em animais hipertensos com altos níveis de Ang II, o presente estudo pretende avaliar os efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de angiotensinas e antagonistas angiotensinérgicos na CVLM e RVLM em animais hipertensos 2R1C.

2. Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Avaliar os efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de Ang II, Ang-(1-7) e dos seus respectivos antagonistas específicos, Losartan e A-779, no bulbo ventrolateral de ratos com hipertensão renovascular - 2R1C.

2.2- Objetivos Específicos

1. Avaliar os efeitos da microinjeção de Angiotensina II, Angiotensina-(1-7), Losartan e A-779 na CVLM e RVLM sobre a PAM e FC em animais 2R1C e SHAM.
2. Avaliar o bloqueio de receptores AT1 pelo losartan e de receptores MAS pelo A-779 sobre o efeito da Angiotensina II e Angiotensina-(1-7) microinjetados na CVLM e RVLM sobre a PAM e FC em animais 2R1C e SHAM.
3. Avaliar o efeito da microinjeção do Losartan e do A-779 na CVLM sobre a sensibilidade da bradicardia reflexa em animais 2R1C e SHAM.

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 renino-dependente (2R1C)

Na produção da hipertensão arterial utilizando o método de GOLDBLATT (1934) 2 rins 1 clip, (2R1C), os animais foram submetidos a jejum de 24 horas, com livre acesso à água. No dia da cirurgia, sob anestesia de quetamina (50 mg/kg) e xilasina (5 mg/ kg), os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica, e submetidos a tricotomia e assepsia da região abdominal com álcool iodado 2%. A seguir, foi realizada uma laparotomia mediana para isolamento e visualização da artéria renal esquerda. Um clip 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, cuja abertura havia sido previamente fixada através do uso de um calibrador, foi colocado em torno da artéria renal. O grau de constrição do clip escolhido foi de 0,20 mm (grau de constrição em que observamos índice de PA > 150 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 clip de prata na artéria renal. Estes animais foram utilizados como controle (animais normotensos). 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.

3.3- Drogas e Preparo de soluções

Angiotensina II: (PM: 1046,2) fornecido pela Bachem (Torance, CA).

Angiotensina -(1-7): (PM: 898,1) fornecido pela Bachem (Torance, CA).

A-779: (PM: 873,1) fornecido pela Bachem (Torance, CA).

Losartan: (PM: 461,1) cedido pela COINFAR.

Veículo: solução fisiológica 0,9%.

Agente hipertensor agonista adrenérgico: cloridrato de L-Fenilefrina fornecido pela Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

Anestésico: - uretana fornecido pela Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

- xilazina adquirido da Syntec do Brasil Ltda

- quetamina adquirido da Syntec do Brasil Ltda

3.3.1- Preparo dos peptídeos e antagonistas

Todos os peptídeos e antagonistas foram dissolvidos em solução salina estéril na concentração de 2 mg/ ml e imediatamente aliquotados (10 µl) em tubos de eppendorf e mantidos a -20°C (solução estoque). No dia do experimento, as soluções foram preparadas a partir da solução estoque através de diluição em solução salina estéril. Cada alíquota fora utilizada uma única vez. A dose dos peptídeos, Ang II (40 pmol) e Ang-(1-7) (40 pmol), e antagonistas, Losartan (86 pmol) e A-779 (50 pmol), utilizados nesse estudo foi escolhida com base em estudos anteriores (SILVA e cols., 1993; FONTES e cols., 1994; SANTOS e cols.,1994; ALZAMORA e cols.2002 e 2006.)

3.3.2- 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 alíquotadas em tubos de polietileno Eppendorf e permaneceram congeladas até o momento do uso.

3.4- Confeção 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 por aquecimento a tubos de polietileno PE-50 de 15 cm. 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, em jejum de 8 a 12 horas, 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 femoral. A artéria e veia femorais foram dissecadas e expostas. A extremidade PE-10 das cânulas foram introduzidas na aorta abdominal, via artéria femoral, para registro dos parâmetros cardiovasculares e na veia cava inferior, através da veia femoral, 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.

3.5- Traqueostomia

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

3.6- Procedimento para Exposição do Bulbo

Os animais foram colocados em decúbito ventral em um aparelho estereotáxico (David Kopf modelo DKI 900). A inclinação da cabeça foi mantida em uma angulação de aproximadamente 30°, com a peça bucal mantida a -11mm abaixo da linha interaural. 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.

3.7- Registro da Pressão Arterial:

A pressão arterial foi monitorada por 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 frequência cardíaca (FC). A PAP e FC foram continuamente amostradas por um sistema de conversão analógico/ digital de 12 bits (POWERLAB 4/ 20) a uma frequência de 800 Hz e armazenados em disco rígido (PC). Posteriormente, o sinal foi processado por um software (Powerlab 4/ 20) para se obter a pressão arterial média (PAM), as características temporais e as alterações máximas dos parâmetros desejados. Simultaneamente, a PAM e FC eram 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 ao transdutor da cânula ao transdutor, o animal foi heparinizado (heparina sódica 25.000 UI/ 5mL) a fim de se evitar a formação de coágulo durante o registro da PA.

3.8- Procedimento de Microinjeção no Bulbo Ventrolateral

Microinjeções foram feitas através de uma micropipeta de vidro de três pontas, devidamente fixada ao micromanipulador do extereotáxico. As microinjeções foram realizadas pela pressão de ar exercida por uma seringa de plástico conectada a extremidade distal da micropipeta. Para controlar os efeitos de volume e/ ou pressão exercida pela microinjeção de peptídeos, o volume de veículo (100 nL, NaCl 0,9%) foi também injetado. Os peptídeos foram microinjetados em um volume de 100 nl realizadas na área ventrolateral do bulbo caudal (CVLM) e rostral (RVLM) tendo o óbex como ponto de referência ântero-posterior e lateral de acordo com as seguintes coordenadas:

CVLM – 0,7 mm rostral e 1,8 mm lateral ao óbex. A profundidade foi determinada no momento em que a agulha tocou a superfície ventral ao bulbo.

RVLM – 2,1 mm rostral e 1,8 mm lateral ao óbex. A profundidade foi determinada no momento em que a agulha tocou a superfície ventral ao bulbo.

A introdução da micropipeta na RVLM ou CVLM causava, respectivamente, aumento ou diminuição transiente da PAM e FC, o que servia como forma adicional de confirmar o correto posicionamento da micropipeta. Alguns animais que não apresentaram esses efeitos foram descartados.

3.9- Teste da Sensibilidade do Controle Reflexo da FC

A sensibilidade do reflexo pressorreceptor foi avaliada relacionando-se as alterações reflexas de FC induzidas por alterações transitórias da PAM. Para produzir alterações da PAM, os animais foram submetidos a injeção (em bolus) endovenosa (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 de FC verificada durante os primeiros cinco segundos da resposta pressora correspondente era convertida à intervalo de pulso (IP) pela fórmula $IP = 60000/FC$ (mseg). A sensibilidade do reflexo pressorreceptor 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 pressorreceptor”. O melhor ajuste da regressão linear foi extraído da média \pm EPM para alterações de PAM e FC para cada dose de fenilefrina para cada animal. A curva de regressão linear foi usada como um índice de sensibilidade barorreflexa. A bradicardia reflexa foi avaliada antes e após, entre 5 e 15 minutos, da microinjeção de losartan ou A-779 na CVLM.

3.10- Protocolo Experimental

Protocolo I: Estudo da microinjeção de Ang II e Ang-(1-7) e seus respectivos antagonistas no VLM sobre a PAM e FC.

Após o início do registro da PAM e FC, por cerca de dez minutos (estabilização), descia-se a micropipeta de vidro nas áreas CVLM ou RVLM. Esperava-se dez minutos e microinjetava-se a Ang II ou Ang-(1-7), após mais dez minutos microinjetava-se os antagonistas específicos, losartan ou A-779. A microinjeção do antagonista foi considerado o ponto zero, a partir desse ponto, o tempo foi cronometrado. Após cinco, quinze e trinta minutos microinjetava-se Ang II ou Ang-(1-7), nestes respectivos tempos. Nos experimentos com os antagonistas (A-779 e losartan), após dez minutos da última microinjeção do peptídeo foi microinjetado a salina.

Foram utilizados ratos diferentes para estudos na CVLM ou RVLM, bem como para estudo com Ang II e Ang-(1-7) com seus antagonistas específico em ratos 2R1C e SHAM.

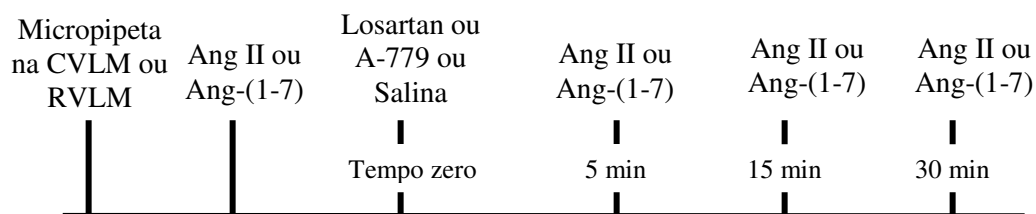


Figura 2: Protocolo experimental para a avaliação dos efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de Ang II ou Ang-(1-7) e seus respectivos antagonistas losartan e A-779 na CVLM ou RVLM sobre a PAM e FC em ratos 2R1C e SHAM.

Protocolo II : Estudo da microinjeção dos antagonistas angiotensinérgicos na CVLM sobre a sensibilidade da bradicardia reflexa

Para estabilização da PAM e da FC aguardava-se cerca de dez minutos para a descida da micropipeta de vidro na CVLM. Após dez minutos, microinjetava-se a Ang II ou Ang-(1-7). Em seguida, o teste do baroreflexo foi feito através das injeções (i.v) de doses crescentes de fenilefrina. Após 5 minutos, procedia-se a microinjeção do losartan ou A-779 e fazia-se o teste do baroreflexo novamente entre 5 e 15 minutos após a microinjeção desses antagonistas. Na intenção de verificarmos se os antagonistas estavam efetivos após o término do segundo teste do baroreflexo (15 minutos) microinjetava-se Ang II ou Ang-(1-7). Após dez minutos da última microinjeção do peptídeo foi microinjetado a Salina. Nestes experimentos foram utilizados grupos de animais diferentes para o estudo do efeito da microinjeção de losartan e da microinjeção de A-779 na CVLM sobre a sensibilidade da bradicardia reflexa em ratos 2R1C e SHAM.

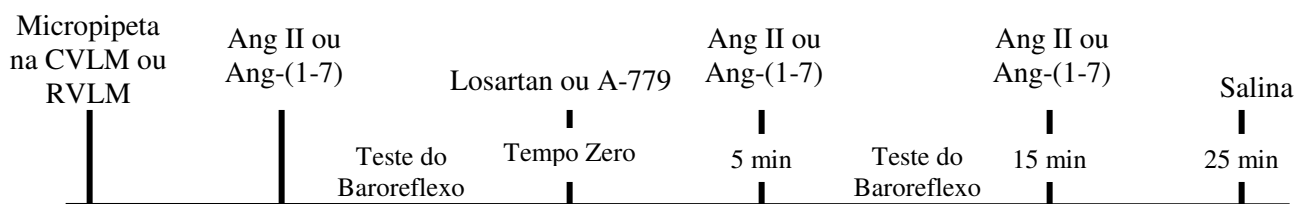


Figura 3: Protocolo experimental para a avaliação da sensibilidade da bradicardia reflexa após microinjeção do losartan ou A-779 na CVLM em animais 2R1C ou SHAM.

3.11- Histologia

Ao fim de cada experimento, o animal foi sacrificado pela injeção (i.v.) de uma grande dose de uretana e o cérebro foi removido. Após a fixação em formol 10%, cortes seccionais congelados do cérebro de 40 μm foram feitos e corados com vermelho neutro 1%. O sítio de injeção na CVLM e RVLM foi identificado através do diagrama do cérebro de ratos do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 1986).

3.12- Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos com médias \pm EPM. Comparações entre antes e depois das injeções no mesmo animal foram feitas pelo teste “t” de Student para observações pareadas. Para observações entre animais diferentes foi utilizado o teste “t” de Student não pareado. Comparações entre diferentes grupos foram avaliadas por one-way ANOVA seguido de teste de Newman-Keuls ou Dunnett quando apropriado. Estas análises foram realizadas no software Graphpad Prism (versão 4.00). Foram consideradas diferenças significativas para $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1- Avaliação dos efeitos cardiovasculares de animais submetidos a microinjeção de angiotensinas e antagonistas angiotensinérgicos na CVLM

4.1.1- Avaliação do peso seco dos rins de ratos 2R1C e ratos SHAM

Na hipertensão 2R1C, a avaliação do peso dos rins é um dos parâmetros utilizados para confirmar a eficiência da metodologia empregada. Através dos pesos pode-se confirmar a estenose da artéria renal que diminui o fluxo sanguíneo para o rim clipado e a hiperfunção compensatória do rim contralateral (rim não-clipado).

A figura 4 mostra que o peso seco do rim esquerdo (rim clipado) dos ratos 2R1C foi menor ($p < 0,0001$) ($0,068 \pm 0,003$ g, $n=19$) comparado ao rim esquerdo dos ratos normotensos ($0,086 \pm 0,001$ g, $n=22$). Em relação aos rins direito, o rim do animal clipado foi significativamente maior ($p < 0,0001$) ($0,104 \pm 0,002$ g, $n=19$) comparado ao rim direito dos ratos normotensos ($0,086 \pm 0,002$ g, $n=22$)

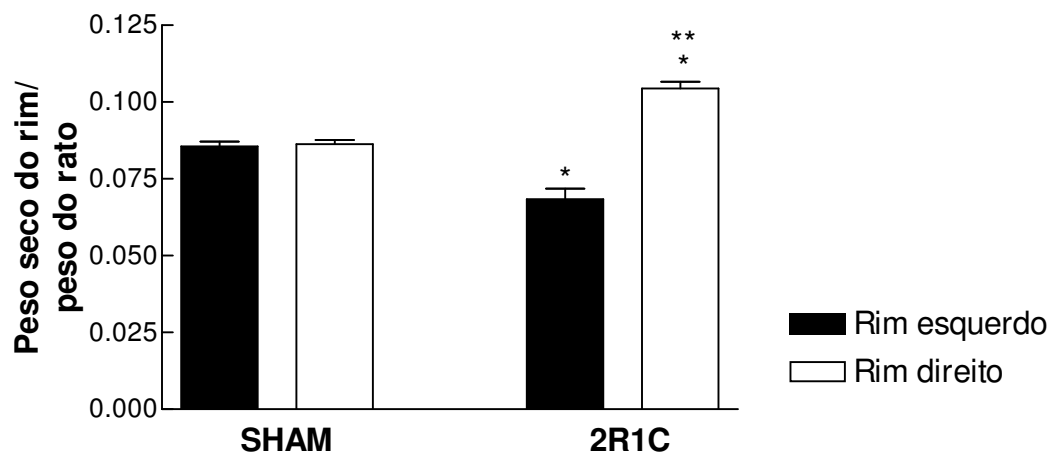


Figura 4: Comparação entre o peso dos rins direito e esquerdo de animais com hipertensão 2R1C ($n=19$) e SHAM ($n=22$). * $p < 0,05$ comparado com o rim esquerdo dos animais normotensos. ** $p < 0,05$ comparado com o rim direito dos animais normotensos (teste “t” de Student para observações não pareadas).

Com o objetivo de verificarmos o grau de constrição da artéria renal nos ratos clipados (2R1C), avaliamos o percentual de redução do rim esquerdo (clipado) em relação ao rim direito (não clipado). Como mostra a figura 5 e a tabela 1, os ratos 2R1C apresentaram o percentual de redução do rim esquerdo (clipado) em relação ao rim direito maior ($p < 0,0001$) em comparação a relação do percentual de redução dos rins dos animais SHAM.

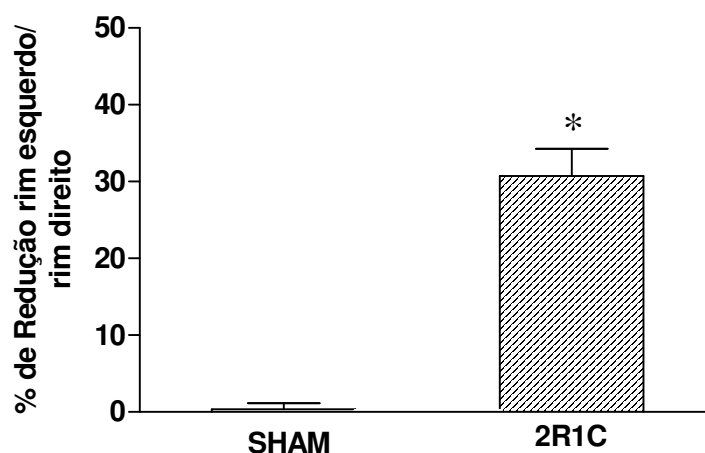


Figura 5: Avaliação da porcentagem (%) de redução do peso seco do rim esquerdo (clipado) [(g/100g de peso corporal) (rim esquerdo/ rim direito x 100 -100)] de ratos SHAM (n=22) e 2R1C (n=19). * $p < 0,05$ comparado com os animais SHAM (teste “t” de Student para observações não pareadas).

Tabela 1: Valores da porcentagem (%) de redução do peso seco do rim esquerdo (clipado) [(g/100g de peso corporal) (rim esquerdo/ rim direito x 100-100)]

| | % de Redução | n |
|------|---------------|----|
| SHAM | 0,37 ± 0,78 | 22 |
| 2R1C | 30,71 ± 3,54* | 19 |

Valores expressos em média ± erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado com os animais normotensos (teste “t” de Student para observações não pareadas).

4.1.2- Avaliação da PAM e FC em ratos 2R1C e em ratos SHAM

Os níveis basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de animais hipertensos 2R1C e normotensos SHAM estão representados na figura 6 e 7. Na figura 6, observa-se traçados típicos de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), FC e PAM de ratos 2R1C e SHAM. Como mostrado na figura 7, os ratos 2R1C apresentaram aumento ($p < 0,0001$) no valor basal de PAM (148 ± 4 mmHg, $n=19$) em relação ao grupo normotenso (106 ± 2 mmHg, $n=22$). Não foram observadas alterações significativas ($p=0,3633$) da FC no grupo hipertenso (379 ± 9 bpm, $n=19$) em relação ao grupo normotenso (367 ± 10 bpm, $n=22$).

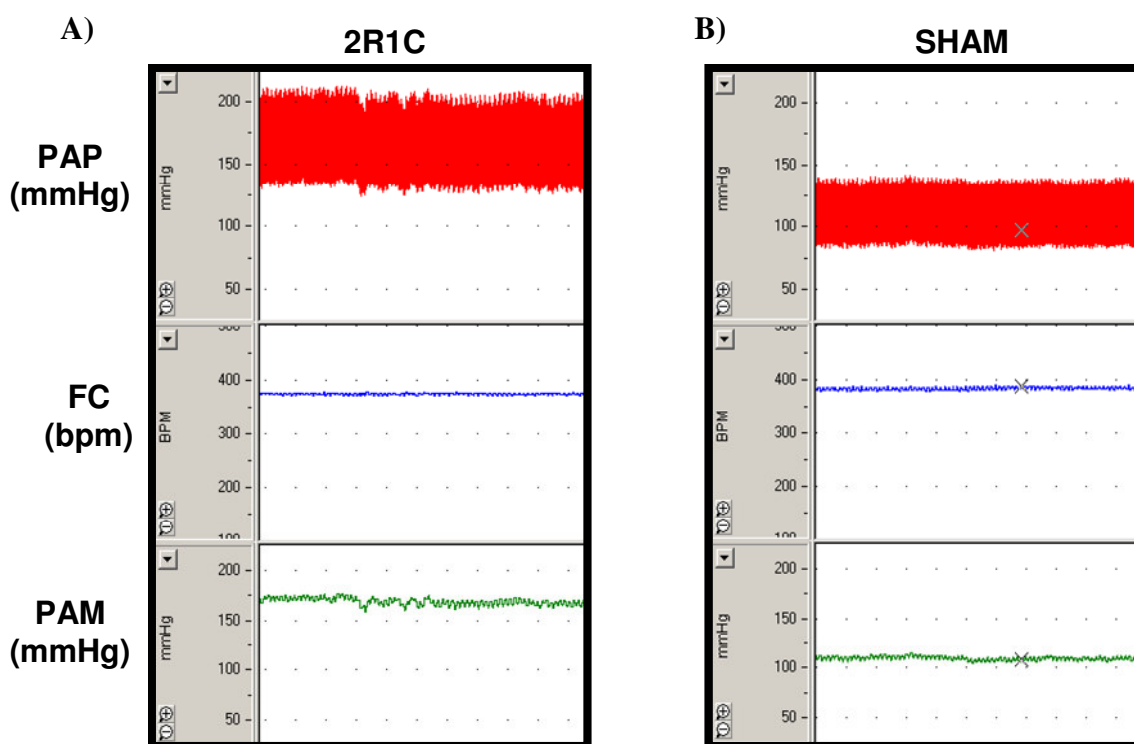
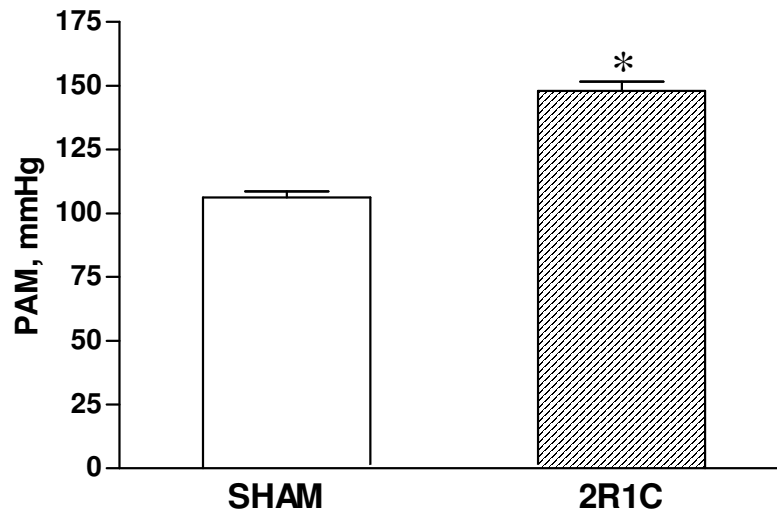


Figura 6: Registro da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), frequência cardíaca (FC, bpm) e da pressão arterial média (PAM, mmHg) típico de um rato 2R1C (A) e um rato SHAM (B).

A)

PAM



B)

FC

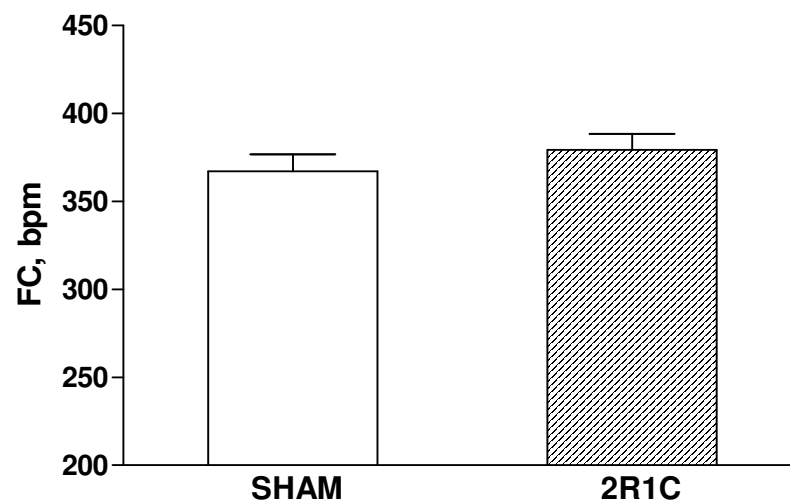


Figura 7: Pressão Arterial Média (PAM, mmHg; painel A) e Frequência Cardíaca (FC, bpm; painel B) em ratos com hipertensão 2R1C (n=16) e ratos SHAM (n=14). * $p < 0,05$ comparado com animais SHAM (teste “t” de Student para observações não pareadas).

4.2- Efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de Ang II na CVLM de ratos 2R1C e SHAM

4.2.1-Efeito da microinjeção de Ang II e losartan na CVLM sobre a PAM e FC

A figura 8 (painel A) e a tabela 2 mostram o efeito hipotensor produzido pela microinjeção de Ang II (40 pmol), losartan (86 pmol) e salina (100 nl) na CVLM. O efeito hipotensor produzido pela microinjeção de Ang II na CVLM nos animais 2R1C foi ($-10 \pm 0,9$ mmHg, n=5) maior ($p < 0,05$) em comparação ao efeito produzido pela microinjeção da salina (-3 ± 1 mmHg, n=5). Da mesma forma, nos animais SHAM a microinjeção de Ang II na CVLM produziu efeito depressor ($-11 \pm 1,3$ mmHg, n=6) maior ($p < 0,05$) em comparação ao efeito produzido pela microinjeção da salina ($-2 \pm 0,5$ mmHg, n=6). Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) do efeito hipotensor produzido pela Ang II na CVLM dos ratos 2R1C e ratos SHAM.

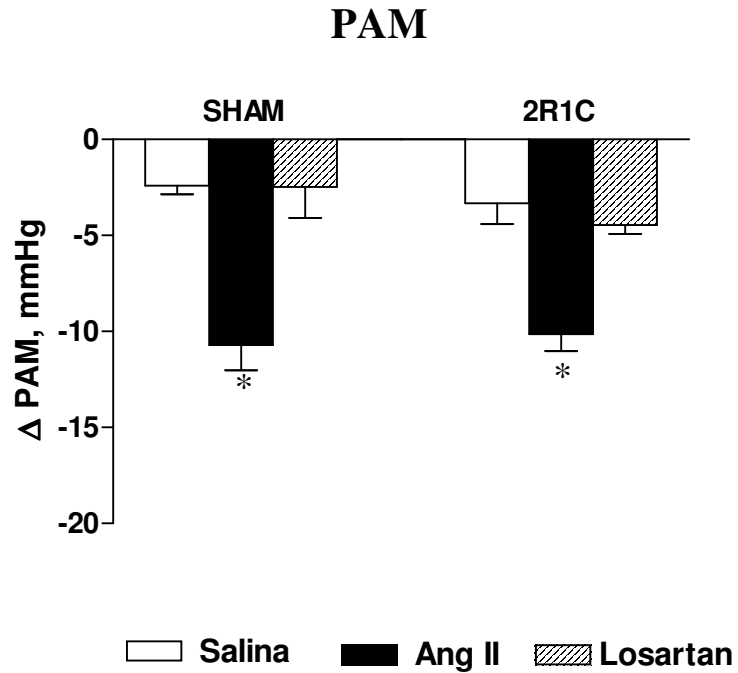
A microinjeção do antagonista de receptor AT1, losartan, na CVLM produziu uma hipotensão similar ($p > 0,05$) a produzida pela microinjeção de salina tanto nos ratos hipertensos ($-4,5 \pm 0,5$ mmHg, n=5) como nos normotensos ($-2,5 \pm 1,6$ mmHg, n=6). Não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) na FC após a microinjeção da Ang II, do losartan e da salina na CVLM em ambos os grupos de ratos 2R1C e SHAM (Figura 8, painel B e tabela 2).

Tabela 2: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) e alterações de FC produzidas pela microinjeção de Ang II (40 pmol), losartan (86 pmol) e salina (100 nl) na CVLM em animais 2R1C e SHAM

| | Valores Basais | | | | Δ FC, bpm | |
|-----------------|----------------|-------------|---------------|--------------|-------------------|----------------|
| | PAM, mmHg | | FC, bpm | | após microinjeção | |
| | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM |
| Ang II | 113 \pm 12 | 107 \pm 4 | 357 \pm 19 | 312 \pm 16 | -3,9 \pm 1,4 | -3,8 \pm 2,6 |
| Losartan | 84 \pm 8 | 98 \pm 5 | 395 \pm 19* | 303 \pm 13 | -1,3 \pm 0,7 | -3,3 \pm 1,8 |
| Salina | 72 \pm 7* | 101 \pm 6 | 362 \pm 10* | 283 \pm 14 | -1,6 \pm 0,4 | -3,7 \pm 2,6 |
| n | 5 | 6 | 5 | 6 | 5 | 6 |

Valores expressos em média \pm erro padrão da média. *p<0,05 em relação ao respectivo grupo SHAM (teste “t” de Student para observações não pareadas).

A)



B)

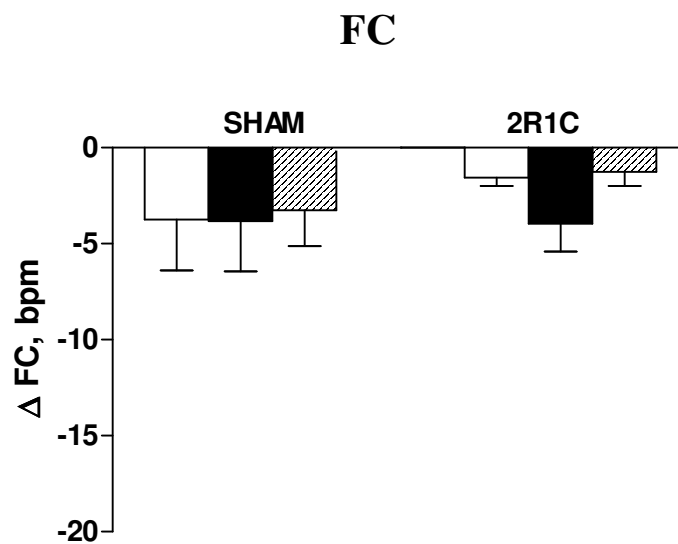


Figura 8: Efeito da microinjeção de Ang II (40 pmol), losartan (86 pmol) e salina (100 nl) na CVLM sobre a PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) em ratos 2R1C (n=5) e SHAM (n=6). *p<0,05 comparado com a microinjeção de salina. (ANOVA seguido de Dunnett).

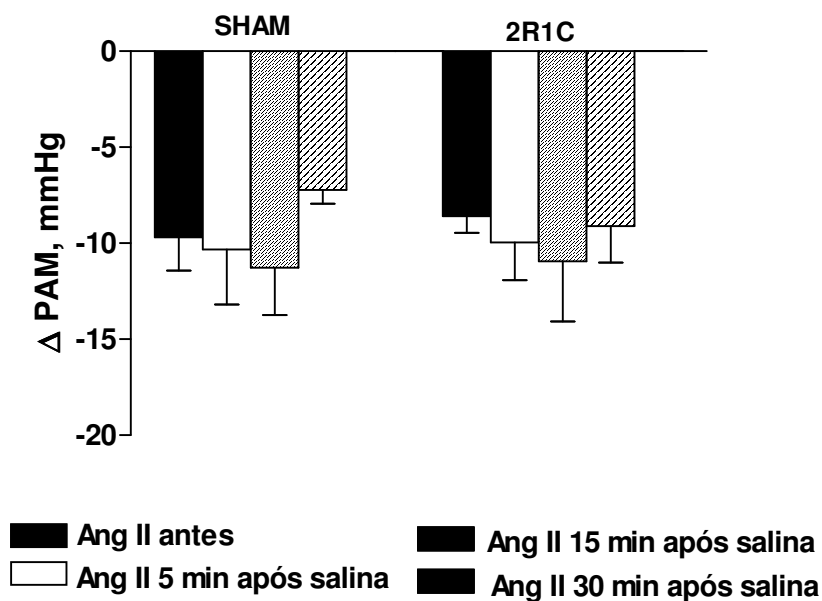
4.2.2- Efeito de microinjeções sucessivas de Ang II na CVLM sobre a PAM e FC

Com a intenção de verificarmos se poderia ocorrer alterações no efeito da Ang II microinjetada sucessivas vezes na CVLM sobre a PAM e FC, foi avaliado o efeito da microinjeção da Ang II antes e após a microinjeção de salina (Figura 9, painel A e B). O efeito da microinjeção sucessiva de Ang II na CVLM após 5, 15 e 30 minutos da microinjeção de salina na CVLM foi semelhante ($p>0,05$) tanto nos animais 2R1C como nos SHAM. A figura 9 (painel A) mostra o efeito hipotensor produzido pela microinjeção sucessiva de Ang II na CVLM antes e após a microinjeção de salina na CVLM. A Ang II produziu quedas similares da PAM antes ($-10 \pm 1,7$ mmHg) e cinco ($-10 \pm 2,8$ mmHg), quinze ($-11 \pm 2,4$ mmHg) e trinta ($-7 \pm 0,7$ mmHg) minutos após a microinjeção de salina CVLM ($-3 \pm 1,4$ mmHg) nos animais SHAM ($n=4$). Não foram observadas alterações significativas ($p>0,05$) na FC após a microinjeção da Ang II e da salina na CVLM (Figura 9, painel B).

Da mesma forma como observada nos animais SHAM, nos animais com hipertensão 2R1C, a Ang II produziu quedas similares da PAM antes ($-9 \pm 0,9$ mmHg) e cinco (-10 ± 2 mmHg), quinze (-11 ± 3 mmHg) e trinta ($-9 \pm 1,9$ mmHg) minutos após a microinjeção de salina ($-4 \pm 0,9$ mmHg) na CVLM dos ratos 2R1C ($n=4$) (Figura 9, painel A). Não foram observadas alterações significativas ($p>0,05$) na FC após a microinjeção da Ang II e da salina na CVLM (Figura 9, painel B).

A)

PAM



B)

FC

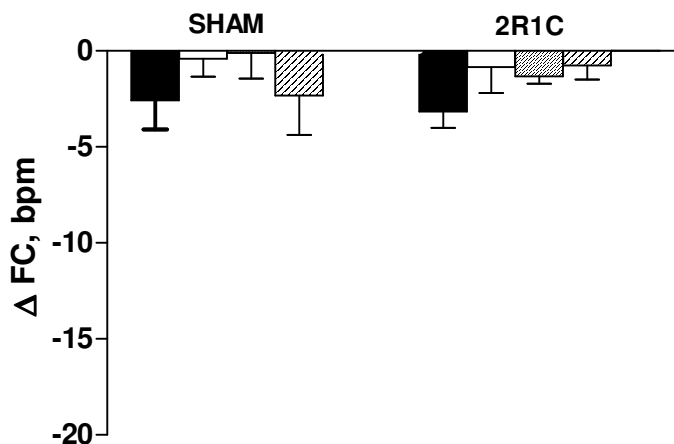


Figura 9: Efeito da microinjeção sucessiva de Ang II (40 pmol) na CVLM sobre a PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) antes e após tempos variados (5, 15 e 30 minutos) da microinjeção de salina na CVLM em ratos 2R1C (n=4) e SHAM (n=4). * $p < 0,05$ comparado com a microinjeção de Ang II microinjetada antes da salina. (One Way ANOVA seguido de teste Dunnett).

4.2.3- Estudo do bloqueio dos receptores AT1 na CVLM pelo losartan sobre microinjeções sucessivas de Ang II na CVLM sobre a PAM e FC

A figura 10 (painel A) mostra que o efeito hipotensor produzido pela microinjeção de Ang II na CVLM foi bloqueado pela microinjeção do losartan por até 30 minutos. A tabela 3 mostra os valores basais da PAM e FC dos grupos de ratos. O efeito da microinjeção de Ang II na CVLM após 5, 15 e 30 minutos da microinjeção de losartan na CVLM foi menor ($p < 0,05$) tanto nos animais 2R1C como nos SHAM. A Ang II produziu quedas da PAM antes ($-11 \pm 1,3$ mmHg) significativamente maior ($p < 0,05$) que em cinco ($-3,2 \pm 1$ mmHg), quinze ($-2 \pm 0,7$ mmHg) e trinta ($-3,5 \pm 0,5$ mmHg) minutos após a microinjeção de losartan na CVLM nos animais SHAM ($n=4-6$). Não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) na FC após a microinjeção sucessiva de Ang II e do losartan na CVLM (Figura 10, painel B).

Da mesma forma como observado nos animais SHAM, nos animais com hipertensão 2R1C, a Ang II produziu queda de PAM ($-10 \pm 0,9$ mmHg) maior ($p < 0,05$) que em cinco ($-2,8 \pm 1,3$ mmHg), quinze ($-2,1 \pm 0,6$ mmHg) e trinta ($-1,8 \pm 1,1$ mmHg) minutos após a microinjeção de losartan na CVLM nos ratos 2R1C ($n=5$) (Figura 10, painel A). Não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) na FC após as microinjeção sucessivas de Ang II na CVLM (Figura 10, painel B).

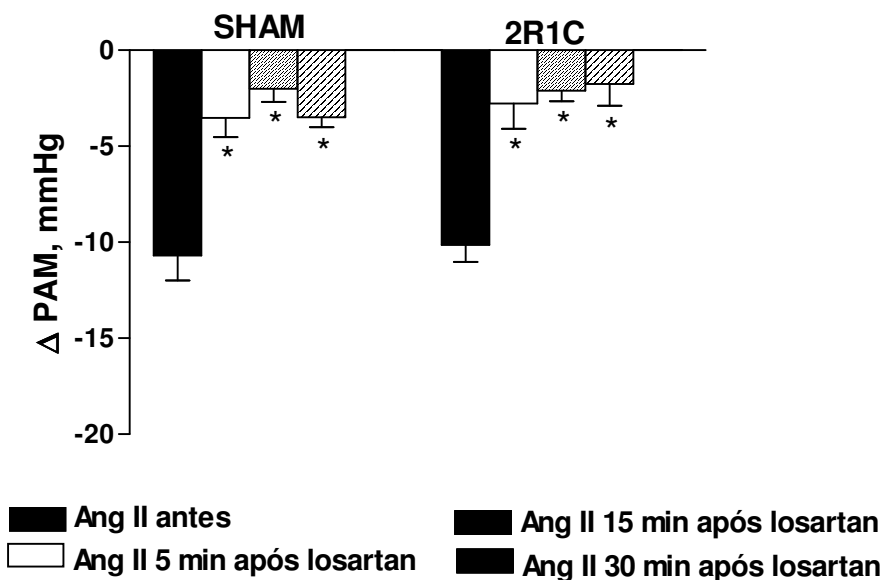
Tabela 3: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg), frequência cardíaca (FC, bpm) e alterações de PAM e FC produzidas pela microinjeção do losartan (86 pmol) sobre microinjeções sucessivas de Angiotensina II (40 pmol) na CVLM em ratos 2R1C e SHAM.

| | Valores Basais | | | | Δ FC,bpm | |
|------------------|----------------|---------|-----------|----------|-------------------|------------|
| | PAM, mmHg | | FC, bpm | | após microinjeção | |
| | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM |
| Ang II | 111 ± 13 | 108 ± 3 | 358 ± 19* | 301 ± 12 | -3,9 ± 1,4 | -3,8 ± 2,6 |
| Ang II 5' | 86 ± 11 | 99 ± 4 | 376 ± 19 | 375 ± 19 | -0,8 ± 1,3 | -0,4 ± 0,9 |
| AngII 15' | 92 ± 8 | 96 ± 6 | 377 ± 12* | 304 ± 14 | -1,3 ± 0,4 | -0,1 ± 1,3 |
| AngII 30' | 84 ± 8 | 94 ± 6 | 347 ± 16 | 305 ± 13 | -0,7 ± 0,7 | -2,3 ± 2,0 |
| n | 12 | 10 | 5 | 6 | 5 | 6 |

Valores expressos em média ± erro padrão da média. *p<0,05 comparado ao valor basal da Ang II nos respectivos grupos SHAM. (Teste “t” de Student para observações não pareadas).

A)

PAM



B)

FC



Figura 10: Efeito do bloqueio dos receptores AT1 na CVLM pelo losartan (86 pmol) sobre microinjeções sucessivas de Ang II (40 pmol) na CVLM sobre a PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) em animais com hipertensão 2R1C (n=5) e SHAM (n=4-6). * $p < 0,05$ comparado com a microinjeção de Ang II antes do losartan. (One Way ANOVA seguido de teste Dunnett).

4.2.4- Efeito da microinjeção do losartan na CVLM sobre a bradicardia reflexa

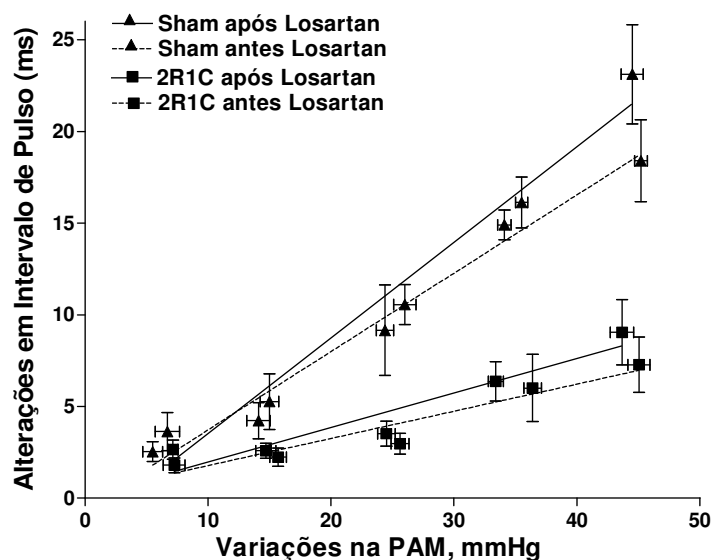
A bradicardia reflexa nos animais com hipertensão 2R1C (n=5) foi ($p < 0,05$) menor ($0,15 \pm 0,02$ ms/mmHg) em relação aos animais normotensos SHAM (n=5) ($0,43 \pm 0,03$ ms/mmHg) (Figura 11 e tabela 4). No sentido de avaliarmos se essa diminuição da bradicardia reflexa nos animais hipertensos 2R1C poderia ser decorrente de alterações nos receptores AT1 na CVLM nessa patologia, investigamos se o losartan, antagonista de receptor AT1, modificaria a sensibilidade da bradicardia reflexa nos ratos 2R1C. A tabela 4 e a figura 11 mostram que a microinjeção do losartan na CVLM não produziu alterações significativas ($p > 0,05$) na bradicardia reflexa ($0,15 \pm 0,02$ ms/mmHg) em relação a bradicardia antes da microinjeção na CVLM deste antagonista ($0,18 \pm 0,04$ ms/mmHg) nos ratos hipertensos 2R1C (n=7-8). Semelhante aos animais 2R1C, nos ratos normotensos SHAM (n=8) a microinjeção do losartan não produziu alterações significativas ($p > 0,05$) na bradicardia reflexa ($0,52 \pm 0,06$ ms/mmHg) em relação a bradicardia avaliada antes da microinjeção do losartan ($0,43 \pm 0,03$ ms/mmHg). Os valores do índice de sensibilidade da bradicardia reflexa e o índice de correlação linear r^2 estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Avaliação da bradicardia pelo Δ IP/ Δ PAM (ms/mmHg) antes e após a microinjeção do losartan em ratos SHAM e em ratos 2R1C.

| | Índice de Correlação da regressão Linear (r^2) | | Valores Basais | | | |
|------------------------|---|--------|-------------------|--------------|---------------|----------------|
| | Losartan | | Antes do losartan | | Após losartan | |
| | Antes | Após | PAM | FC | PAM | FC |
| SHAM (n=8) | 0,9837 | 0,9593 | 91 ± 6 | 314 ± 18 | 89 ± 6 | 302 ± 18 |
| 2R1C (n=7-8) | 0,9272 | 0,8781 | 112 ± 9 | 337 ± 21 | 97 ± 8 | $357 \pm 14^*$ |

Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado com animais normotensos (teste “t” de Student para observações não pareadas).

A)



B)

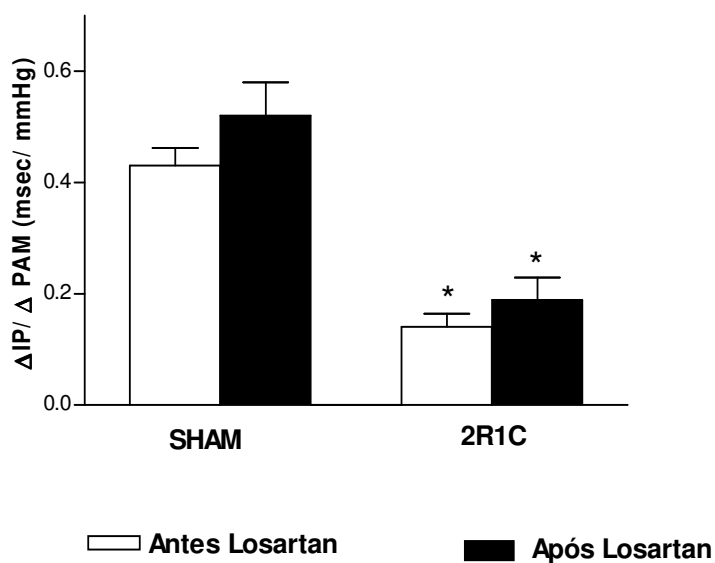


Figura 11: Alterações reflexas na FC (expressas em IP, ms) em resposta a variações na PAM (mmHg) produzidas por doses crescentes de fenilefrina (0,25 a 5 μ g, iv) antes e após a microinjeção do losartan em ratos 2R1C (n=7-8) e SHAM (n=8). Painel A: as linhas representam a reta de melhor ajuste obtida por regressão linear. Painel B: slope da sensibilidade da bradicardia reflexa $\Delta IP / \Delta PAM$ (ms/ mmHg) antes e após a microinjeção do losartan. * $p < 0,05$ comparado com animais normotensos. (One Way ANOVA seguido de Newman-Keuls).

4.3- Efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de Ang-(1-7) na CVLM de ratos 2R1C e SHAM

4.3.1-Efeito da microinjeção de Ang-(1-7) e A-779 na CVLM sobre a PAM e FC

A figura 12 (painel A) mostra o efeito hipotensor produzido pela microinjeção de Ang-(1-7) (40 pmol), A-779 (50 pmol) e salina (100 nl) na CVLM. O efeito hipotensor produzido pela microinjeção de Ang-(1-7) na CVLM ($-13,9 \pm 1,9$ mmHg; n=7) foi maior ($p < 0,05$) que o efeito produzido pela microinjeção da salina (100 nl) ($-2,7 \pm 0,6$ mmHg, n=5) nos animais 2R1C. Nos animais SHAM o efeito hipotensor produzido pela microinjeção de Ang-(1-7) na CVLM ($-13,5 \pm 2,2$ mmHg, n=8) foi maior ($p < 0,05$) que o efeito produzido pela microinjeção da salina (100 nl) ($-1,9 \pm 0,6$ mmHg, n=5).

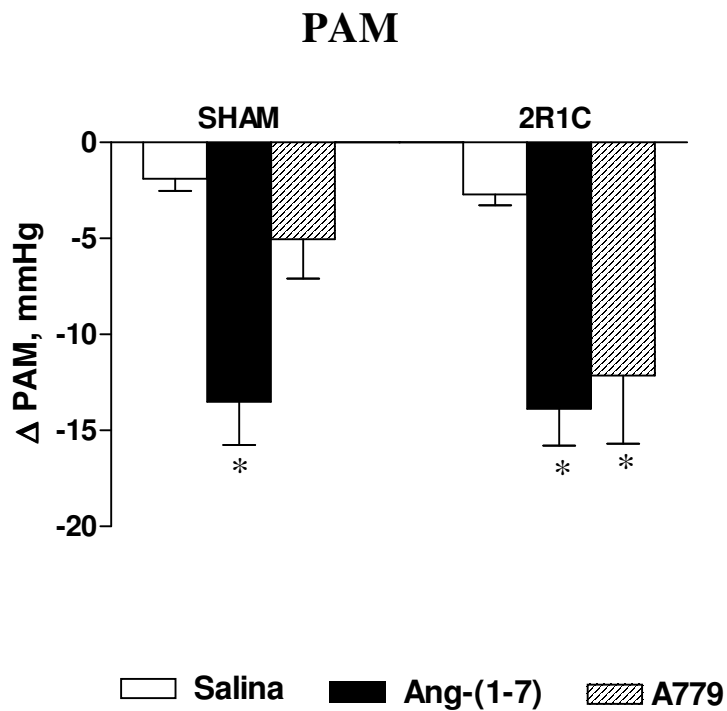
Nos animais com hipertensão 2R1C, o efeito hipotensor produzido pela microinjeção do A-779 ($-12,1 \pm 3,5$ mmHg, n=6) na CVLM foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) que o efeito produzido pela microinjeção da salina ($-2,7 \pm 0,6$ mmHg, n=5). Entretanto a microinjeção do A-779 (50 pmol) na CVLM produziu uma hipotensão ($-5,0 \pm 2,0$ mmHg, n=8) similar ($p > 0,05$) a induzida pela microinjeção de salina ($-1,9 \pm 0,6$ mmHg, n=5) nos ratos SHAM. Não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) na FC após a microinjeção da Ang-(1-7), do A-779 e da salina na CVLM em ambos os grupos de ratos 2R1C (n=5-7) e SHAM (n=5-8) (Figura 12, painel B e tabela 5).

Tabela 5: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) e alterações de FC produzidas pela microinjeção de Ang-(1-7) (40 pmol), A-779 (50 pmol) e salina (100nl) na CVLM em ratos 2R1C e SHAM

| | Valores Basais | | | | Δ FC,bpm | |
|-----------------------------|----------------|---------|----------|----------|-------------------|------------|
| | PAM, mmHg | | FC, bpm | | após microinjeção | |
| | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM |
| Ang-(1-7) (n=7-8) | 122 ± 8* | 105 ± 3 | 320 ± 11 | 318 ± 13 | -6,8 ± 1,9 | -5,3 ± 2,2 |
| Losartan (n=6-8) | 107 ± 11 | 92 ± 5 | 313 ± 17 | 300 ± 12 | -3,6 ± 1,9 | -3,6 ± 3,0 |
| Salina (n=5) | 104 ± 11 | 94 ± 8 | 305 ± 15 | 310 ± 11 | -1,0 ± 2,1 | -2,1 ± 1,6 |

Valores expressos em média ± erro padrão da média. *p<0,05 comparado ao valor basal do respectivo grupo SHAM (teste “t” de Student para observações não pareadas).

A)



B)

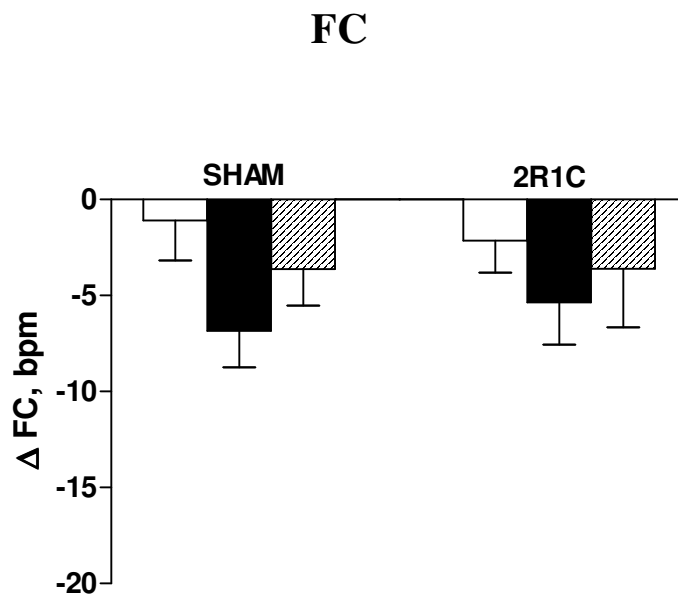


Figura 12: Efeito da Microinjeção de Ang-(1-7) (40 pmol), A-779 (50 pmol) e Salina (100 nl) na CVLM sobre a PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) em ratos 2R1C (n=5-7) e SHAM (n=5-8). * $p < 0,05$ comparado com a microinjeção de salina (One Way ANOVA seguido Dunnett).

4.3.2- Estudo do efeito do A-779 na CVLM sobre microinjeções sucessivas de Ang-(1-7) na CVLM sobre a PAM e FC

Na figura 13 observa-se que o efeito hipotensor produzido pela microinjeção de Ang-(1-7) (40 pmol) na CVLM foi bloqueado pela microinjeção do A-779 (50 pmol) por até 30 minutos. O efeito da microinjeção de Ang-(1-7) na CVLM após 5, 15 e 30 minutos após a microinjeção de A-779 na CVLM foi menor tanto nos animais 2R1C como nos SHAM (Figura 13, painel A). A Ang-(1-7) produziu queda da PAM ($-13,5 \pm 2,2$ mmHg, n=8) maior ($p < 0,05$) que em cinco ($-3,9 \pm 1,6$ mmHg, n=8), quinze ($-2,4 \pm 0,8$ mmHg, n=8) e trinta ($-6,6 \pm 2,0$ mmHg, n=8) minutos após a microinjeção de A-779 CVLM nos animais SHAM (n=8). Não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) na FC após a microinjeção do peptídeo e da salina na CVLM (Figura 9, painel B e tabela 6).

Da mesma forma como observada nos animais SHAM, nos animais com hipertensão 2R1C, a Ang-(1-7) produziu queda de PAM ($-13,9 \pm 1,9$ mmHg, n=8) maior ($p < 0,05$) que em cinco ($-2,9 \pm 1,5$ mmHg, n=8), quinze ($-2,8 \pm 0,7$ mmHg, n=7) e trinta ($-4,7 \pm 2,5$ mmHg, n=6) minutos após a microinjeção de A-779 na CVLM nos ratos 2R1C (n=8) (Figura 9, painel A). Não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) na FC após a microinjeção do peptídeo ou da salina na CVLM (Figura 13, painel B e tabela 6).

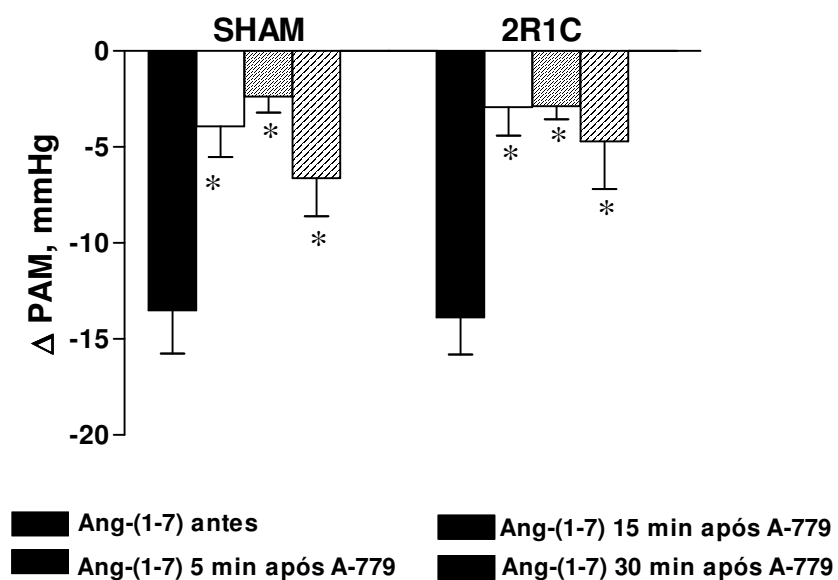
Tabela 6: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg), frequência cardíaca (FC, bpm) e alterações de PAM e FC produzidas pela microinjeção do A-779 (50 pmol) sobre microinjeções sucessivas de Ang-(1-7) (40 pmol) na CVLM em ratos 2R1C e SHAM.

| | Valores Basais | | | | Δ FC, bpm | |
|----------------------|----------------|---------|----------|----------|-------------------|-------------|
| | PAM, mmHg | | FC, bpm | | após microinjeção | |
| | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM |
| Ang -(1-7) | 122 ± 8* | 105 ± 3 | 320 ± 11 | 317 ± 13 | -6,8 ± 1,9 | -5,3 ± 2,2 |
| Ang -(1-7) 5' | 103 ± 13 | 97 ± 6 | 314 ± 18 | 308 ± 22 | -4,3 ± 3,8 | -0,9 ± 0,9 |
| Ang-(1-7) 15' | 99 ± 13 | 91 ± 6 | 317 ± 16 | 301 ± 14 | -3,1 ± 2,0 | -3,5 ± 1,6 |
| Ang-(1-7) 30' | 96 ± 17 | 90 ± 9 | 291 ± 17 | 317 ± 13 | -7,3 ± 2,7 | -10,1 ± 5,7 |
| n | 6-7 | 8 | 6-7 | 8 | 6-7 | 8 |

Valores expressos em média ± erro padrão da média.. *p<0,05 comparado ao valor basal dos respectivos grupos SHAM (teste “t” de Student para observações não pareadas).

A)

PAM



B)

FC

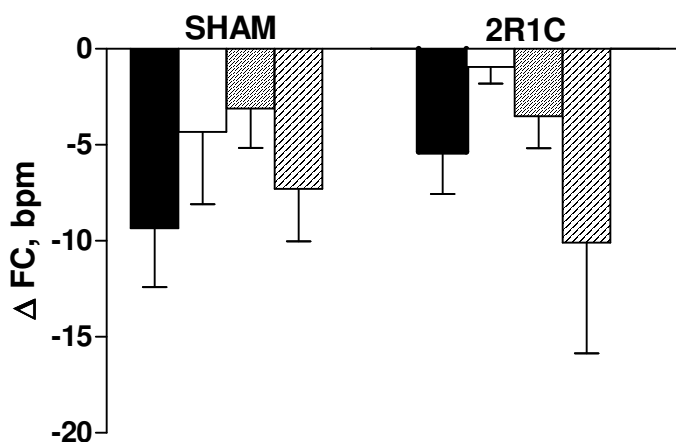


Figura 13: Efeito do efeito do A-779 (50 pmol) na CVLM sobre microinjeções sucessivas de Ang-(1-7) (40 pmol) na CVLM sobre a PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) em animais com 2R1C (n= 6-7) e SHAM (n= 8). *p<0,05 comparado com a microinjeção da Ang-(1-7) antes do A-779 (One Way ANOVA seguido pelo Dunet).

4.3.3- Efeito da microinjeção do A-779 na CVLM sobre a bradicardia reflexa

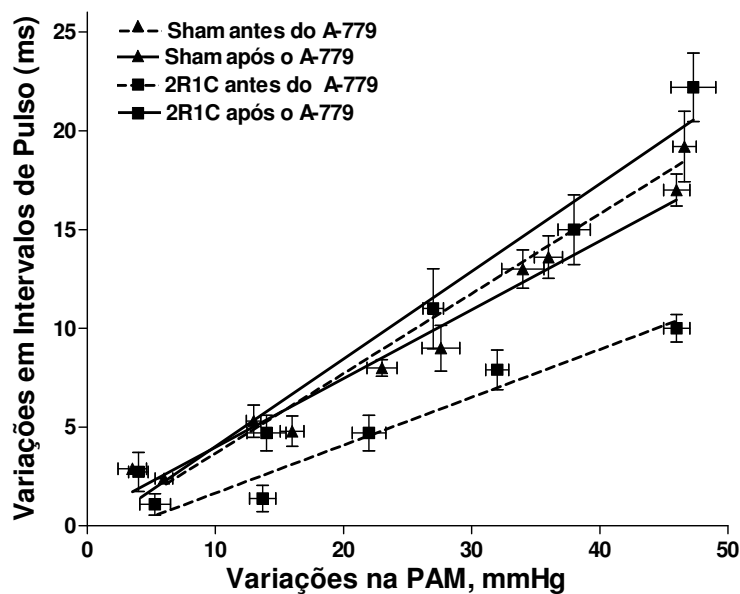
Da mesma forma observada nos estudos com Ang II e Losartan, a bradicardia reflexa nos animais com hipertensão 2R1C ($0,24 \pm 0,03$ ms/ mmHg) foi menor ($p < 0,05$) em relação aos animais SHAM ($0,40 \pm 0,02$ ms/ mmHg) (Figura 14, painel A e B). No sentido de avaliarmos se essa diminuição da bradicardia reflexa nos animais hipertensos 2R1C poderia ser decorrente de alterações nos receptores MAS para Ang-(1-7) na CVLM, investigamos se o antagonista específico de receptor MAS, A-779, modificaria a sensibilidade da bradicardia reflexa nos ratos 2R1C. A tabela 7 e a figura 14 mostram que a microinjeção do A-779 (40 pmol) não produziu alterações significativas na bradicardia reflexa ($0,35 \pm 0,04$ ms/ mmHg) em relação a bradicardia antes da microinjeção do A-779 ($0,40 \pm 0,02$ ms/ mmHg) nos animais normotensos SHAM. Já nos animais com hipertensão 2R1C a microinjeção do A-779 produziu uma melhora ($p < 0,05$) da sensibilidade da bradicardia reflexa ($0,44 \pm 0,04$ ms/ mmHg) em relação a bradicardia antes da microinjeção do A-779 ($0,24 \pm 0,03$ ms/ mmHg).

Tabela 7: Avaliação da bradicardia pelo Δ IP/ Δ PAM (ms/ mmHg) antes e após a microinjeção do A-779 (50 pmol) em ratos 2R1C e SHAM

| | Índice de Correlação da regressão Linear (r^2) | | Valores Basais | | | |
|----------------------|---|--------|----------------|--------|------------|--------|
| | A-779 | | Antes do A-779 | | Após A-779 | |
| | Antes | Após | PAM | FC | PAM | FC |
| SHAM (n=7) | 0,9888 | 0,9636 | 91± 3 | 312±11 | 93 ± 6 | 310±19 |
| 2R1C (n=7) | 0,9564 | 0,9674 | 111 ± 8 | 308±15 | 100±13 | 308±22 |

Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado com animais SHAM. Teste “t” de Student para observações não pareadas).

A)



B)

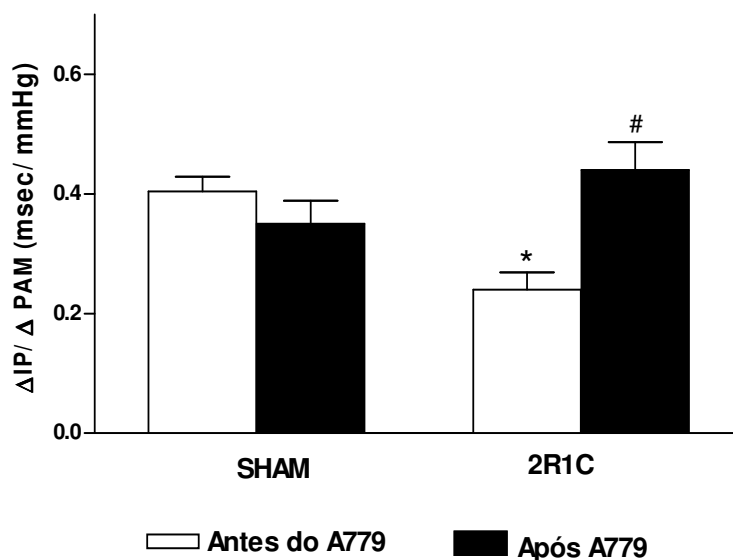


Figura 14: Alterações reflexas na FC (expressas em IP, ms) em resposta a variações na PAM (mmHg) produzidas por doses crescentes de fenilefrina (0,25 a 5 μ g, iv) antes e após a microinjeção do losartan em ratos 2R1C (n=7) e SHAM (n=7). Painel A: as linhas representam a reta de melhor ajuste obtida por regressão linear. Painel B: slope da sensibilidade da bradicardia reflexa $\Delta IP / \Delta PAM$ (ms/ mmHg) antes e após a microinjeção do losartan. *p<0,05 comparado com animais SHAM. #p<0,05 comparado com a bradicardia antes do A-779. (One Way ANOVA seguido de Newman-Keuls ou teste “t” de Student para observações pareadas e não pareadas).

4.4-Análise histológica

A figura 15 apresenta esquemas de cortes frontais do atlas de Paxinos e Watson (1986) ilustrando a localização das microinjeções na CVLM determinada pela lesão provocada pela micropipeta de vidro. A análise dos cortes histológicos dos animais desse estudo mostra que as microinjeções das angiotensinas e dos antagonistas angiotensinérgicos estavam localizadas na porção ventral do núcleo reticular lateral.

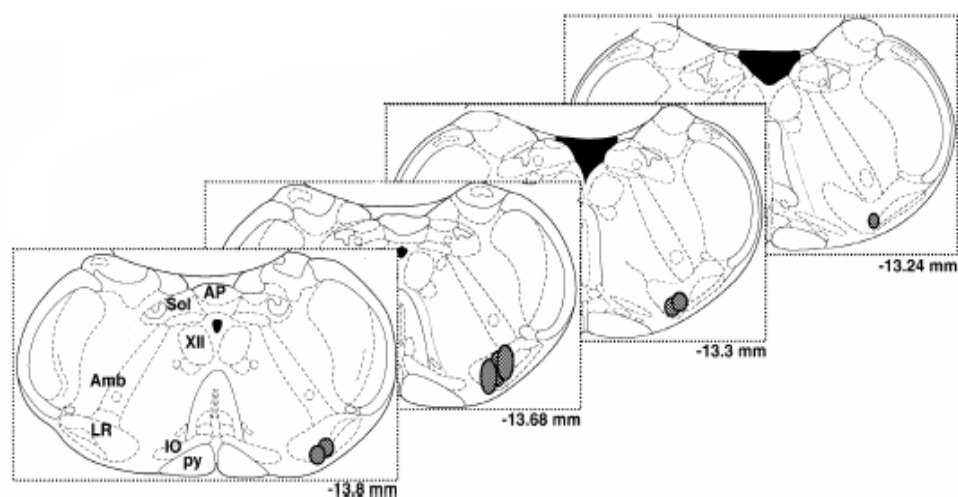


Figura 15: Esquemas de cortes frontais do bulbo extraídos do atlas de Paxinos e Watson, 1986. A área marcada à direita mostra uma composição da localização das microinjeções na CVLM. SOL: núcleo do trato solitário, AMB: núcleo ambíguo, AP: área postrema XII: núcleo olivar superior, LR: núcleo reticular lateral, IO: núcleo olivar superior, PY: trato piramidal.

4.5 - Avaliação dos efeitos cardiovasculares de animais submetidos a microinjeção de angiotensinas e antagonistas angiotensinérgicos na RVLM

4.5.1- Avaliação do peso seco dos rins de ratos 2R1C e ratos SHAM

Com o mesmo intuito dos estudos na CVLM com ratos hipertensos 2R1C em que foi avaliado o peso dos rins como um parâmetro para confirmar a eficiência para o desenvolvimento da hipertensão renovascular, os dados abaixo confirmam a estenose da artéria renal clipada nos estudos na RVLM.

A figura 16 mostra que o peso seco do rim esquerdo (rim clipado) dos ratos 2R1C foi ($0,067 \pm 0,004$ g, n=19) menor ($p < 0,0001$) comparado ao rim esquerdo dos ratos normotensos ($0,079 \pm 0,002$ g, n=11). Em relação aos rins direito, o rim do animal clipado foi ($0,102 \pm 0,003$ g, n=19) maior ($p < 0,0001$) comparado ao rim direito dos ratos normotensos ($0,079 \pm 0,003$ g, n=11).

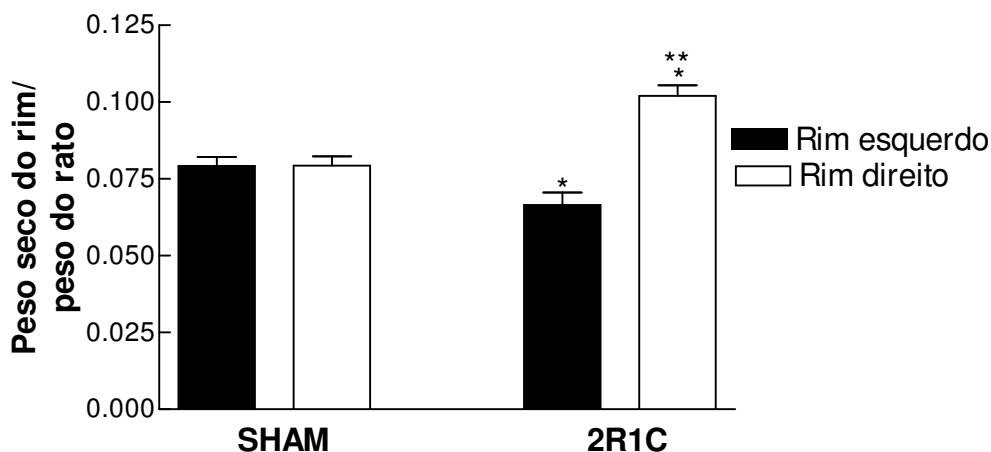


Figura 16: Comparação entre o peso dos rins direito e esquerdo clipado de animais com hipertensão 2R1C (n=17) e SHAM (n=11). * $p < 0,05$ comparado com o rim esquerdo dos animais normotensos. ** $p < 0,05$ comparado com o rim direito dos animais normotensos (teste “t” de Student para observações não pareadas).

Da mesma forma nos estudos da CVLM, também avaliamos o percentual de redução do rim esquerdo (clipado) em relação ao rim direito (não clipado). Como mostra a figura 17 e a tabela 8, os ratos 2R1C apresentaram o percentual de redução do rim esquerdo (clipado) em relação ao rim direito maior ($p < 0,0001$) em comparação à relação do percentual de redução dos rins dos animais SHAM.

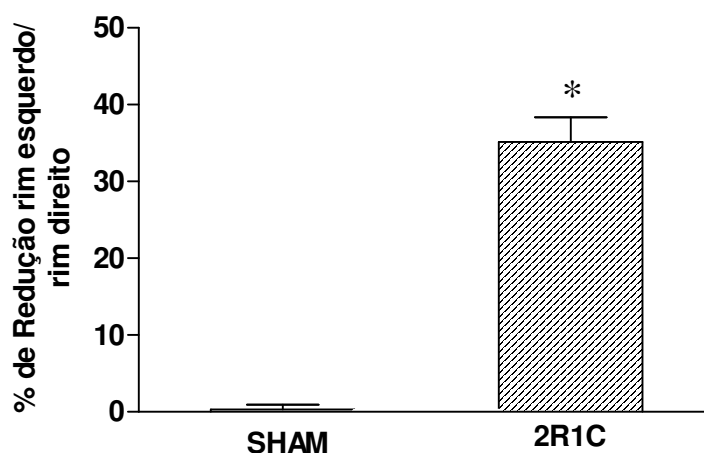


Figura 17: Avaliação da porcentagem (%) de redução do peso seco do rim esquerdo (clipado) [(g/100g de peso corporal) (rim esquerdo/ rim direito x 100 -100)] de ratos 2R1C (n=19) e SHAM (n=11). * $p < 0,05$ comparado com os animais SHAM (teste “t” de Student para observações não pareadas).

Tabela 8: Valores da porcentagem (%) de redução do peso seco do rim esquerdo (clipado) [(g/100g de peso corporal) (rim esquerdo/ rim direito x 100-100)]

| | % de Redução | n |
|------|---------------|----|
| SHAM | 0,29 ± 0,63 | 11 |
| 2R1C | 35,16 ± 3,2 * | 19 |

Valores expressos em média ± erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado com os animais normotensos (teste “t” de Student para observações não pareadas).

4.5.2- Avaliação da PAM e FC em ratos 2R1C e SHAM

Os níveis basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de animais hipertensos 2R1C e normotensos SHAM estão representados na figura 18 e 19. Na figura 18, observa-se traçados típicos de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), FC e PAM de ratos 2R1C e SHAM. Como mostrado na figura 19, os ratos 2R1C apresentaram aumento ($p < 0,0001$) no valor basal de PAM (138 ± 4 mmHg, $n=19$) em relação aos ratos SHAM (96 ± 3 mmHg, $n=11$). Não foram observadas alterações ($p > 0,05$) da FC no grupo de hipertensos (394 ± 11 bpm, $n=19$) em relação ao grupo normotenso (366 ± 10 bpm, $n=11$).

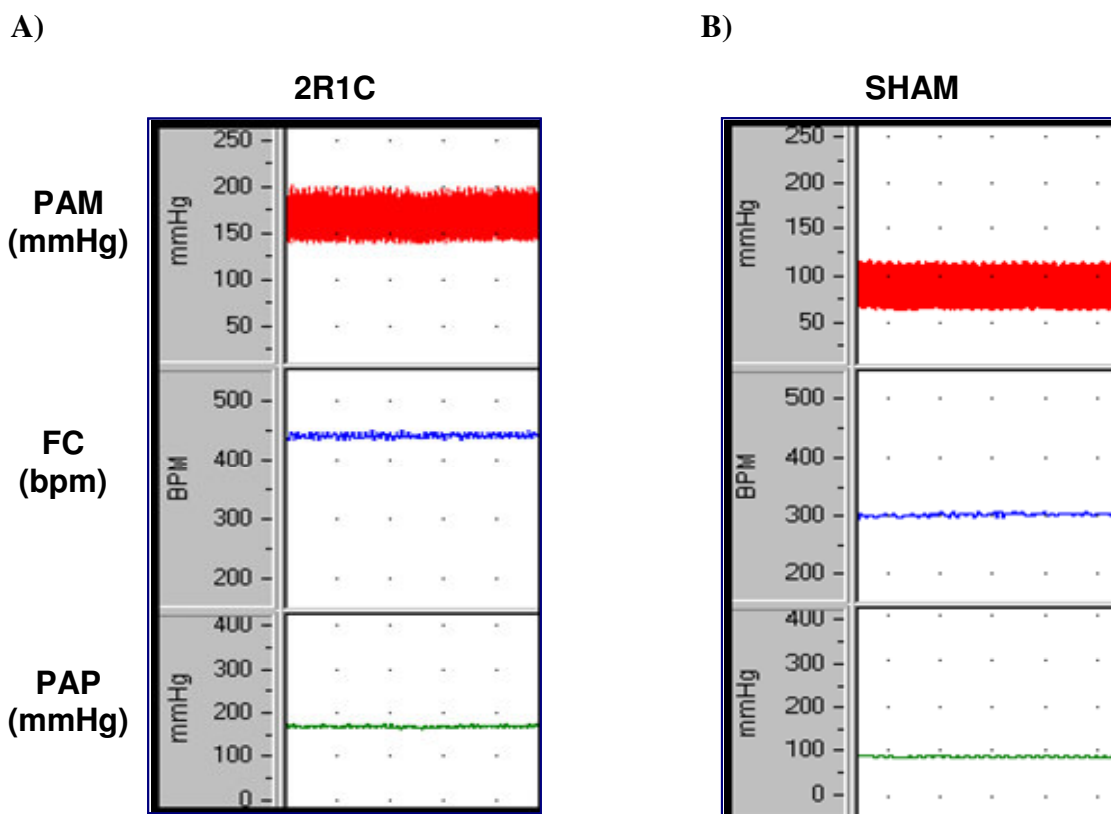
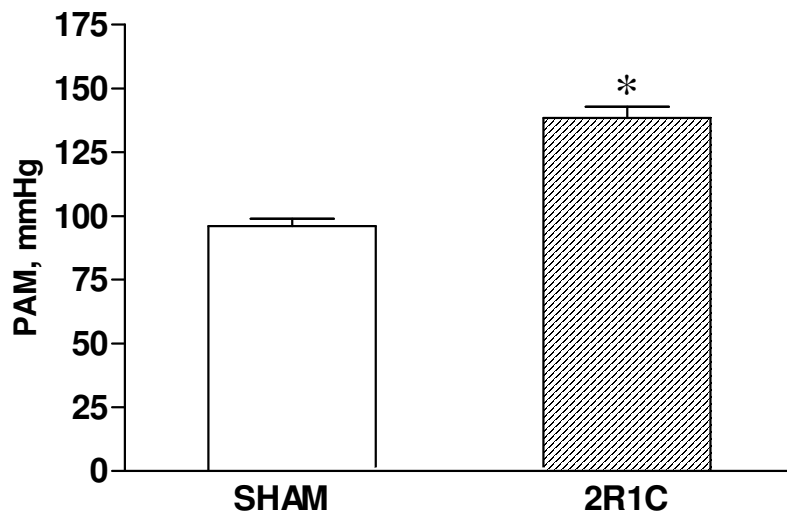


Figura 18: Registro da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), frequência cardíaca (FC, bpm) e da pressão arterial média (PAM, mmHg), típico de um rato 2R1C (A) e um rato SHAM (B).

A)

PAM



B)

FC

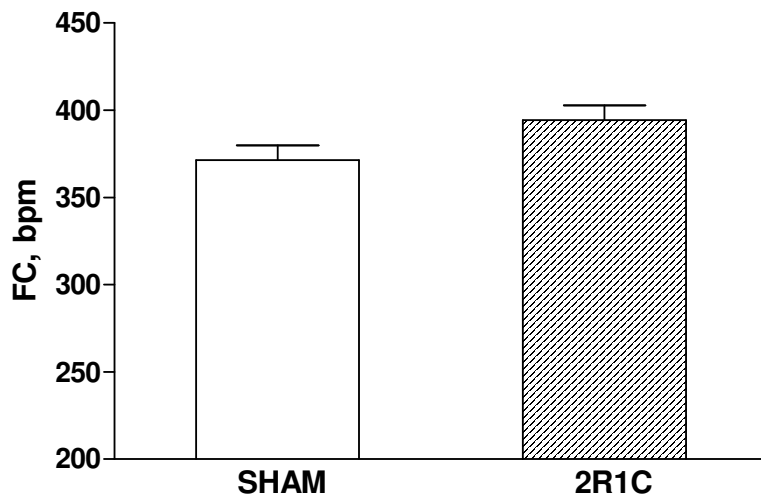


Figura 19: Pressão Arterial Média (PAM, mmHg; painel A) e Frequência Cardíaca (FC, bpm; painel B) em ratos com hipertensão 2R1C (n=17) e ratos SHAM (n=11). * $p < 0,05$ comparado com animais SHAM (teste “t” de Student para observações não pareadas).

4.6- Efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de Ang II na RVLM de ratos 2R1C e SHAM

4.6.1- Efeito da microinjeção de Ang II e losartan na RVLM sobre a PAM e FC

A figura 20 (painel A) e a tabela 9 mostram o efeito pressor produzido pela microinjeção de Ang II (40 pmol), losartan (86 pmol) e salina (100 nl) na RVLM. O efeito pressor produzido pela microinjeção de Ang II na RVLM foi maior ($p < 0,05$) que o efeito produzido pela microinjeção da salina (100 nl) nos animais 2R1C ($22,4 \pm 2,6$ mmHg em comparação à $5,1 \pm 0,8$ mmHg, grupo salina; $n=14$) e nos animais SHAM ($11,4 \pm 1,2$ mmHg em comparação à $3,4 \pm 0,9$ mmHg, grupo salina; $n=7$). O efeito pressor produzido pela microinjeção de Ang II, na RVLM, foi maior ($p < 0,05$) nos animais 2R1C ($22,4 \pm 2,6$ mmHg, $n=14$) comparado aos animais SHAM ($11,4 \pm 1,2$ mmHg, $n=7$). A microinjeção do antagonista de receptor AT1, losartan, na RVLM produziu um efeito pressor maior ($p < 0,05$) que o produzido pela microinjeção de salina tanto nos ratos 2R1C ($14 \pm 3,4$ mmHg em comparação à $5,1 \pm 0,8$ mmHg, grupo salina; $n=14$) como nos SHAM ($13,4 \pm 4,7$ mmHg em comparação à $3,4 \pm 0,9$ mmHg, grupo salina; $n=7$). Não foram observadas alterações ($p > 0,05$) na FC após a microinjeção da Ang II, do losartan e da salina na RVLM em ambos os grupos de ratos 2R1C e SHAM (Figura 20, painel B e a tabela 9).

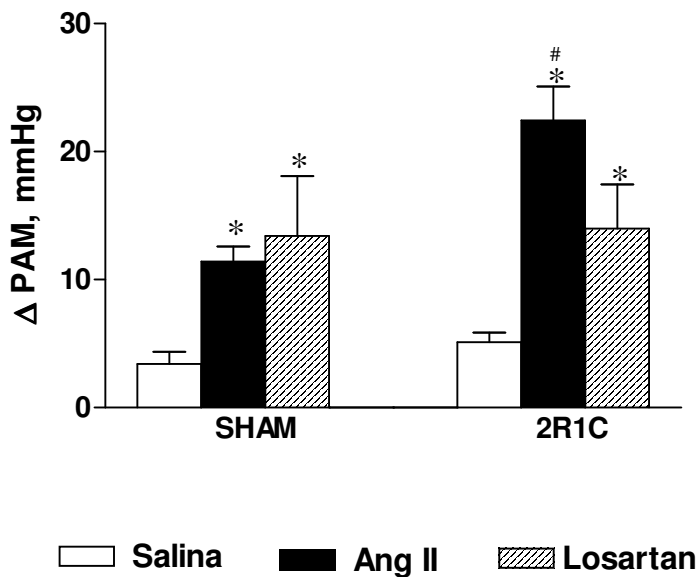
Tabela 9: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) e alterações de FC produzidas pela microinjeção de Ang II (40 pmol), losartan (86 pmol) e salina (100nl) na RVLM em ratos 2R1C e SHAM

| | Valores Basais | | | | Δ FC, bpm | |
|-----------------|----------------|------------|--------------|--------------|-------------------|----------------|
| | PAM, mmHg | | FC, bpm | | após microinjeção | |
| | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM |
| Ang II | $115 \pm 7^*$ | 84 ± 7 | 370 ± 14 | 347 ± 22 | $-2,1 \pm 2,4$ | $-3,3 \pm 4,2$ |
| Losartan | $88 \pm 9^*$ | 60 ± 4 | 351 ± 19 | 348 ± 25 | $-0,7 \pm 0,9$ | $0,03 \pm 1,8$ |
| Salina | 89 ± 9 | 61 ± 8 | 352 ± 18 | 348 ± 27 | $-0,5 \pm 0,8$ | $-0,4 \pm 0,6$ |
| n | 14 | 7 | 14 | 7 | 14 | 7 |

Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos grupos SHAM (teste “t” de Student para observações não pareadas).

A)

PAM



B)

FC

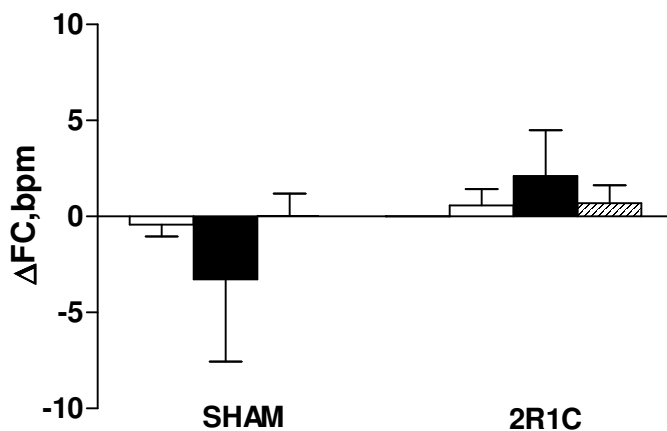


Figura 20: Efeito da microinjeção de Ang II (40 pmol), losartan (86 pmol) e salina (100 nl) na RVLm sobre a PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) em ratos 2R1C (n=10) e SHAM (n=7). *p<0,05 comparado com a microinjeção de salina. #p<0,05 comparado com os respectivos grupos SHAM. (ANOVA seguido de Dunnett e teste “t” de Student para observações não pareadas).

4.6.2- Estudo do bloqueio dos receptores AT1 na RVLM pelo losartan sobre microinjeções sucessivas de Ang II na RVLM sobre a PAM e FC

Na figura 21 observa-se que o efeito pressor produzido pela microinjeção de Ang II na RVLM foi bloqueado pela microinjeção de losartan na RVLM por até 30 minutos. Nos animais com hipertensão 2R1C, a Ang II produziu aumentos de PAM ($22,4 \pm 2,6$ mmHg, n=14) maior ($p < 0,05$) que em cinco ($5,5 \pm 0,9$ mmHg, n=14), quinze ($4,6 \pm 0,9$ mmHg, n=14) e trinta ($8,8 \pm 2,1$ mmHg, n=14) minutos após a microinjeção de losartan ($14 \pm 3,4$ mmHg) na RVLM nos ratos 2R1C (n=12), (Figura 21, painel A). Não foram observadas alterações significativas na FC após a microinjeção do peptídeo, do antagonista e da salina na RVLM (Figura 21, painel B).

Da mesma forma como observada nos animais 2R1C, nos animais SHAM a Ang II produziu efeito pressor ($11 \pm 1,3$ mmHg, n=6) maior ($p < 0,05$) que em cinco ($2,2 \pm 0,9$ mmHg, n=6), quinze ($3,7 \pm 1,7$ mmHg, n=6) e trinta ($4,4 \pm 1,5$ mmHg, n=6) minutos após a microinjeção de losartan ($11,4 \pm 5,0$ mmHg, n= 6) na RVLM nos animais SHAM. Não foram observadas alterações ($p < 0,05$) na FC após a microinjeção do peptídeo, do antagonista e da salina na RVLM (Figura 21, painel B e tabela 10).

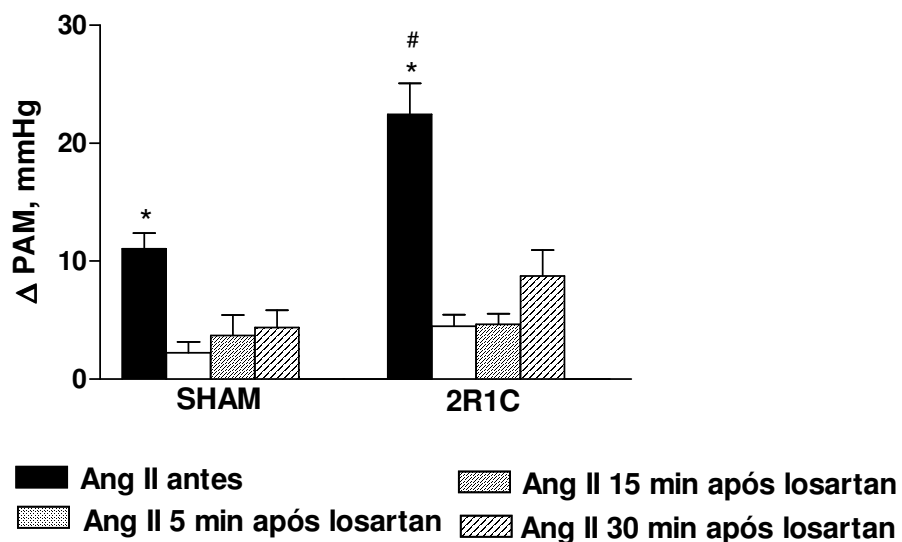
Tabela 10: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) e alterações de PAM e FC produzidas pela microinjeção do losartan (86 pmol) sobre microinjeções sucessivas de Ang II (40 pmol) na RVLM em ratos 2R1C e SHAM

| | Valores Basais | | Valores Basais | | Após microinjeção | |
|------------------|----------------|------------|----------------|--------------|-------------------|----------------|
| | PAM, mmHg | | FC, bpm | | Δ FC, bpm | |
| | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM |
| Ang II | 115 \pm 7* | 82 \pm 8 | 370 \pm 14 | 340 \pm 25 | -2,1 \pm 2,4 | -4,2 \pm 4,9 |
| Ang II 5' | 85 \pm 9* | 53 \pm 7 | 350 \pm 19 | 327 \pm 32 | -0,2 \pm 0,8 | 0,1 \pm 0,6 |
| AngII 15' | 80 \pm 7* | 45 \pm 5 | 358 \pm 18 | 325 \pm 27 | -0,2 \pm 0,6 | -0,2 \pm 0,4 |
| AngII 30' | 67 \pm 8* | 38 \pm 4 | 343 \pm 18 | 282 \pm 24 | 0,6 \pm 0,8 | 3,4 \pm 2,2 |
| n | 14 | 6 | 14 | 6 | 14 | 6 |

Valores expressos em média \pm erro padrão da média. *p<0,05 comparado aos respectivos grupos SHAM (teste “t” de Student para observações não pareadas).

A)

PAM



B)

FC

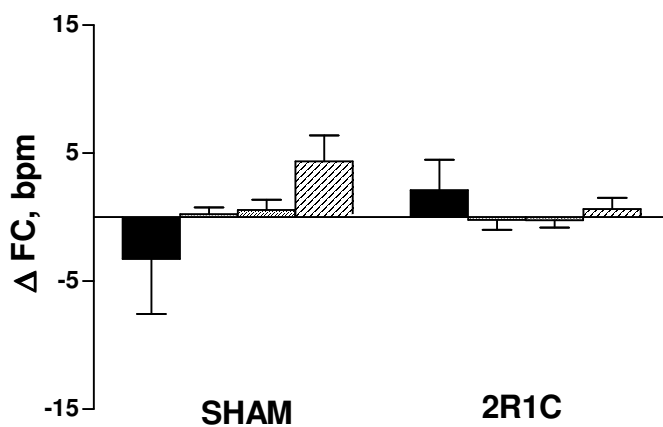


Figura 21: Efeito do bloqueio dos receptores AT1 na CVLM pelo losartan (86 pmol) sobre microinjeções sucessivas de Ang II (40 pmol) na RVLM sobre a PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) em animais com hipertensão 2R1C (n=14) e animais normotensos (n=6). *p<0,05 comparado com a microinjeção de Ang II antes do losartan. #p<0,05 comparado com animais SHAM (One Way ANOVA seguido de teste Dunnett).

4.7- Efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de Ang-(1-7) na RVLM de ratos 2R1C e SHAM

4.7.1- Efeito da microinjeção de Ang-(1-7) e A-779 na RVLM sobre a PAM e FC

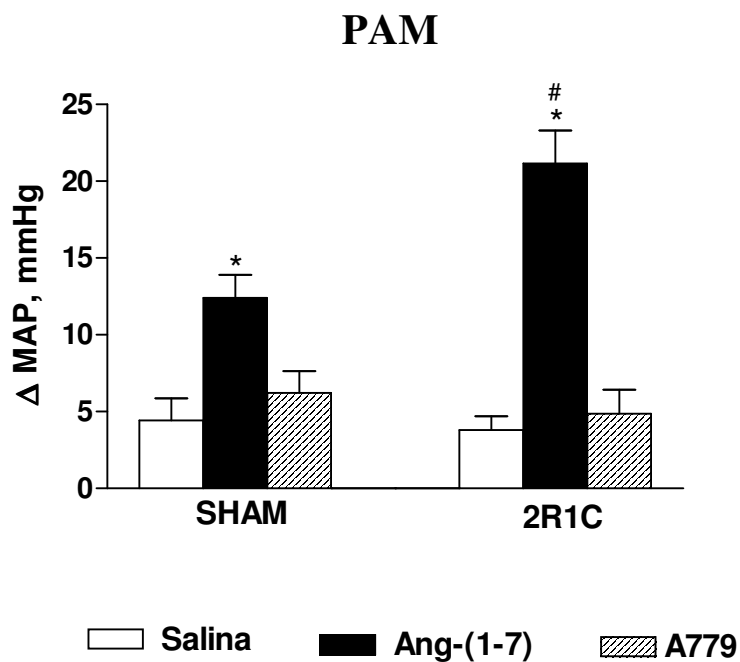
A figura 23 (painel A) e a tabela 11 mostram o efeito pressor produzido pela microinjeção de Ang-(1-7) (40 pmol), A-779 (50 pmol) e salina (100 nl) na RVLM. O efeito pressor produzido pela microinjeção de Ang-(1-7) na RVLM foi maior ($p < 0,05$) que o efeito produzido pela microinjeção da salina nos animais 2R1C ($21,2 \pm 2,1$ mmHg em comparação a $3,8 \pm 0,8$ mmHg, grupo de salina; $n=5$) e nos animais SHAM ($12,4 \pm 1,5$ mmHg em comparação à $4,4 \pm 1,4$ mmHg, grupo de salina; $n=4$). A microinjeção do antagonista, A-779, na RVLM produziu um efeito similar ($p > 0,05$) ao produzido pela microinjeção de salina tanto nos ratos hipertensos ($4,9 \pm 1,6$ mmHg em comparação à $3,8 \pm 0,8$ mmHg, grupo de salina; $n=5$) como nos SHAM ($6,2 \pm 1,4$ mmHg em comparação à $4,4 \pm 1,4$ mmHg, grupo de salina; $n=4$). O efeito pressor produzido pela microinjeção de Ang-(1-7) na RVLM, foi maior ($p < 0,05$) nos animais 2R1C ($21,2 \pm 2,1$ mmHg, $n=5$) em relação aos animais SHAM ($12,4 \pm 1,5$ mmHg). Não foram observadas alterações ($p > 0,05$) na FC após a microinjeção da Ang-(1-7), do A-779 e da salina na RVLM em ambos os grupos de ratos 2R1C ($n=5$) e SHAM ($n=4$) (Figura 23, painel B e tabela 11).

Tabela 11: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) e alterações de FC produzidas pela microinjeção de Ang-(1-7) (40 pmol), A-779 (50 pmol) e salina (100 nl) na RVLM em animais hipertensão 2R1C e SHAM

| | Valores Basais | | Valores Basais | | Após microinjeção | |
|------------------|----------------|------------|----------------|--------------|-------------------|----------------|
| | PAM, mmHg | | FC, bpm | | Δ FC, bpm | |
| | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM |
| Ang-(1-7) | 113 ± 13 | 78 ± 5 | 374 ± 32 | 354 ± 16 | $0,6 \pm 5,9$ | $-3,1 \pm 3,7$ |
| A-779 | 78 ± 16 | 61 ± 7 | 336 ± 23 | 340 ± 12 | $2,0 \pm 2,0$ | $2,8 \pm 2,3$ |
| Salina | 83 ± 17 | 62 ± 7 | 340 ± 26 | 340 ± 9 | $2,2 \pm 1,0$ | $3,1 \pm 2,2$ |
| n | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 |

Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado ao valor basal do respectivo grupo SHAM (teste “t” de Student para observações não pareadas).

A)



B)

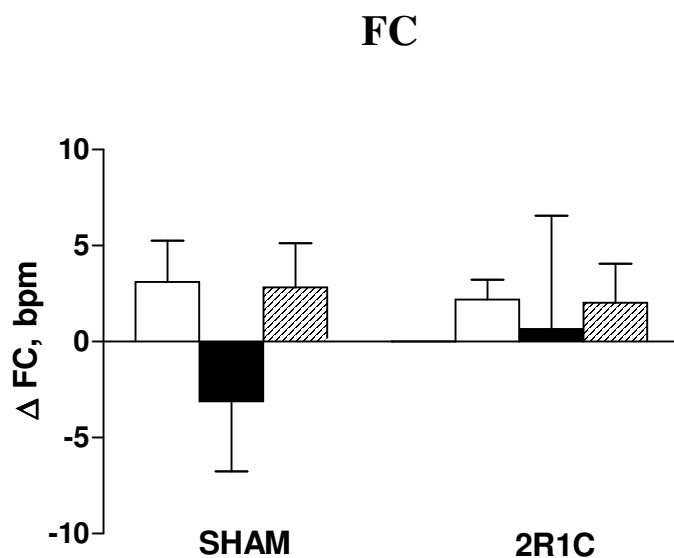


Figura 22: Efeito da Microinjeção de Ang-(1-7) (40 pmol), A-779 (50 pmol) e Salina (100 nl) na RVLM sobre a PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) em ratos 2R1C (n=5) e SHAM (n=4). *p<0,05 comparado com a microinjeção de salina. #p<0,05 comparado com animais SHAM (One Way ANOVA seguido de teste Newman-Keuls).

4.7.2- Estudo do efeito do A-779 na RVLM sobre microinjeções sucessivas de Ang-(1-7) na RVLM sobre a PAM e FC

Na figura 23, observa-se que o efeito pressor produzido pela microinjeção de Ang-(1-7) (40 pmol) na RVLM foi bloqueado pela microinjeção do A-779 (50 pmol) por até 30 minutos tanto nos ratos 2R1C como nos ratos SHAM. A microinjeção de Ang-(1-7) produziu efeito pressor maior ($p < 0,05$) ($21,2 \pm 2,1$ mmHg) que em cinco ($3,9 \pm 0,9$ mmHg), quinze ($3,2 \pm 1,3$ mmHg) e trinta ($4,2 \pm 1,9$ mmHg) minutos após a microinjeção de A-779 na RVLM nos ratos 2R1C ($n=5$) (Figura 23, painel A e tabela 12). Não foram observadas alterações significativas na FC após a microinjeção do peptídeo, do antagonista e da salina na RVLM (Figura 23, painel B e tabela 12).

Da mesma forma como observada nos animais 2R1C, nos animais SHAM, a microinjeção de Ang-(1-7) na RVLM produziu efeito pressor maior ($p < 0,05$) ($12,4 \pm 1,5$ mmHg) que cinco ($3,7 \pm 1,3$ mmHg), quinze ($4,1 \pm 1,3$ mmHg) e trinta ($5,2 \pm 1,8$ mmHg) minutos após a microinjeção de A-779 na RVLM nos animais SHAM ($n=4$) (Figura 23, painel A e tabela 12). Não foram observadas alterações significativas na FC após a microinjeção do peptídeo, do antagonista e da salina na RVLM (Figura 23, painel B e tabela 12).

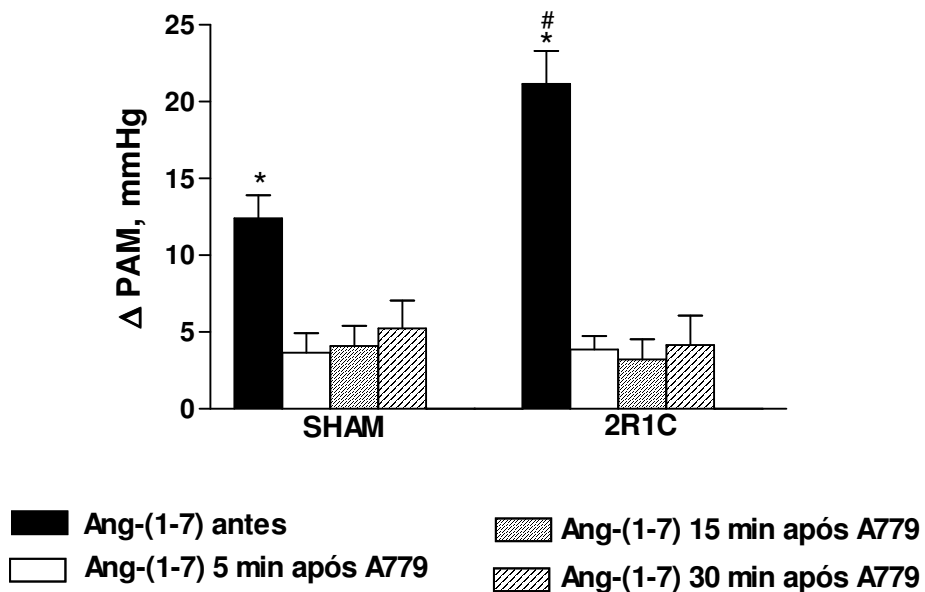
Tabela 12: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) e alterações de FC produzidas pela microinjeção do A-779 (50 pmol) sobre microinjeções sucessivas de Ang-(1-7) na RVLM em ratos 2R1C e SHAM

| | Valores Basais | | Valores Basais | | Após microinjeção | |
|----------------------|----------------|---------|----------------|----------|-------------------|------------|
| | PAM,mmHg | | FC,bpm | | ΔFC,bpm | |
| | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM | 2R1C | SHAM |
| Ang -(1-7) | 113 ± 13 | 78 ± 5 | 374 ± 32 | 354 ± 16 | 0,6 ± 5,9 | -3,1 ± 3,7 |
| Ang -(1-7) 5' | 76 ± 14 | 69 ± 10 | 347 ± 20 | 346 ± 13 | 2,0 ± 1,0 | 0,6 ± 1,7 |
| Ang-(1-7) 15' | 51 ± 12 | 57 ± 7 | 377 ± 18 | 337 ± 10 | 1,2 ± 1,5 | 2,2 ± 1,4 |
| Ang-(1-7) 30' | 40 ± 8 | 45 ± 5 | 345 ± 27 | 310 ± 11 | 0,1 ± 0,9 | 3,3 ± 2,3 |
| n | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 |

Valores expressos em média ± erro padrão da média. *p<0,05 comparado aos respectivos grupos SHAM (teste “t” de Student para observações não pareadas).

A)

PAM



B)

FC

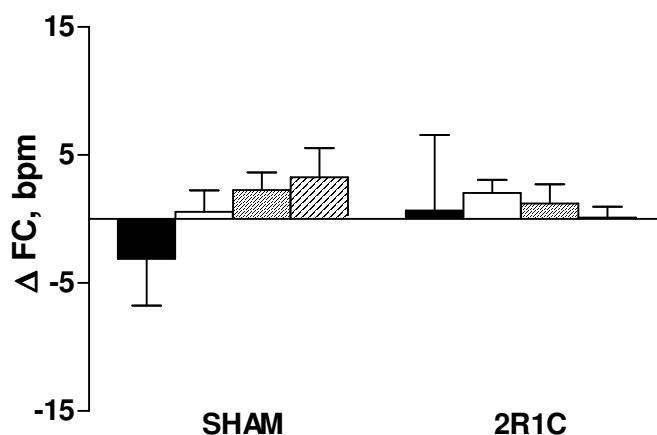


Figura 23: Efeito do A-779 (50 pmol) na RVLM sobre microinjeções sucessivas de Ang-(1-7) (40 pmol) na CVLM sobre a PAM (mmHg, painel A) e FC (bpm, painel B) em animais com hipertensão 2R1C (n=7) e animais normotensos SHAM (n=5). *p<0,05 comparado com a microinjeção da Ang-(1-7) antes do A-779. #p<0,05 comparado com animais SHAM (One Way ANOVA seguido de teste Newman-Keuls).

4.8-Análise histológica

A figura 24 apresenta esquemas de cortes frontais do atlas de Paxinos e Watson (1986) ilustrando a localização das microinjeções na RVLM determinadas pela lesão provocada pela micropipeta de vidro. A análise dos cortes histológicos dos animais desse estudo mostra que as microinjeções das angiotensinas e dos antagonistas angiotensinérgicos estavam localizadas na porção ventral do núcleo paragigantocelular lateral.

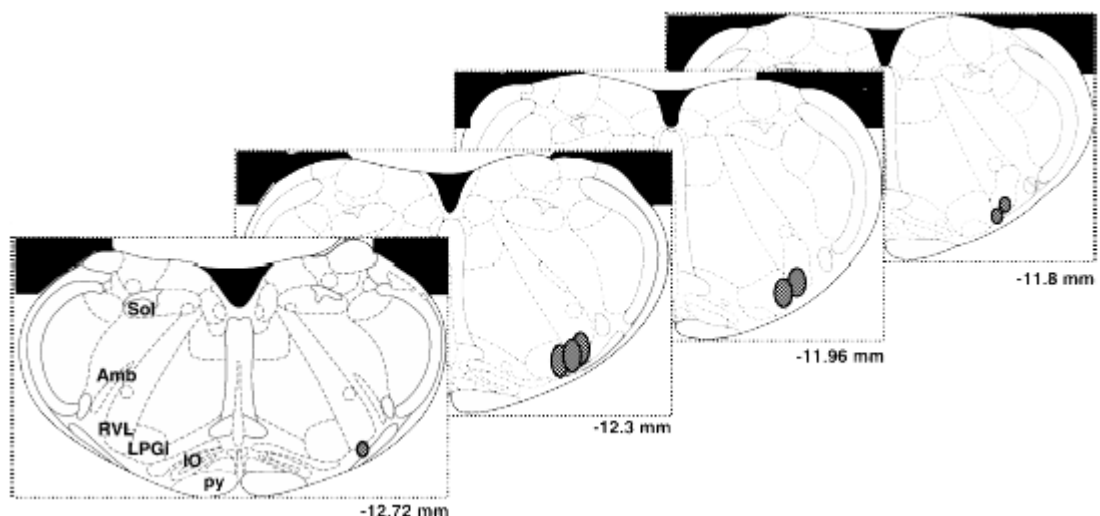


Figura 24: Painel A: Esquemas de cortes frontais do bulbo extraídos do atlas de Paxinos e Watson,1986. A área marcada à direita mostra uma composição da localização das microinjeções na RVLM. SOL: núcleo do trato solitário, AMB: núcleo ambíguo, RVL: VLM rostral, LPGI: núcleo paragigantocelular lateral, IO: núcleo olivar superior, PY: trato piramidal.

5. Discussão

Os resultados do presente estudo mostram, em síntese, o envolvimento dos receptores para Ang-(1-7) na CVLM, através de seu antagonista específico, A-779, na modulação da sensibilidade da bradicardia reflexa na hipertensão renovascular (2R1C). Ang-(1-7) e Ang II microinjetada na CVLM induziram efeitos hipotensores similares tanto em ratos normotensos (SHAM) como em ratos 2R1C. Esses efeitos hipotensores foram bloqueados por antagonistas específicos de Ang-(1-7) e Ang II tanto em animais SHAM como em 2R1C. Interessantemente, em ratos 2R1C a microinjeção do antagonista de Ang-(1-7), o A-779, produziu queda da PA, enquanto o antagonista de receptor AT1 de Ang II, losartan, não apresentou efeito depressor significativo. Além disso, o A-779, mas não o losartan, na CVLM induziu uma melhora na bradicardia reflexa em ratos 2R1C. Nesse estudo mostramos também que a Ang-(1-7) e Ang II microinjetada na RVLM induziram um efeito pressor maior em ratos 2R1C em relação aos ratos normotensos (SHAM). Esses efeitos hipertensores foram bloqueados por antagonistas específicos de Ang-(1-7) e Ang II tanto em animais SHAM como em 2R1C.

As implicações fisiológicas destes resultados serão abordadas após algumas considerações sobre a metodologia empregada. A utilização do anestésico deve ser considerada na interpretação de nossos resultados, pois as respostas cardiovasculares provocadas por angiotensinas centralmente ou a reatividade das diferentes vias eferentes podem ser modificadas por anestésicos. A uretana, o anestésico utilizado neste estudo, foi escolhido por sua ação anestésica de longa duração e por possuir propriedades relaxantes da musculatura esquelética (STROBEL e WOLLMAN, 1969; SEVERS e cols., 1981). Além disso, a uretana produz uma condição de anestesia cirúrgica que é caracterizada por uma pequena diminuição da atividade do sistema nervoso autônomo, o que torna este anestésico um dos mais apropriados para o estudo do controle da função cardiovascular (MAGGI e MELI, 1986). Apesar disso, ratos anestesiados com uretana apresentam uma diminuição do ganho da sensibilidade do controle reflexo da FC (SHIMOKAWA e cols., 1998). Por outro lado, os estudos de microinjeções no SNC em animais não anestesiados envolve a implantação crônica de cânulas metálicas (FONTES e cols., 1997; MICHELLINI e BONAGAMBA, 1990) que determinam uma lesão mecânica mais extensa no tecido a ser estudado. As micropipetas de vidro usadas nesse experimento possuem um diâmetro que variavam entre 100 a 150 μm produzindo um dano mínimo às áreas circunvizinhas à

microinjeção. 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 (FONTES e cols., 2001; DAMPNEY e cols., 2002). A utilização da anestesia permitiu 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).

Os ratos hipertensos 2R1C apresentaram, como esperado, aumento significativo da PAM e não apresentaram alterações significativas em relação a FC. Nossos resultados mostrando aumento significativo da PAM basal, após 4 semanas da cirurgia 2R1C, estão de acordo com dados da literatura (DEFORREST e cols., 1982; BRITTO e cols., 1997; CERVENKA e cols., 2002; LAZARTIGUES e cols., 2004). Estes estudos da literatura mostraram que após a cirurgia 2R1C, o desenvolvimento da hipertensão renovascular é caracterizada por estimulação do SRA. Durante a fase inicial dessa hipertensão a atividade da renina plasmática e as concentrações circulantes de Ang II estão elevadas (PLOTH,1983; MITCHELL e cols., 1995; CERVENKA e cols., 2002; LAZARTIGUES e cols., 2004). No entanto, as concentrações plasmáticas da renina e os níveis de Ang II se normalizam na fase crônica da hipertensão 2R1C, apesar da manutenção dos níveis elevados de PA. O SRA está ativado em vários tecidos sendo responsável pelo aumento da PA nesta fase da hipertensão (OKAMURA e cols., 1986; NISHIMURA e cols., 1992; CERVENKA e cols. 2002; LAZARTIGUES e cols., 2004). LAZARTIGUES e cols. (2004) mostraram que 28 dias após a cirurgia 2R1C em camundongos, os níveis plasmáticos estão normalizados, mas ocorre um aumento do nível de Ang II no bulbo e hipotálamo.

Além do aumento da PA, a eficácia do nosso modelo de hipertensão renovascular 2R1C pôde também ser comprovada pelo menor peso do rim esquerdo (clipado) em relação ao rim contra-lateral (não clipado). Esta redução do peso do rim clipado foi devido à estenose da artéria renal (rim esquerdo) e conseqüentemente, diminuição do fluxo sanguíneo. Por outro lado, o rim contra-lateral (direito, não-clipado) apresentou peso seco maior em relação ao rim direito do rato normotenso (SHAM), sugerindo uma hiperfunção compensatória. O percentual de redução do peso seco relativo do rim esquerdo em relação ao direito nos animais com hipertensão 2R1C esta de acordo com dados anteriores de nosso laboratório (RODRIGUES e cols., 2007). Nossos resultados estão de acordo também com estudos de LUPO e colaboradores (1972) que mostraram

que reduções unilaterais no fluxo sanguíneo renal superiores a 50% podem levar a estados hipertensivos mais prolongados. Uma intensa constrição da artéria renal pode levar a um comprometimento funcional do rim, descaracterizando o modelo 2R1C. Os animais do nosso estudo que apresentaram pontos visíveis de isquemia, sugerindo comprometimento estrutural do órgão foram descartados.

Existem consideráveis evidências de que o SRA cerebral está ativado em diversas formas genéticas e experimentais da hipertensão (MCDONALD e cols., 1980; NISHIMURA e cols., 1992; GYURKO e cols., 1993; KAGYAYAMA e cols., 2001; LAZARTIGUES e cols., 2004). Os peptídeos do SRA atuam sobre áreas centrais reguladoras da PAM como a CVLM. Apesar da importância da CVLM no controle cardiovascular, a participação desse centro bulbar na gênese e manutenção da hipertensão não está completamente estabelecido (SVEED e cols., 2000; SMITH e BARRON 1990, MURATANI e cols., 1993, PINHO e cols., 2006). Estudos anteriores mostraram o efeito hipotensor das microinjeções de Ang II e Ang-(1-7) na CVLM (BLESSING e cols., 1982, SASAKI 1990, POTTS e cols., 2002, ALZAMORA e cols., 2002 e 2006). Existem dados controversos na literatura sobre a magnitude do efeito hipotensor induzido pelas microinjeções de peptídeos angiotensinérgicos na CVLM em animais hipertensos. Alguns estudos (MURATANI e cols., 1991 e 1993) mostraram que a microinjeção de Ang II na CVLM produziu resposta depressora que foi significativamente maior em ratos SHR que em ratos WKY. Entretanto, recentemente, estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que a microinjeção de Ang II na CVLM produz um efeito hipotensor similar em animais normotensos e animais hipertensos 2R1C (RODRIGUES e cols., 2007) bem como em animais SHR (FERREIRA e cols., 2008). De forma semelhante, o presente estudo mostrou que as microinjeções de Ang II e Ang-(1-7) na CVLM produziram um efeito hipotensor similar tanto em animais normotensos como em animais hipertensos 2R1C.

No presente estudo, mostramos que a microinjeção do antagonista de receptor AT1, losartan, e o antagonista de Ang-(1-7), A-779, significativamente atenuou o efeito da Ang II e da Ang-(1-7), respectivamente, na CVLM por até 30 minutos em animais 2R1C e SHAM. Semelhante aos nossos resultados em que o efeito da microinjeção de Ang II na CVLM permanece semelhante após 30 minutos da microinjeção da salina, CASTRO e cols. (2006) mostrou que a microinjeção de Ang-(1-7) na CVLM permanece semelhante após 30 minutos da microinjeção da salina. Estes dados mostram a efetividade dos antagonistas (losartan e A-779)

em bloquear seus respectivos receptores (AT1 e MAS). Avaliando o efeito destes antagonistas microinjetados na CVLM sobre a PAM basal, mostramos que o antagonista de receptor AT1, losartan, na CVLM não alterou a PAM nos animais 2R1C e SHAM. Entretanto, a microinjeção do A-779 na CVLM produziu um efeito depressor significativo em animais hipertensos 2R1C. Nos animais SHAM nenhuma alteração significativa da PAM foi observada após o A-779. Esses dados sugerem uma alteração seletiva do SRA com um possível aumento nos níveis de Ang-(1-7) ou de seu receptor MAS na CVLM de ratos com hipertensão renovascular.

Em estudos recentes de nosso laboratório (RODRIGUES e cols., 2007) mostramos que o antagonista de receptor AT2 da Ang II, PD 1233319, microinjetado na CVLM produziu um efeito depressor significativo em ratos hipertensos 2R1C. Esta similaridade dos efeitos hipotensores induzidos por antagonistas de receptor AT2 e MAS em ratos hipertensos 2R1C sugerem uma provável interação entre estes receptores na CVLM. Vários estudos têm mostrado que em algumas circunstâncias o efeito da Ang-(1-7) pode ser bloqueado pelo antagonista específico AT2, PD1233319, no hipotálamo (GIRONACCI e cols., 2000; DIZ e cols., 1998) ou no núcleo paraventricular (SANTOS e cols., 1994; GIRONACCI e cols., 2000) e periféricamente (SOARES e cols., 2004; SANTOS e FERREIRA, 2007; PINHEIRO e cols., 2007; WALTERS e cols., 2005). Existem evidências para uma interação periférica do receptor MAS de Ang-(1-7) com receptores AT1 e AT2 no coração (KOSTENIS, 2005; KEIDAR, 2007) e no rim de camundongos (CASTRO e cols., 2005, PINHEIRO e cols., 2004 e KEIDAR e cols., 2007).

Estudos recentes indicam que o SRA apresenta um complexo mecanismo de contra-regulação envolvendo receptores AT2 e Ang-(1-7) (CASTRO e cols., 2005, PINHEIRO e cols., 2004 e KEIDAR e cols., 2007; GIRONACCI e cols., 2000 e 2007). Este mecanismo permite que as ações da Ang II via receptor AT1 sejam moduladas pela atuação da Ang II via receptor AT2 ou pela Ang-(1-7) (GALLINAT e cols. 2000; HIYOSHI e cols., 2005). Além disso, os peptídeos angiotensinérgicos, como a Ang-(1-7), podem se ligar a múltiplas isoformas de receptores para produzir seus efeitos, resultando em várias possibilidades de mediação (SANTOS e cols., 2000). Dessa forma, o balanço obtido através destas interações é que parece determinar a função hemodinâmica regional ou sistêmica em condições fisiológicas ou no desenvolvimento da hipertensão.

Estudos de GIRONACCI e colaboradores (2000 e 2007) em ratos normotensos e ratos SHR mostraram que a Ang-(1-7) no hipotálamo reduz a liberação de norepinefrina (NE) através

da estimulação de receptor AT2. Além disso, estes estudos mostraram que o efeito inibitório da Ang-(1-7) sobre a liberação de NE foi bloqueado pelo L-NAME (inibidor da NOS) e pelo antagonista de receptor de BK, icatibante. Em conjunto, estes autores sugerem que a Ang-(1-7) via receptor AT2 inibe a liberação de NE do hipotálamo através de um mecanismo envolvendo BK/ NO.

Aumentos crônicos da Ang II periféricamente e centralmente produz significativo aumento nos receptores AT1, desempenhando um importante papel no controle cardiovascular (NICKENING 2000). LAZARTIGUES e colaboradores (2004) mostraram que os níveis de Ang II aumentam progressivamente no cérebro em camundongos 2R1C. Estes autores mostraram em camundongos transgênicos 2R1C com superexpressão dos receptores AT1a em neurônios (NSE-AT1a) que ocorre um severo aumento na PA imediatamente (~ 3 dias) após a implantação do clipe. Entretanto, uma semana após a clipagem da artéria renal no camundongo NSE-AT1a, a hipertensão diminuiu e estabilizou em níveis menores comparados aos camundongos não transgênicos 2R1C, sugerindo que o aumento central de receptores AT1a induz a ativação de mecanismos contrareguladores envolvidos no controle da hipertensão (LAZARTIGUES e col., 2004). Além disso, estes autores mostraram que o NO está envolvido no controle da hipertensão via superexpressão de receptores AT1a. HIYOSHI e cols. (2005) mostraram também em camundongos que a administração de losartan inibiu o aumento de RNAm para receptores AT2 na aorta através da ativação de receptores AT1. Este estudo mostrou que o aumento da densidade de receptores AT2 na aorta de 2R1C envolveu a fosforilação da eNOS via ativação de receptores B2. SHAPORAL e colaboradores. (1991), mostraram que o nitroprussiato de sódio, um doador de NO, na CVLM produziu efeito hipertensor, enquanto o L-NAME, inibidor da NOS, na CVLM diminuiu a PA. Corroborando com estes dados, LAGE e cols. (1999) mostraram que a microinjeção do precursor de NO, L-Arg, na CVLM produziu aumento na PAM, enquanto o efeito depressor foi observado após a microinjeção de L-NAME. WANG e cols. (1997) mostraram através da técnica de imunohistoquímica que ratos submetidos à cirurgia 2R1C por 4 e 7 semanas apresentaram o número de nNOS positivo significativamente aumentado em neurônios da CVLM. Outras evidências (CERVENKA e cols. 2002; LAZARTIGUES e cols. 2004) confirmam um aumento central dos níveis de NO em animais com hipertensão 2R1C.

Baseando-nos nestes achados, nós acreditamos que possa ocorrer um aumento dos níveis dos componentes do SRA cerebral em ratos hipertensos (CERVENKA e cols. 2002;

LAZARTIGUES e cols. 2004), preferencialmente sobre os níveis de receptor MAS de Ang-(1-7) e do subtipo de receptor de Ang II, AT2 (LENKEI e cols. 1997). Além disso, sugerimos uma interação entre os receptores MAS e AT2 que provavelmente ative mecanismos envolvendo a BK/ NO na CVLM (GIRONACCI e cols., 2000 e 2007). O NO na CVLM produziria um efeito hipertensor (SHAPORAL e cols., 1991; LAGE e cols., 1999; WANG e cols.1997). Esta hipótese explica os dados do presente estudo em ratos hipertensos 2R1C em que o antagonista de receptor de Ang-(1-7) MAS e de nosso estudo anterior, em que o antagonista de receptor AT2, PD 123319, induziram efeitos hipotensores significativos quando microinjetados na CVLM.

Evidências mostram que moduladores centrais, dependendo de seus níveis de concentrações, podem atuar sobre neurônios excitatórios ou inibitórios (FONTES e cols.,1997, BALTATU e cols., 2001, HU e cols., 2002). Assim na hipertensão renovascular 2R1C poderia ocorrer um aumento de expressão de receptores MAS/ AT2 tanto em neurônios excitatórios como em inibitórios, sendo que o balanço entre a ligação do A-779 aos receptores MAS predominaria sobre neurônios inibitórios. Estes neurônios inibitórios, diminuiriam a liberação de NO e consequentemente produziria queda de PAM. Por outro lado, esta hipótese sugere que a Ang-(1-7) endógena, em ratos 2R1C, agiria aumentando a liberação de NO e portanto, atribuindo à CVLM uma importante participação na manutenção dos níveis elevados de PAM na hipertensão renal. Já a Ang-(1-7) microinjetada na CVLM agiria preferencialmente sobre neurônios inibitórios, resultando em queda da PAM. A adição exógena de peptídeos como a Ang-(1-7), apresenta limitações. Não somente pela concentração do peptídeo exógeno não reproduzir a concentração endógena, como também, por este peptídeo agir principalmente com função autocrina e/ou paracrina e não como hormônio endócrino (CARRETERO,1993, TSUDA e cols., 2005). Estudos futuros serão necessários para avaliar a expressão do receptor MAS e os mecanismos envolvendo NO no efeito da Ang-(1-7) na CVLM de animais hipertensos 2R1C.

Em nosso estudo a bradicardia reflexa dos animais 2R1C foi significativamente menor em comparação aos ratos SHAM, de acordo com estudos prévios da literatura (MOREIRA e cols.,1988; MATSUMURA e cols., 1989; KUMAGAI e cols.,1990; BRITO e cols.,1997; KRIEGER e cols.,1999; RODRIGUES e cols., 2007). A redução do reflexo barorreceptor em hipertensos está associada ao aumento da atividade simpática (TAKEDA e BUNAG, 1980; ARRIBAS e cols., 1996; CABASSI e cols., 2002; LEENEN e cols., 2002). O aumento dos componentes do SRA circulantes pode ativar o SNC através de áreas desprovidas de barreira

hemato-encefálica. Várias áreas “fora da barreira hemato-encefálica” participam da modulação do barorreflexo, como a área postrema que possui conexões com outras áreas bulbares relacionadas com a regulação cardiovascular (BARNES e cols., 1994). Portanto, nossos resultados sugerem que o aumento das angiotensinas circulantes que podem atingir áreas cerebrais ou o próprio aumento do SRA tecidual central que ocorre na hipertensão renovascular 2R1C (CERVENKA e cols. 2002; LAZARTIGUES e cols. 2004) exerça influência sobre a modulação central do barorreflexo no sentido de diminuir a sensibilidade barorreflexa neste modelo de hipertensão.

Está bem estabelecido que a Ang II e a Ang-(1-7) agem como contrareguladores sobre o controle barorreflexo em ratos normotensos (FERRARIO e cols., 1997; POLSON e cols., 2007) e ratos hipertensos (BRITTO e cols.,1997; CHAVES e cols., 2000; HERINGER-WALTER e cols., 2001). Enquanto a Ang II reduz a sensibilidade barorreflexa (POLSON e cols.,2007, OLIVEIRA e cols., 1996), a Ang-(1-7) induz facilitação do baroreflexo periféricamente (BENTER e cols., 1995, SANTOS e cols., 2000) ou microinjetado centralmente, ICV (BRITTO e cols., 1997; OLIVEIRA e cols., 1996, CAMPAGNOLE e cols., 1992, SANTOS e cols., 2000) e no NTS (CHAVES e cols., 2000; WANG e cols., 2005). O bloqueio dos receptores AT1 utilizando infusões ICV do losartan facilita o controle barorreflexo em ratos SHR e normotensos, enquanto a infusão ICV do antagonista da Ang-(1-7) diminui a sensibilidade baroreflexa de ratos normotensos, mas não altera de forma significativa a função barorreflexa em SHR (OLIVEIRA e cols., 1996). No nTS, o bloqueio dos receptores AT1 facilita o controle barorreflexo e a ativação dos receptores AT1 pela Ang II exógena, diminui ambos os componentes vagais e simpáticos do controle barorreflexo, indicando que a Ang II diminui o ganho reflexo nessa área (CASTRO & PHILLIPS,1995; CAMPAGNOLE-SANTOS e cols.,1988; KASPAROW e cols.,1998; MATSUMURA e cols.,1998; BOSCAN e cols.,2001). Ações da Ang-(1-7) no nTS parecem contribuir para a modulação barorreflexa exercendo um papel tônico facilitatório sobre o componente bradicárdico (CHAVES e col., 2000) como já citado.

Diversas formas de hipertensão, dentre as quais a hipertensão renovascular está incluída, estão relacionadas com um desequilíbrio pressor e depressor no bulbo. Parte deste desequilíbrio aparece como sendo uma inabilidade dos neurônios da CVLM em contrabalancear o aparente aumento da atividade pressora intrínseca dos neurônios da RVLM em animais hipertensos (CARVALHO e cols., 2003 e PINHO e cols. 2006). ALZAMORA e cols., (2006) mostraram em

ratos wistar que a microinjeção de Ang II na CVLM facilitou a bradicardia reflexa e atenuou a taquicardia reflexa e que, a microinjeção de Ang-(1-7) na CVLM apresentou efeitos opostos, ou seja, diminuiu a bradicardia reflexa e facilitou a taquicardia reflexa. Concordando com esse estudo, nosso presente dado mostrou que o antagonista de receptor MAS de ang-(1-7), A-779, melhorou a sensibilidade da bradicardia reflexa em ratos 2R1C e não alterou a bradicardia reflexa em ratos normotensos (SHAM). Por outro lado, o losartan não afetou a bradicardia reflexa nos ratos 2R1C e SHAM. Concordando com nossos dados, SESOKO e colaboradores (1995) mostraram em ratos normotensos que o antagonista da Ang II, (Sar 1, Th 8)-Ang II, na CVLM não alterou a bradicardia reflexa.

O mecanismo pelo qual a Ang II e a Ang-(1-7) endógenas na CVLM modulam a função barorreflexa e estimulam neurônios depressores na CVLM não foi investigado em nosso estudo. No entanto, é possível que estes peptídeos atuem em grupos neuronais diferentes na CVLM para modular o barorreflexo e o tônus simpático ou ainda, esses peptídeos podem atuar tanto em elementos pré-sinápticos como pós-sinápticos na CVLM. Modelos de vias bulbares mediando o reflexo barorreceptor descrevem vias independentes entre o SNS e o SNP. Como aqui já mencionado, o nTS é reconhecido como sendo o local da primeira sinapse da aferência central do barorreflexo e controla a atividade do SNS através de recíprocas conexões com a RVLM e CVLM. Como também já citado, a RVLM é o local onde se encontram os neurônios simpatoexcitatórios, os quais controlam a atividade neuronal pré-ganglionares simpática da coluna intermediolateral da medula. A atividade da RVLM pode ser controlada, principalmente, diretamente pelo nTS ou via indireta, através da CVLM, que parece ser a via do barorreflexo. Estudos como o de AGARWAL e CALARESU (1991) mostraram que o nTS também controla o SNP através de uma projeção para o NA, onde se localizam os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos que inervam o coração. MCKITRICK e CALARESU (1997) investigaram a possível inibição de neurônios da RVLM pelo NA através de uma via indireta pela CVLM, ou seja, uma possível interação entre NA e a CVLM. Neste estudo, em ratos anestesiados com uretana, a atividade de neurônios da CVLM era registrada durante estimulações com glutamato em sítios cardioinibitórios no NA. Os resultados demonstraram a existência de uma via recíproca entre NA e a CVLM e mostrou a evidência funcional para as interações bulbares implicadas no controle do SNP e SNS na CVLM.

Já está bem estabelecido que as alterações barorreflexas de FC, especialmente a bradicardia reflexa provocada por estímulo pressor resulta principalmente de aumento da atividade vagal com participação menor do tônus simpático para o coração (KIRCHHEIM,1986). Recentemente mostramos em experimentos realizados em animais anestesiados que a microinjeção de Ang II e Ang-(1-7) na CVLM sobre a sensibilidade do controle reflexo da FC é mediado por alterações do tônus parassimpático (ALZAMORA e cols., 2006). Considerando esses resultados e os de MCKITRICK e CALARESU (1997) descritos acima, é possível que a Ang II e a Ang-(1-7) na CVLM modulem o controle barorreflexo, atuando na via neuronal entre CVLM e o NA.

Considerando que nossos dados mostraram que o bloqueio da Ang-(1-7) pelo A-779 na CVLM, melhora a bradicardia reflexa em ratos com hipertensão renovascular sugerindo que a Ang-(1-7) endógena estaria atenuando a bradicardia reflexa nesses animais. Ainda tendo em vista que este antagonista não alterou a bradicardia reflexa em ratos normotensos (SHAM), sugerimos que ocorra um aumento dos receptores MAS em ratos 2R1C. Uma possível explicação para essa atenuação da bradicardia induzida pela Ang-(1-7) endógena em ratos 2R1C poderia ser a existência de um grupo de neurônios barossensíveis que se projetariam diretamente ou através de interneurônios inibitórios para o NA. Desta forma, receptores seletivos de Ang-(1-7) (MAS) poderiam estar localizados em elementos pré ou pós-sinápticos na CVLM com projeções inibitórias para o NA. O efeito desencadeado pela Ang-(1-7) endógena em neurônios da CVLM exerceria um efeito inibitório sobre o NA, assim, diminuiria a atividade parassimpática e conseqüentemente atenuaria a bradicardia reflexa. Nesse sentido, a microinjeção do antagonista, A-779, na CVLM de ratos 2R1C, neste presente estudo, impediria atuação de Ang-(1-7) endógena resultando em aumento da bradicardia reflexa. Os dados do presente estudo em conjunto sugerem que em animais normotensos, os níveis endógenos da Ang II e Ang-(1-7) na CVLM não participam tonicamente no controle barorreflexo da PA, uma vez que o A-779 não alterou a bradicardia reflexa em ratos SHAM. Em adição, nos 2R1C existe um desequilíbrio do RAS, nessa situação patológica em que os níveis endógenos de Ang-(1-7) ou receptores MAS poderiam influenciar a função cardíaca preferencialmente através do eixo ECA2-Ang-(1-7)-MAS em vez da ECA-AngII-AT1. Porém, estudos adicionais se tornam necessários para esclarecer os resultados aqui apresentados.

Depois dos estudos pioneiros de ANDREATTA e cols.(1988) e ALLEN e cols. (1988), evidências experimentais de diferentes grupos de pesquisa têm contribuído para estabelecer a RVLM como um importante sítio no SNC para ações do SRA (MURATANI e cols.,1991; DAMPNEY e cols.,1996; ITO e SVED,1996; SAIGUSA e cols., 1996; FONTES e cols., 1997; HEAD,1996; HIRROKA e cols., 1997). Várias evidências (CHAN e cols.,1994 e 1995; LIMA e cols., 1999; SEYEDABADI e cols., 2001) mostraram uma hiperatividade dos neurônios da RVLM em diferentes modelos de hipertensão. Estudos mostraram que a Ang II e Ang-(1-7) induziram efeito pressor similar quando microinjetadas na RVLM em animais hipertensos (MURATANI e cols., 1991 e 1993; TSUCHIHASCHI e cols., 1999; ZHU e cols.,1998). Contrariamente, os resultados deste trabalho mostraram que o efeito da Ang II e da Ang-(1-7) é de maior magnitude nos animais hipertensos 2R1C em comparação ao efeito hipertensor desses peptídeos nos ratos normotensos (SHAM). Concordando com nossos dados, estudos mostraram que a microinjeção de Ang II produz um maior efeito pressor na RVLM de SHR do que nos WKY (CHAN e cols.,1994 e 1995; SEYEDABADI e cols., 2001). Adicionalmente, resultados similares aos nossos, em relação a Ang-(1-7) foram obtidos por LIMA e cols. (1999) utilizando o modelo de estresse hemorrágico, onde se observou que a magnitude do efeito pressor produzido pela microinjeção de Ang-(1-7) na RVLM foi significativamente aumentada. Assim nossos dados do presente estudo sugerem que na hipertensão 2R1C exista maior reatividade dos neurônios da RVLM às angiotensinas, o que poderia explicar o fato da administração exógena de Ang II e Ang-(1-7) desencadear uma resposta significativamente maior do que a observada em condições de normotensão (SHAM). Este resultado sugere que estas angiotensinas parecem contribuir para a reatividade dos neurônios da RVLM em situações onde ocorre o aumento da atividade simpática, evidenciando a importante função destes peptídeos neste sítio do SNC, na regulação seletiva de respostas desencadeadas por alterações na homeostase.

Nos últimos anos, estudos realizados com antagonistas angiotensinérgicos seletivos indicam que a influência do SRA na VLM é muito mais complexa do que se suspeitava anteriormente (MURATANI e cols., 1993; FONTES e cols., 1997; HIROOKA e cols., 1997; FONTES e cols., 2000). Dados anteriores mostraram que no bulbo ventrolateral, o efeito da Ang-(1-7) não é modificado pelo antagonista de receptor AT1, losartan, ou pelo antagonista de receptor AT2, PD123177, mas abolido pelo antagonista seletivo da Ang-(1-7), o A-779 (SANTOS e cols., 1994; FONTES e cols., 1994; FONTES e cols., 1997). No presente estudo, a

microinjeção do antagonista seletivo para Ang-(1-7), A-779, na RVLM não produziu alterações nos valores basais de PA e FC e bloqueou o efeito hipertensor da microinjeção de Ang-(1-7) por até 30 minutos em ratos 2R1C e SHAM. Concordando com nossos resultados BECKER e cols. (2005) mostraram que a microinjeção do A-779 não alterou a PA basal em ratos normotensos. Contrariamente, FONTES e colaboradores (1994) mostraram que a microinjeção A-779, em ratos normotensos anestesiados e acordados, produziu queda significativa da PA e da FC, similar ao observado na microinjeção do antagonista não-seletivo [Sar¹ Thr⁸] Ang II. Em ratos transgênicos hipertensos, TGR(mREN2)27, caracterizados por altos níveis de renina e angiotensina no cérebro e tecidos periféricos (MULLINS e cols.,1990), a microinjeção de A-779 na RVLM também produziu queda da PAM (FONTES e cols,1997). Os resultados diferenciais obtidos com o A-779, em nosso estudo, podem ser de origem metodológica. FONTES e colaboradores (1994) utilizaram para as microinjeções deste antagonista o volume de 200 nl, enquanto em nosso estudo utilizamos o volume de 100 nl. Sendo assim, um grupamento menor ou diferente de neurônios pode ter sido atingido com o presente volume utilizado.

Nesse estudo as ações pressoras da Ang II na RVLM foram bloqueadas pela microinjeção prévia de losartan na RVLM por até 30 minutos, de acordo com estudos anteriores (FONTES e cols., 1994; BALTATU e cols.,2001; AVERILL e cols. 2000; ALLEN e cols.2000; FONTES e cols., 2000). Neste presente estudo, a microinjeção do antagonista AT1 losartan na RVLM, produziu um aumento da PA tanto nos animais normotensos como nos hipertensos. Contrariamente aos nossos resultados, FONTES e cols. (2000) mostraram que a microinjeção do antagonista de receptor AT1, CV-11974, na RVLM em estudos utilizando ratos transgênicos que super-expressam renina (TGRmREN2), causou queda da PAM. No entanto estes mesmos autores (FONTES e cols., 1997) mostraram em ratos acordados wistar que a microinjeção do losartan na RVLM produz aumento dose-dependente na PA. Esse efeito foi inicialmente interpretado como um parcial efeito agonista desse antagonista ou sugestivo de uma ausência do papel tônico para a Ang II no controle do tônus simpático na RVLM (FONTES et al, 2000; BALTATU et al, 2001). Entretanto esses estudos em animais que apresentavam diferentes níveis de atividade do SRA mostraram que a Ang II pode induzir efeito inibitório, dependendo do nível endógeno de angiotensinas presentes, pelo menos na RVLM. HU e colaboradores (2002) mostraram a existência de receptores AT1 em neurônios GABAérgicos na RVLM e sugerem que a intensidade do efeito pressor induzido pela Ang II depende do balanço entre a ativação de

neurônios glutamatérgicos excitatórios e neurônios GABAérgicos inibitórios. Assim, alterações entre neurônios glutamatérgicos e neurônios GABAérgicos poderiam explicar o efeito hipertensor do losartan na RVLM mostrado no presente estudo.

Nossos dados em conjunto confirmam e estendem observações anteriores, sugerindo um importante papel para as angiotensinas nos neurônios da CVLM e RVLM, na regulação da PA. O presente estudo contribui para o entendimento do papel fisiológico dos peptídeos angiotensinérgicos endógenos na CVLM e RVLM, mostrando uma importante contribuição dos receptores angiotensinérgicos na reatividade cardiovascular de ratos hipertensos 2R1C. Adicionalmente, fortalece o conceito de que os receptores angiotensinérgicos podem contribuir de maneira diferencial na regulação dos neurônios do bulbo ventrolateral dependendo da condição fisiológica imposta.

6. Conclusões

Em síntese, os resultados do presente estudo mostram:

- Os ratos hipertensos 2R1C apresentaram aumento significativo da PAM e não apresentaram alterações significativas em relação a FC.
- O peso seco relativo do rim esquerdo (clipado) dos ratos 2R1C foi menor que o peso seco relativo do rim direito (não clipado). O rim direito, contralateral, dos ratos 2R1C foi maior comparado ao rim direito de ratos SHAM, sugerindo uma hiperfunção compensatória.
- A microinjeção de Ang II e Ang-(1-7) na CVLM produziu respostas depressoras similares nos animais 2R1C e em animais SHAM. A microinjeção do antagonista de receptor AT1 losartan na CVLM não produziu alterações na PAM tanto nos animais 2R1C como nos animais SHAM. O antagonista de receptor MAS, o A-779, na CVLM produziu efeito hipotensor em animais hipertensos 2R1C, enquanto em animais SHAM este efeito hipotensor do A-779 na CVLM foi semelhante ao efeito da salina.
- A microinjeção na CVLM do antagonista de receptor AT1, losartan, e do antagonista de receptor MAS, A-779, atenuou o efeito da Ang II e da Ang-(1-7), respectivamente, por até 30 minutos em animais 2R1C e SHAM.
- A bradicardia reflexa dos animais 2R1C foi menor em comparação aos ratos SHAM.
- A microinjeção de Ang II e Ang-(1-7) na RVLM produziu respostas pressoras de maior magnitude nos animais hipertensos 2R1C em relação ao grupo SHAM, sugerindo uma maior reatividade dos neurônios da RVLM às angiotensinas em animais 2R1C. A microinjeção do antagonista de receptor AT1 losartan na RVLM produziu efeito pressor na PAM tanto nos animais 2R1C como nos animais SHAM. O antagonista de receptor MAS, o A-779, na RVLM não produziu alterações na PAM e FC em relação ao efeito da salina na RVLM.
- Da mesma forma que observado na CVLM, a microinjeção na RVLM do antagonista de receptor AT1, losartan, e do antagonista de receptor MAS, A-779, atenuou o efeito da Ang II e da Ang-(1-7), respectivamente, por até 30 minutos em animais 2R1C e SHAM.

- A microinjeção do A-779 na CVLM melhorou a bradicardia reflexa em ratos 2R1C, entretanto, em animais SHAM, o A-779 na CVLM não alterou a bradicardia reflexa. De forma diferente, o bloqueio de receptores AT1 de Ang II na CVLM não alterou a sensibilidade barorreflexa tanto em animais hipertensos 2R1C como em ratos SHAM.

Os resultados do presente estudo mostram, em síntese, o envolvimento da Ang-(1-7) na CVLM, através de seu antagonista específico, A-779, no desenvolvimento da hipertensão renovascular 2R1C e fortalece o conceito de que os receptores angiotensinérgicos podem contribuir de maneira diferencial na regulação dos neurônios do bulbo ventrolateral dependendo da condição fisiológica imposta.

7– Referências Bibliográficas

- AGARWAL, S.K., CALARESU, F.R. (1991). *Monosynaptic connections from caudal to rostral ventrolateral medulla in the baroreceptor reflex pathway*. Brain Res.555: 70-74.
- ALLEN A.M., DAMPNEY R.A.L., MENDELSON F.A.O. (1988). *Angiotensin receptor binding and pressor effects in cat subretrofacial nucleus*. Am J Physiol. 255: H1011-17.
- ALMEIDA, A.P., FRABREGAS, B.C., MADUREIRA, M.M. et al. (2000). *Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart*. Braz J Med Biol Res. vol.33, no.6, 709-713.
- ALZAMORA, A.C., SANTOS, M.J., CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. (2002). *Hypotensive effects of Ang II and Ang-(1-7) at the caudal ventrolateral medulla involves different mechanisms*. Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol . 283:R1187-1195.
- ALZAMORA, A.C., SANTOS, R.A.S., CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. (2006). *Baroreflex Modulation by Angiotensins at the Rat Rostral and Caudal Ventrolateral Medulla*. Am J Physiol Regul Integr Comp. Physiol. 23: R1027-1034.
- AMBÜHL P., FELIX D., IMBODEN H., KHOSLA M.C., FERRARIO C. M. (1992). *Effects of angiotensin analogues and angiotensin receptor antagonists on paraventricular neurons*. Reful Pept. 38: 111-20.
- ANDREATTA S.H., AVERILL D.B., SANTOS R.A., FERRARIO C.M. (1988). *The ventrolateral medulla: A new site of action of the rennin angiotensin system*. Hypertension. 11(Suppl.I): I-163-6.
- ARRIBAS S.M., ALONSO, M.J., MARIN, J., FERNANDES, F., LLERGO, J.L., SANCHEZ-FERRER, C.F. & SALAICES, M. (1996). *Noradrenergic transmission in the tail artery of hypertensive rats transgenic for the mouse renin gene Ren-2*. J. Auton. Pharmacol. 16,69-77.
- AVERILL D.B., DIZ D.I. (2000). *Angiotensin peptides and the baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata*. Brain Res Bull. 51(2): 119-28.
- AVERILL D.B., TSUCHIHAS H.I.,KHOSLA M.C., FERRARIO C.M. (1994). *Losartan, non-peptide angiotensin II-type 1(AT 1) receptor antagonist, attenuates pressor and sympathoexcitatory responses evoked by angiotensin II and l-glutamate in rostral ventrolateral medulla*. Brain Res. 665: 175-80.
- BADER M., PETERS J., BALTATU O., MULLER D.N., LUFT F.C., GANTEN D. (2001). *Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research*. J Mol Med. 79: 76–102.
- BALTATU O., FONTES M.A., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., CALIGIORNI S., GANTEN D., SANTOS R.A., BADER M. (2001) *Alterations of the renin-angiotensin system at the RVLM*

of transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280 (2): R428-33.

BARNES K.L., MCQUEENEY A.J., BARRETT W.R. e KNOWLES W.D. (1994). *Morphology and projections of neurobiotin-labeled nucleus tractus solitarii neurons recorded in vitro.* *Brain Res Bull.* 34(4):339-48.

BÉCHIR M, ENSELEIT F, CHENEVERD R, LÜSCHER TF, NOLL G. (2005). *Effect of losartan on muscle sympathetic activity and baroreceptor function in systemic hypertension.* *Am J Cardiol.* 95: 129-131.

BECKER L.K, ETELVINO G.M., WALTHER T., SANTOS R.A.S., e CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. (2007). *Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(3): H1416 - H1424.

BECKER L.K., SNATOS R.A., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. (2005). *Cardiovascular effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) at the RVLM of trained normotensive rats.* *Brain Res.* 1040: 121-128.

BENTER I.F., DIZ D.I., FERRARIO C.M. (1995). *Pressor and reflex sensitivity is altered in spontaneously hypertensive rats treated with angiotensin-(1-7).* *Hypertension.* 26: 1138-44.

BERECEK K.H., ROBERTSON J.D., THORSTAD M.H. (1991). *Central administration of a specific angiotensin II receptor antagonist on baroreflex function in spontaneously hypertensive rats.* *J.Hypertens. (suppl 4):* 365-371.

BERGAMASCHI, C.T., BIANCARDI V.C, LOPES O.U, CAMPOS R.R. (2002). *Effects of angiotensin blockade in the rostral ventrolateral medulla on maintenance of hypertension induced by chronic L-NAME treatment.* *Brain Research.* 927: 195-199.

BICKERTON R. K. & BUCKLEY J. P. (1961). *Evidence for a central mechanism in angiotensin. induced hypertension.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 106:834-6.

BLESSING W.W., REIS D.J. (1982). *Inhibitory cardiovascular function of neurons in the caudal ventrolateral medulla of the rabbit: relationship to the area containing A₁ noradrenergic cells.* *Brain Res.* 253:161-171.

BOSCAN P., ALLEN A.M. & PATON J.F. (2001). *Baroreflex inhibition of cardiac sympathetic outflow is attenuated by angiotensin II in the nucleus of the solitary tract.* *Neuroscience.* 103:153-160.

BRITTO R.R., SANTOS R.A.S., FAGUNDES-MOURA C.R., KHOSLA M.C., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. (1997). *Role of Angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in Renovascular Hypertensive Rats.* *Hypertension.* 30: 549-556.

BRODY M.J., VARNER K.J., VASQUEZ E.C., LEWIS S.J. (1991). *Central Nervous System and Pathogenesis of Hypertension.* *Hipertension . Suppl 18:* III-7-12.

- BROSNIHAN K.B., LI P., FERRARIO C.M. (1996). *Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide*. Hypertension. 27:523-528.
- CABASSI A., VINCI S., CANTONI A.M., QUARTIERI F., MOSCHI-NI L., CAVAZZINI S., CAVATORTA A., BORGHETTI A. (2002). *Sympsthetic activation in adipose tissue and skeletal muscle of hypertensive rats*. Hypertension. 39: 656-661.
- CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., DIZ D.I., FERRARIO C.M. (1988). *Baroreceptor reflex modulation by angiotensin II at the nucleus tractus solitarii*. Hypertension. 11: 1167-1171.
- CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., HAIBARA A.S. (2001). *Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial*. Rev Bras Hipertens. 8: 30-40.
- CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., HERINGER S.B., BATISTA E.M., KHOSLA M.C., SANTOS R.A.S. (1992). *Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides*. *Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides*. Am J Physiol. 263: R89-94.
- CAREY R.M., SIRAGY H.M. (2003). *Newly recognized components of the Renin-Angiotensinsystem: potential roles in cardiovascular and renal regulation*. Endocr Rev. 24: 261-271.
- CARRETERO O.A. (1993). *Kinins: Local hormones in regulation of blood pressure and renal function*. Choices Cardiol.1993:7 (Supll.1): 10-14.
- CARVALHO T.H.F., BERGAMASCHI C.T., LOPES O.U. e CAMPOS R.R. (2003). *Role of endogenous angiotensin II on glutamatergic actions in the rostral ventrolateral medulla in goudblatt hypertensive rats*. Hypertension. 42: 707-712.
- CASTRO C.H, SANTOS R.A.S., FERREIRA A.J., et al. (2005). *Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor MAS with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart*. Hypertension. 46: 937-942.
- CASTRO R. e PHILLIPS M.I. (1986). *Neuropeptide action in nucleus tractus solitarius: angiotensin specificity and hypertensive rats*. Am. J. Physiol. 249: R341-347.
- CASTRO U.G.M., MACHADO R.P., SANTOS R.A.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J, SOARES A.C, SILVA M.E, ALZAMORA A.C. (2006). *Ang-(1-7) Responsiveness at the of renovascular hipertensive rats*. In: International Symposium on Vasoactive Peptides. Ouro Preto.
- CERVENKA L., HORÁCERK V., VANECKOVA, HUBÁCEK J.Á., OLIVERIO M.I., COFFMAN T.M. , NAVAR L.G. (2002). *Essencial Role of AT1A Receptor in the Development of 2K1C Hypetension*. Hypertension. 40: 735-741.
- CHAN R.K., CHAN Y.S., WONG T.M. (1994). *Effects of [Sar₁, Ile₈]-angiotensin II on rostral ventrolateral medulla neurons and blood pressure in spontaneously hypertensive rats*. Neuroscience. 63 (1): 267-277.

- CHAN Y.S., WONG T.M. (1995). *Relationship of rostral ventrolateral medullary neurons and angiotensin in the central control of blood pressure*. Biol. Signals. 4 (3): 133-41.
- CHAPPEL M.C., IYER S.N., DIZ D.I., FERRARIO, C.M. (1998). *Antihypertensive effects of angiotensin-(1-7)*. Braz J Med Biol Res. 31: 1205-1212.
- CHAPPEL M.C., TALLANT E.A., BROSNIHAN K.B., FERRARIO C.M. (1994). *Conversion of angiotensin I to angiotensin -(1-7) by thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) in vascular smooth muscle cells*. J Vasc Med Biol. 5: 129-37.
- CHAVES G. Z., CALIGIORNE S.M., SANTOS R.A., KHOSLA M.C., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. (2000). *Modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin (1-7) at the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats*. J. Hypertens. 18:1841-1848.
- CHERN, C-M., HSU H-Y., HU H-H., CHEN Y-Y., HSU L-C. (2006). *Effects of atenolol and losartan on baroreflex sensitivity and heart rate variability in uncomplicated essential hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol. 47: 169-174.
- CULMAN J., HOHLE S., QADRI F., EDLING O., BLUME A., LEBRUN C., UNGER, T. (1995). *Angiotensin as neuromodulator neurotransmitter in central control of body fluid and electrolyte homeostasis*. Clin. Exp. Hypertens. 17:281-293.
- DAMPEY R.A., FONTES M.A., HIROOKA Y., HORIUCHI J., POTTS P.D., TAGAWA T. (2002). *Role of Angiotensin II receptors in the regulation of vasomotor neurons in the ventrolateral medulla*. Clin Exp Pharmacol Physiol. 29: 467-72.
- DAMPEY R.A.L. (1994). *Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system*. Physiol Rev. 74 (2): 323-64.
- DAY T.A., RO A., REUNAUD L.P. (1983). *Depressor area within caudal ventrolateral medulla of the rat does not correspond to the A1 catecholamine cell group*. Brain Res. 279: 299-302.
- DEFORREST J.M., KNAPPENBERGER R.C., ANTONACCIO M.J., FERRONE R.A., CREEKMORE J.S. (1982). *Angiotensin II is a necessary component for the development of hypertension in the two kidney, one clip rat*. Am J Cardiol. 49:1515-1517.
- DIZ D.I., BOSH S.M., WESTWOOD B. (1998). *Identification of angiotensin receptor subtypes mediating substance P release in brain slices of hypothalamus and medulla*. Hypertension. 32: 594.
- DUKA I., KINTSURASHVILI E., GAVRAS I., JOHNS C., BRESNAHAN M., GAVRAS H. (2001). *Vasoactive potential of the b(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension*. Circ Res. 88: 275–281.

- FARIA-SILVA R., DUARTE F.V., SANTOS R.A.S. (2005). *Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats*. Hypertension. 46: 948-952.
- FELDMAN J.L., ELLENBERGER H.H. (1988). *Central coordination of respiratory and cardiovascular control in mammals*. Annu. Rev. Physiol 50: 593-606.
- FELDMAN P.D., MOISES H.C. (1988). *Electrophysiological evidence for $\alpha 1$ and $\alpha 2$ – adrenoceptors in solitary tract nucleus*. Am J Physiol. 254 (Heart Circ. Physiol.23): H756-762.
- FELIX D., KHOSLA M.C., BAMES K.L., IMBODEN H., MONTANI B., FERRARIO C.M. (1991). *Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7)*. Hypertension. 17: 1111-4.
- FERNANDES L., FORTES Z.B., NIGRO D. (2001). *Potentialiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo*. Hypertension 37 (2 Part2): 703-709.
- FERRARIO C.M, IYER S.N. (1998). *Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the rennin-angiotensin system*. Regul Pept. 78: 13-18.
- FERRARIO C.M. (1998). *Angiotensin-(1-7) and antihypertensive mechanisms*. J Nephrol. 11: 278-83.
- FERRARIO C.M., CHAPPEL M.C., TALLANT E.A., BROSNIHAN K.B., DIZ D.I. (1997). *Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7)*. Hypertension 1997; 30 (Part 2): 535-541.
- FERRARIO C.M., UENO Y., DIZ D.I., BARNES K.L. (1986). *The renin-angiotensin system: physiological actions on the central nervous system*. In: Zanchetti A, Tarazi, C., eds. Pathophysiological of hypertension. Amsterdam: elvesevier science publishers.8: 431-454.
- FERREIRA A.J, SANTOS R.A.S, ALMEIDA A.P. (2001). *Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion*. Hypertension. 38: 665-668.
- FERREIRA P.M., ALZAMORA A.C., SANTOS R.A., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. (2008). *Hemodynamic effect produced by microinjection of angiotensins at the caudal ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats*. Neuroscience. 19:151(4):1208-1216.
- FERREIRA S.V., SANTOS, R.A.S. (2005). *Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7)*. Braz. Méd. Biol. Res. 38: 499-507.
- FONTES M.A., BALTATU O., CALIGIORNE S.M., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., GANTEN D., BADER M., SANTOS R.A. (2000). *Angiotensin peptides acting at rostral ventrolateral medulla contribute to hypertension of TGR(mREN2) 27 rats*. Physiol Genomics. 2(3) : 137-42.

FONTES M.A.P., DAMPEY R.A.L. (2001). *Cardiovascular effects produced by blockade AT1 receptors in the rostral ventrolateral medulla during hypoxia in anaesthetized rats*. *Hypertension*. 37 (3): 1009.

FONTES M.A.P., MARTINS PINGE M.C., NAVES V., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., LOPES P.O., KHOSLA M.C., SANTOS R.A.S. (1997). *Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensin and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats*. *Brain Res*. 750:305-10.

FONTES M.A.P., SILVA L.C.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., KHOSLA M.C., GUERTZENSTEIN P.G., SANTOS R.A.S. (1994). *Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in central control of blood pressure at the ventrolateral medulla acting through specific receptors*. *Brain Res*. 665: 175-80.

FREEMAN E.J., CHISOLM G.M., FERRARIO C.M., TALLANT E.A. (1996). *Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth*. *Hypertension*. 28: 104-108.

GALLI S.M., PHILLIPS M.I. (2001). *Angiotensin II AT(1A) receptor antisense lowers blood pressure in acute 2-kidney, 1-clip hypertension*. *Hypertension*. 38: 674-678.

GALLINAT S., BUSCHE S., RAIZADA M.K., SUMNERS C. (2000). *The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278(3):E357-74.

GANTEN D., HERMANN K., BAYER C., UNGER T., LANG, R.E. (1983). *Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in hypertensive rats*. *Science*. 221: 869-871.

GASPARO M., CATT K.J., INAGAMI T., WRIGTH J.W., UNGER T. (2000). *The angiotensin II receptors*. *International Union of Pharmacology: XXIII. Pharmacol*. 52:415-472.

GIRONACCI M., VATTA M., RODRIGUEZ-FERMEPÍN M., FERNÁNDEZ B. E., PENA C. (2000). *Mechanism in Rat Hypothalamus Angiotensin-(1-7) Reduces Norepinephrine Release Through a Nitric Oxide*. *Hypertension*. 35:1248-1252.

GIRONACCI M.M., BROSNIHAN K.B., FERRARIO C.M., GORZALCZANY S., VERRILLI M.A., PASCUAL M., TAIRA C., PEÑA C. (2007). *Increased hypothalamic angiotensin-(1-7) levels in rats with aortic coarctation-induced hypertension*. *Peptides*. 28(8):1580-5.

GOLDBLATT H., LYNCH J., HANZAL R. F., SUMMERVILLE W. W. (1934). *Studies on experimental hypertension: I. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia*. *J. Exp. Med*. 59: 347.

GROBE J.L., MECCA A.P., LINGIS M. (2007). *Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7)*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292:736-742.

GYURKO R., WIELBO D., PHILLIPS M.I. (1993). *Antisense inhibition of AT1 receptor mRNA and angiotensinogen mRNA in the brain of spontaneously hypertensive rats reduces hypertension of neurogenic origin*. *Regul Pept*. 40: 167-174.

- HARDING J.W, FELIX D. (1987). *Angiotensin-sensitive neurons in the rat paraventricular nucleus: relative potencies of angiotensin II and angiotensin III*. Brain Res. 424: 130-134.
- HARDING J.W., JENSEN L. L : HANESWORTH, J M : ROBERTS, K A : PAGE, T A : WRIGHT, J W. (1992). *Release of angiotensins in paraventricular nucleus of rat in response to physiological and chemical stimuli*. Am-J-Physiol. Jan; 262(1 Pt 2): F17-23.
- HARMER D., GILBERT M., BORMAN R., CLARK K,L. (2002). *Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme*. FEBS Letters. 532:107-110.
- HEAD G.A. (1996). *Role of AT1 receptors in the central control of sympathetic vasomotor function*. Clin Exp. Pharmacol. And Physiol. 3: S93-98.
- HERINGER-WALTHER S., BATISTA E.N., WALTHER T., KHOSLA M.C., SANTOS R.A., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. (2001). *Baroreflex improvement in SHR after ace inhibition involves angiotensin-(1-7)*. Hypertension. 37: 1309-1314.
- HERMANN K., MCDONALD W., UNGER T., LANG R.E. & GANTEN D. (1984). *Angiotensin biosynthesis and concentrations in brain of normotensive and hypertensive rats*. J. Physiol. 79, 471-480.
- HIROOKA Y., POTTS P.D., DAMPNEY R.A.L. (1997). *Role of angiotensin II receptor subtypes in mediating the sympathoexcitatory effects of exogenous and endogenous angiotensin peptides in the rostral ventrolateral medulla of the rabbit*. Brain Res. 772: 104-14.
- HIYOSHI H., YAYAMA K.,TAKANO M., OKAMOTO H. (2005). *Angiotensin Type 2 Receptor–Mediated Phosphorylation of eNOS in the Aortas of Mice With 2-Kidney, 1-Clip Hypertension*. Hypertension. 45:967-973.
- HÖCHT C., OPEZZO J.A.W., GIRONACCI M.M., PEÑA C., TAIRA C.A. (2006). *Hypothalamic cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats*. Regulatory Peptides. 135:39-40.
- HORIUCHI M., AKISHITA M., DZAU V.J. (1999). *Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system*. Hypertension. 33: 613-21.
- HU L., ZHU D.N., YU Z., WANG J.Q., SUN Z.J., YAO T. (2002). *Expression of angiotensin II type (At1) receptor in the rostral ventrolateral medulla rats*. J Appl Physiol. 92: 2153-61.
- IRIGOYEN M.C., CONSOLIM-COLOMBO F.M., KRIEGER E.M. (2001). *Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático*. Rev Bras Hipertens. 8: 55-62.
- ITO S., SVED A.F. (1996). *Blockade of angiotensin receptors in rat rostral ventrolateral medulla removes excitatory vasomotor tone*. Am. J. Physiol. 270: R1317-1323.

- IYER S.N., FERRARIO C.M., CHAPPELL MC. (1998). *Angiotensin-(1-7) Contributes to the Antihypertensive Effects of Blockade of the Renin-Angiotensin System*. Hypertension. 31: 356-361.
- KAGIYAMA S., VARELA A., PHILLIPS M.I., GALLI S.M. (2001). *Antisense inhibition of brain renin-angiotensin system decreased blood pressure in chronic 2-Kidney, 1 clip hypertensive rats*. Circ. Res. 37: 371-375.
- KALIA M., FUXE K., GOLDESTSTEIN M. (1985). *Rats medulla oblongata: II. Dopaminergic, noradrenergic (A1 and A2) and adrenergic neurons, nerve fibers, and presumptive terminal processes*. J Comp Neurol. 233: 308-322.
- KASCHINA, E., UNGER T. (2003). *Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signaling and function*. Blood Pressure. 12:70-88.
- KASPAROV S., BUTCHER J.W. e PATON J.F.R. (1998). *Angiotensin II receptors within the nucleus of the solitary tract mediate the developmental attenuation of the baroreceptor vagal reflex in preweaned rats*. J. Auton. Nerv. Syst. 74:160-168.
- KEIDAR S., KAPLAN M., GAMLIEL-LAZAROVICH A. (2007). *ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin(1-7)*. Cardiovascular Research. 73: 463-469.
- KERMAN I.A., MCALLEN R.M., YATES B.J. (2000). *Patterning of sympathetic nerve activity in response to vestibular stimulation*. Brain Research Bulletin. 53(1): 11-16.
- KIRCHHEIM H. R. (1986). *Systemic arterial baroreceptor reflex*. Physiol. Rev. 56: 100-176.
- KOSTENIS E., MILLIGAN G., CHRISTOPOULOS A., SANCHEZ-FERRER C.F., HERINGER-WALTHER S., SEXTON P.M., ET AL. (2005). *G-protein-coupled receptor MAS é a physiological antagonist of the angiotensin II type I receptor*. Circulation. 111: 1806-13.
- KRIEGER E. M. (1989). *Arterial baroreceptor resetting in hypertension*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 15: 3-7.
- KRIEGER E. M. (1964). *Neurogenic hypertension in the rat*. Circulation Res.15: 511-521.
- KRIEGER E.M., FARAH V.M.A., MOREIRA E.D., PIRES M.D., IRIGOYEN M.C.C. (1999). *Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats*. Braz J Med Biol Res. 32 (3): 361-369.
- KUCHARWICZ I., PAWLAK R., MATYS T., PAWLAK D. e BUCZKO W. (2002). *Antithrombotic Effect of Captopril and Losartan Is Mediated by Angiotensin-(1-7)*. Hypertension. 40:774-779.
- KUMAGAI K., SUZUKI H., RYUZAKI M., MATSUKAWA S., SARUTA T. (1990). *Baroreflex control of ronal sympathetic nerve activity is potentiated at early phase of two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension in conscious rabbits*. Circulation Research. 67: 1309-1322.

- LAGE R.C., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., FONTES M.A.P., SANTOS R.A.S. (1999). *Cardiovascular effects produced by nitric oxide-related drugs in the caudal ventrolateral medulla*. NeuroReport.10: 731-735.
- LAZARTIGUES, E; LAWRENCE, A.J; LAMB F.S.; DAVISSON R.L. (2004). *Receptors Is Buffered by Increased Nitric Oxide Production in the Periphery 1a Renovascular Hypertension in Mice With Brain-Selective Overexpression of AT*. Circulation Research. 95:523-531.
- LEENEN F.H, RUZICKA M. e HUANG B.S. (2002). *The brain and salt-sensitive hypertension*. Curr.Hypertens. Res. 4:129-135.
- LENKEI Z., PALKOVITS M., CORVOL P., LIORENS-CORTES C. (1997). *Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review*. Front Neuroendocrinol. 18: 383-439.
- LEVY B.L. (2005). *How to explain the differences between rennin angiotensin system modulators*. Am J Hypertens. 2005; 18: S134-41.
- LIMA D.X., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., FONTES M.A.P., KHOSLA M.C., SANTOS R.A.S. (1999). *Haemorrhage increases the pressor effect of angiotensin-(1-7) but not of angiotensin II at the rat rostral ventrolateral medulla*. Journal of hypertension. 17: 1145-1152.
- LIMA C.V., PAULA R.D., RESENDE F.L., KHOSLA M.C., SANTOS R.A. (1997). *Potentialiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats*. Hypertension. 30: 542-548.
- LOOT A.E., ROKS A.J.M., HENNING R.H., TIO R.A., SUURMEIJER A.J.H., BOOMSMA F., VAN GILST W.H. (2002). *Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats*. Circulation. 105: 1548-1550.
- LUMBERS E.R., MCCLOSKEY D.I., POTTER E.K. (1979). *Inhibition by angiotensin II of baroreceptor-evoked activity in cardiac vagal efferent nerves in the dog*. J Physiol. 294:69-80.
- LUPO A.N., MAXWELL M.H., KAUFMAN J.J. e WHITE F.N. *Experimental Unilateral Renal Artery Constriction in the Dog*. Circ. Res. 1972; 30; 567-574.
- MACHADO B.H., BRODY M. (1992). *The nucleus ambiguus region participates in arterial pressure regulation*. Neuroscience Letter. 135: 91-94.
- MACHADO R.D., SANTOS R.A.S., ANDRADE S.P. (2000) *Opposing actions of angiotensins on angiogenesis*. Life Sci. 66: 67-76.
- MAGGI C.A., MELLI A. (1986). *Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigation in various systems*. Cardiovascular System. Experientia. 40(2): 51-59.

- MAIA L.G., RAMOS M.C., FERNANDES L., et al. (2004). *Angiotensin-(1-7) antagonist A-779 attenuates the potentiation of bradykinin by captopril in rats*. J Cardiovasc Pharmacol. 43:685-691.
- MASAKI H., KURIHARA T., YAMAKI A., INOMATA N., NOZAWA Y., MORI Y. (1998). *Cardiac-specific overexpression of angiotensin II At2 receptor causes attenuated response to At1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects*. J.Clin Invest. 101:527-35.
- MATSUMURA K., AVERILL D.B., FERRARIO C.M. (1998). *Angiotensin II acts at AT1 receptors in the nucleus of the solitary tract to attenuate the baroreceptor reflex*. Am. J. Physiol. 275: R1611-1619.
- MATSUMURA Y., HASSER E.M., BISHOP.V.S. (1989). *Central effect of angiotensin II on baroreflex regulation in conscious rabbits*. Am. J. Physiol. 256 (25): R694-700.
- MCDONALD W., WICKRE C., AUMANN S., BAN D., MOFFITT B. *The sustained antihypertensive effect of chronic cerebroventricular infusion of angiotensin antagonist in spontaneously hypertensive rats*. Endocrinology.1980; 107: 1305-1308.
- MCKITRICK D.J., CALARESU F.R. (1997). *Reciprocal connection between nucleus abiguus and caudal ventrolateral medulla*. Brain Research. 742: 203-210.
- MENDELSON F.A.O., ALLEN A.M., CLEVES A.J., DENTON D.A, TARJAN E., MCKINLEY M.J. (1988) *Localization of angiotensin II receptor binding in rabbit brain by in vitro autoradiography*. J Comp. Neurol. 270: 372-84.
- MICHELINI L. C. (2000). *Regulação momento a momento da pressão arterial na normotensão e hipertensão. Implicações fisiopatológicas*. Hipertensão. 3:90-98.
- MICHELLI L.C., BONAGAMBA L.G. (1990). *Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats*. Hypertension. 15(2): 145-150.
- MICKINLEY M.J., ALLEN A.M., MATHAI M.L., MAY C., MCALLEN R.M., OLDFIELD, B., WEISINGER R.S. (2001). *Brain angiotensin and a body fluid homeostasis*. Jpn. J. Physiol. 51: 281-289.
- MITCHELL K.D. e MULLINS J.J. (1995). *Angiotensin II influences on rela function in hypertensive ren-2 transgenic rats*. American Journal of Hypertension. 8 (4):2.
- MOREIRA E.D., OLIVEIRA M., KRIEGER E.M. (1988). *Impaired baroreflex controlo f heart rate in high-renin renal hypertension*. J Hypertens. 6(8): 619-625.
- MULLINS J.J., PETERS J., CANTEN D. (1990). *Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse ren-2 gene*. Nature. 344: 541-544.
- MURATANI H, FERRARIO C. M, AVERILL D.B. (1993). *Ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats: role of angiotensin II*. Am. J. Physiol. 264: R388-395.

- MURATANI H., AVERILL D.B., FERRARIO C. M. (1991). *Effect of angiotensin II in ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats*. Am. J. Physiol. 260: R977-984.
- MURUGAIAN J., SUNDARAM K., KRIEGER A., SAPRU H. (1989). *Electronic lesions in the depressor area of the ventrolateral medulla of the rat abolish depressor responses to the aortic nerve stimulation*. Brain Res. 499: 371-377.
- NICKENIG G., STREHLOW K., BÄUMER A.T., BAUDLER S., WAÛMANN S., SAUER H., BÖHM M. (2000). *Negative feedback regulation of reactive oxygen species on AT1 receptor gene expression*. British Journal of Pharmacology. 131: 795 – 803.
- NISHIMURA M., MILSTED A., BLOCK C.H., BROSNIHAN K.B., FERRARIO C.M. (1992). *Tissue rennin-angiotensin systems in renal hypertension*. Hypertension. 20: 158-167.
- OKAMURA T., MIYAZAKI M., INAGAMI T., TODA N. (1986). *Vascular rennin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats*. Hypertension. 8: 560-565.
- OLIVEIRA D.R., SANTOS R.A., SANTOS G.F., KHOSLA M., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. (1996). *Changes in the baroreflex control of heart rate produced by central infusion of selective angiotensin antagonists in hypertensive rats*. Hypertension. 27:1284-1290.
- PAULA R.D, LIMA C.V, BRITTO R.R., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J, KHOSLA M.C, SANTOS R.A. (1999) *Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by angiotensin-(1-7) related peptides*. Peptides 20: 493-500.
- PAULA R.D, LIMA C.V, KHOSLA M.C, SANTOS R.A. (1995). *Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats*. Hypertension. 26:1154-1159.
- PAXINOS G., WATSON C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press. 2nd ed.
- PEACH M.J. (1977). *The rennin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action*. Physiol. 55: 313-369.
- PHILLIPS M.I. e KIMURA, B. (1988). *Brain angiotensin in the developing spontaneously hypertensive rat*. J. Hypertens. 6: 607-612.
- PINHEIRO S.V., SIMÕES E SILVA A.C., SAMPAIO W.O., DE PAULA R.D., MENDES E.P., BONTEMPO E.D., PESQUERO J.B., WALTHER T., ALENINA N., BADER M., BLEICH M., SANTOS R.A. (2004). *Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney*. Hypertension. 44(4):490-6.
- PINHO D., SOUSA T., MORATO M., TAVARESC I., ALBINO-TEIXEIRA A. (2006). *Lesion of the caudal ventrolateral medulla prevents the induction of hypertension by adenosine receptor blockade in rats*. Brain Research. (1073-1074): 374-382.
- PLOTH D.W. (1983). *Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney, one clip renal vascular hypertension*. Am J Physiol. 245: F131-141.

- POLSON W., DAMPNEY R.A.L., BOSCAN P., PICKERING A.E., PATON J.F.R. (2007). *Differential baroreflex control of sympathetic drive by angiotensin II in the nucleus tractus solitarius*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 293: R1954-1960.
- POTTS P.D., ALLEN A.M., HORIUCHI J., DAMPENEY R.A. (2000). *Does angiotensin II have a significant tonic on cardiovascular neurons in the rostral and caudal VLM?* *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 279: R1392-02.
- POTTS P.D., HORIUCHI J., COLEMAN M.J., DAMPENEY R.A. (2002) *The cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) in the rostral and caudal ventrolateral medulla of the rabbit*. *Brain Res*. 877: 58-64.
- REID I.A. (1984). *Actions of angiotensin on the brain: mechanisms and physiologic role*. *Am. J. Physiol*. 246(5Pt 2): F533-543.
- RODRIGUES M.C., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., MACHADO R.P., SILVA M.E., ROCHA J.L.M., FERREIRA P.M., SANTOS R.A.S., ALZAMORA A.C. (2007). *Evidence for a role of AT₂ receptors at the CVLM in the cardiovascular changes induced by low-intensity physical activity in renovascular hypertensive rats*. *Peptides* . 28 (7): 1375-1382.
- ROKS A.J., VAN GEEL P.P., PINTO Y.M., et al. (1999) *Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system*. *Hypertension*. 34:296-301.
- SAAD W.A., CAMARGO L.A.A. (2003). *Influência dos Subtipos dos Receptores da Angiotensina II do Núcleo Paraventricular sobre as Respostas Fisiológicas Induzidas pela Angiotensina II Injetada na Área Septal Medial*. *Arq Bras Cardiol*. 80(4): 396-400.
- SAAVEDRA J.M. (1992). *Brain and pituitary angiotensin*. *Endocr. Rev.* 13: 329.
- SAIGUSA T., IRIKI M., ARITA J. (1996). *Brain angiotensin II tonically modulates sympathetic baroreflex in rabbit ventrolateral medulla*. *Am J Physiol*. 271(3 Pt 2): H1015-21.
- SAMPAIO W.O., SANTOS R.A.S., FARIA-SILVA R., ET AL. (2007). *Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways*. *Hypertension*. 49(1): 185-92.
- SANTOS R.A., BROSNIHAN K.B., JACOBSEN D.W., DICORLETO P.E., FERRERIO C.M. (1992). *Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium*. *Hypertension*. 19 (2Suppl): 1156-61.
- SANTOS R.A., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., BARACHO N.C., FONTES M.A., SILVA L.C., NEVES L.A., OLIVEIRA D.R., CALIGIORNE S.M., RODRIGUES A.R., GROPEN JUNIOR C. (1994). *Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7) evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors*. *Brain Res Bull*. 35:293-298.

SANTOS R.A., FERREIRA A.J., PINHEIRO S.V., SAMPAIO W.O., TOUZY R., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. (2005). Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs*. 14:1019-31.

SANTOS R.A., SIMOES E SILVA A.C., MARIE C., SILVA D.M., MACHADO R.P., DE BUHR I. (2003). *Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor MAS*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 8258-63.

SANTOS R.A.S. e FERREIRA A.J. (2007). *Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system*. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 16:122-128.

SANTOS R.A.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., ANDRADE S.P. (2000). *Angiotensin-(1-7): na update*. *Regulatory Peptides*. 91: 45-62.

SASAKI S., DAMPNEY R.A.L. (1990). *Tonic cardiovascular effects of angiotensin II in ventrolateral medulla*. *Hypertension*. 15: 274-283.

SASAMURA H., HEIN L., KRIEGER J., PRATT R., KOBILKA B., DZAU V. (1992) *Cloning characterization and expression of 2 angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome*. *Biochem Biophys Res Commun*. 185: 253-259.

SCHER A.M. (1977). *Carotid and aortic regulation of arterial blood pressure*. *Circulation*. 56: 521-528.

SCHIAVONE M.T., BROSNIHAN K.B., KHOSLA M.C., FERRARIO C.M. (1991). *Angiotensin II activation of vasopressin release in the rat hypothalamo neurohypophysial system is mediated by the 2 angiotensin receptor*. *Hypertension Abst*. 17:425.

SESOKO S., MURATANI H., TAKISHITA S., TERUYA H., KAWAZOE N., FUKIYAMA K. (1995). *Modulation of baroreflex function by angiotensin II endogenous to the caudal ventrolateral medulla*. *Brain Research*. 671: 38-44.

SEVERS W.B., KEIL L.C., KLASE, P.A., DEEN K.C. (1981). *Urethane anesthesia in rats. Altered ability to regulate hydration*. *Pharmacology*. 22 (4): 209-226.

SEYEDABADI M., GOODCHID A. K., PILOWSKY P.M. (2001). *Differential role of kinases in brain stem of hypertensive and normotensive rats*. *Hypertension*. 38: 1087-1092.

SHALTOUT H.Á, WESTWOOD B., AVERILL D.B., FERRARIO C.M., FIGUEROA J., DIZ D.I. (2007) *Angiotensin metabolism in renal proximal tubules , urine and serum of sheep: evidence for ACE2-dependent processing of angiotensin II*. *Am J. Physiol*. 292:82-91.

SHAPOVAL L.N., SAGACH V.F., POBEGAILO L.S. (1991). *Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanism of vasomotor control in the cat*. *Neurosci Lett*. 132: 47-50.

- SHIBATA K., KOMATSU C., MISUMI Y., FURUKAWA T. (1993). *Developmental differences of angiotensinogen mRNA in the preoptic area between spontaneously hypertensive and age-matched Wistar-kyoto rats*. Mol. Brain Res. 19,115-120.
- SHIMOKAWA A., KUNITAKE T., TAKASAKI M., KANNAN H. (1998). *Differential effects of anesthetics on sympathetic nerve activity and arterial baroreceptor reflex in chronically instrumented rats*. Journal of the Autonomic nervous System. 73: 46-54.
- SILVA L.C., FONTES M.A.P., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., KHOSLA M.C., CAMPOS JrR.R., GUERTZENSTEIN P.G., SANTOS R.A.S. (1993). *Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla*. Brain Res. 613: 321-5.
- SIMÕES E SILVA A.C., BARACHO N.C., PASSAGLIO K.T., SANTOS R.A.S. (1997). *Renal actions of angiotensin-(1-7)*. Braz J Med Biol Res. 30: 503-513.
- SIMPSON K.L. e MCCLELLAN K.J. (2000). *Losartan: A Review of its Use, with Special Focus on Elderly Patients*. Drugs & Aging. 16 (3): 227.
- SMITH J.K., BARRON K.W. (1990). *The rostral and caudal ventrolateral medulla in young spontaneous hypertensive rats*. Brain Res.506: 153-8.
- SOARES M.R., RESENDE A.C., EMILIANO A.F. (2004). *The role of bradykinin, AT₂ and angiotensin-(1-7) receptors in the EDRF-dependent vasodilator effect of angiotensin II on the isolated mesenteric vascular bed of the rat*. Br J Pharmacol 141: 860-866.
- STECKELING U.M., KASCHINA E., UNGER T. (2005). *The AT₂ receptor- a matter of love and hate*.Peptides .26:1401-1409.
- STRAWN W.B., FERRARIO C.M., TALLANT E.A. (1999). *Angiotensin-(1-7) Reduces Smooth Muscle Growth After Vascular Injury*. Hypertension. 33: 207-211.
- STROBEL M., WOLLMAN H. (1969) *Pharmacology of anesthetic agents*. Fedn. Proc. 28: 1386-1403.
- SVEED A.F., ITO S., MADDEN C.J.(2000). *Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation*. Brain Res Bul. 51 (2): 120-133.
- TAKEDA K, BUNAG R.D. (1980). *Augmented sympathetic nerve activity and pressor responsiveness in DOCA hypertensive rats*. Hypertension. 2: 97-101.
- TALLANT E.A., DIZ I.D., FERRARIO C.M. (1999). *Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle*. Hypertension. 34: 950-7.
- TAMURA K., UMEMURA S., NYUI N., YAMAKAWA T., YAMA-GUCHI S., ISHIGAMI T., TANAKA S., TANIMOTO K., TAKAGI N., SEKIHARA H., MURAKAMI K., ISHI M. (1996). *Tissue-specific regulation of angiotensinogen gene expression in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension. 27: 1216-1223.

- TSUCHIHASHI T., KAGIYAMA S, MATSUMURA K, ABE I, FUJISHIMA M. (1999). *Effects of chronic oral treatment with imidapril and TCV-116 on the responsiveness to angiotensin II in ventrolateral medulla of SHR*. *Hypertens*. 17 (7): 917-922.
- TSUDA K, NISHIO, I, GIRONACCI M.M. (2005) *Angiotensin-(1-7) and Bradykinin in Norepinephrine Release in the Central Nervous System of Hypertension* . *Hypertension*. 45:e8.
- URATA H., HEALY B., STEWART R.W., BUMPUS F.M., HUNSAI A. (1990). *Angiotensin II-forminog pathways in normal and failing human hearts*. *Circulation Research*. 1990; 66: 883-890.
- VICKERS C., HALES P., KAUSHIK V., DICK L., GAVIN J., TANG J. (2002). *Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase*. *J Biol Chem*. 277: 14838-43.
- WALTERS P.E., GASPARI T.A., WIDDOP R.E. (2005). *Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats*. *Hypertension*. 45: 960-966.
- WANG D., SUMNERS C., POSNER P, GELBAND C.H. (1997). *A-type K⁺ current in neurons cultured from neonatal rat hypothalamus and brain stem: modulation by angiotensin II*. *J. Neurophysiol*. 78, 1021-1029.
- WANG J., PENG Y-J., ZHU D-N. (2005). *Amino acids modulate the hypotensive effect of angiotensin-(1-7) at the caudal ventrolateral medulla in rats*. *Regulatory Peptides*. 129: 1-7.
- WEYHENMEYER J.A., PHILLIPS M.I. (1982) *Angiotensin-like immunoreactivity in the brain of the spontaneously hypertensive rat*. *Hypertension*. 4: 514-523.
- WONG P.C., PRICE W.A., CHIU A.T., DUNCIA J.V., CARINI D.J., WEXLER R.R., JOHNSON A.L., TIMMERMANS P.B.M.W.M.(1990). *Hypotensive action of DuP 753, an angiotensin II antagonists, in spontaneously hypertensive rats*. *Hypertension*. 15: 459-468.
- WRIGHT J.W., HARDING J.W. (1995). *Brain angiotensin receptor subtypes AT1, AT2 and AT4 and their functions*. *Regul Pept*.1995; 59: 269-95.
- WRIGHT JW, HARDING JW. (1994). *Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses*. *Neurosci Biobehav. Rev*. 18: 21-53.
- WU Q., KUO H.C., DENG G.G. (2005). *Serine proteases and cardiac function*. *Biochim Biophys Acta*. 1751: 82-94.
- YAMAMOTO K., CHAPPELL M.C., BROSNIHAN K.B., FERRARIO C.M. (1994). *Conversion of angiotensin I by neutral endopeptidase(EC 3.4.24.15) in vascular smooth muscle cells*. *J Vasc Med Biol*. 5: 129-37.

YATES B.J., GOTO T., BOLTON P.S.(1993). *Responses of neurons in the rostral ventrolateral medulla of the cat to natural vestibular stimulation*. Brain Research. 601: 255-264.

ZHU D., MORIGUCHI A., MIKAMI H., HIGAKI J., OGIHARA T. (1998)*Central amino acids mediate cardiovascular response to Angiotensin II in the rat*. Brain Res. Bull. 45(2): 189-197.

ZISMAN L.S., MEIXELL G.E., BRISTOW M.R., CANVER C.C. (2003) *Angiotensin-(1-7) formation in the intact human heart: in vivo dependence on angiotensin II as substrate*. Circulation. 108: 1679-1681.

C223e ***Cangussu, Luiza Michelle.***

Efeitos cardiovasculares induzidos or antagonistas angiotensinérgicos no bulbo ventrolateral de ratos com hipertensão renovascular [manuscrito] / Luiza Michelle Cangussu. – 2008.
xx, 110 f.: il., graf., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica estrutural e fisiológica.

1. Hipertensão - Teses. 2. Hipertensão renovascular - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.12-008.331.1

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br