

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

RAFAELA MOREIRA BARBOSA

FATOR INIBITÓRIO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS: ENVOLVIMENTO NA
REGULAÇÃO CARDIOVASCULAR EM RATOS COM HIPERTENSÃO RENAL

ARARAQUARA

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

RAFAELA MOREIRA BARBOSA

**FATOR INIBITÓRIO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS: ENVOLVIMENTO NA
REGULAÇÃO CARDIOVASCULAR EM RATOS COM HIPERTENSÃO RENAL**

**Dissertação apresentada ao
Programa Interinstitucional de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas
da Universidade Federal de São
Carlos/Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em
Ciências, área de concentração:
Fisiologia.**

**Orientadora: Débora Simões
Almeida Colombari**

ARARAQUARA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

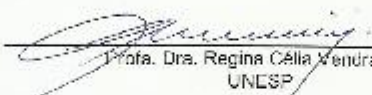
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Rafaela Moreira Barbosa, realizada em 31/08/2015:



Profa. Dra. Delora Simões de Almeida Colombari
UNESP



Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP



Profa. Dra. Regina Célia Vendramini
UNESP

DADOS CURRICULARES

RAFAELA MOREIRA BARBOSA

NASCIMENTO	31.01.1985 – Araraquara/SP
FILIAÇÃO	João Marques Barbosa Neto Silvana Moreira Marques Barbosa
2008/2012	Curso de graduação em Farmácia-Bioquímica Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP
2013/2015	Curso de pós-graduação em Ciências Fisiológicas, nível de mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Programa Interinstitucional de Pós- Graduação UFSCAR/UNESP)

**AO MEU PAI,
JOÃO**

**À MINHA MÃE,
SILVANA**

**ÀS MINHAS IRMÃS,
NATÁLIA E CAROLINA**

Obrigada pelo amor incondicional.

Agradecimentos

À Deus, por sempre ter me acompanhado e me abençoado nesta minha caminhada.

Aos meus pais, João e Silvana, pelo amor, carinho e apoio, pela confiança e pelos ensinamentos ao longo de toda a vida. Às minhas irmãs, Natália e Carolina, pelo amor, carinho, apoio. Ao meu noivo André, pelo amor, companheirismo, paciência e ajuda em todos os momentos.

À Prof^a. Dr^a. Débora Simões Almeida Colombari, pela orientação desde a iniciação científica, confiança, paciência, oportunidade de ingresso neste programa de pós-graduação e por todo o conhecimento transmitido.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP – Araraquara e do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pelo conhecimento adquirido.

Ao Dr. Daniel Penteado, FMRP-USP, pelo auxílio na análise dos dados de variabilidade da pressão arterial.

Ao Dr. Colin Sumners, da Universidade da Flórida, por ter cedido os vetores virais utilizados neste estudo e por ter contribuído para a discussão dos dados.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP – Araraquara, pelo auxílio na execução deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, pelo companheirismo.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPESP, por tornarem possível a realização deste trabalho. Agradeço à CNPq, pela concessão da bolsa.

A todos, expresso minha mais profunda gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	25
3 MÉTODOS.....	26
3.1 Animais.....	26
3.2 Cirurgia para desenvolvimento da hipertensão 2R1C.....	26
3.3 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca por telemetria.....	26
3.4 Registro da pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda.....	27
3.5 Microinjeções no NTS.....	27
3.6 Canulação da artéria e veia femorais para o teste dos reflexos.....	28
3.7 Variabilidade cardiovascular.....	29
3.8 Animais naïves.....	29
3.9 Eutanásia.....	30
3.10 Análise para detecção de MIF por meio de imunohistoquímica.....	30
3.11 Análise para detecção de MIF por meio de RT-PCR no NTS.....	31
3.12 Análise dos rins.....	31
3.13 Análise estatística.....	32
3.14 Protocolos experimentais.....	32
3.14.1 <i>Efeito da super-expressão de MIF no NTS sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 2R1C.....</i>	<i>32</i>
3.14.2 <i>Efeito da super-expressão de MIF no NTS sobre o barorreflexo.....</i>	<i>32</i>
4.1 Expressão de MIF e GFP no NTS.....	34
4.2 Níveis de RNAm para MIF no NTS mediada por vetor viral.....	38
4.3 Aumento na expressão de MIF no NTS atenua o desenvolvimento da hipertensão 2R1C.....	39
4.4 Função barorreflexa foi melhorada após o aumento da expressão de MIF no NTS de ratos 2R1C.....	41
4.5 Modulação simpática não foi alterada após o aumento na expressão de MIF no NTS de ratos 2R1C.....	43
5 DISCUSSÃO.....	46

6 CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema mostrando a indução da hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe (2R1C) e a conseqüente exacerbação do sistema renina-angiotensina. ECA, enzima conversora de angiotensina. AT1, receptor de angiotensina II do tipo 1 (adaptado de <http://www.transonic.com/resources/research/renovascular-hypertension-model/>)...18

Figura 2 - Esquema mostrando as três fases da evolução da hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe (2R1C) (adaptado de Martinez-Maldonado, 1991).....19

Figura 3 - Alterações na pressão arterial média (MBP; painel superior) e ganho do barorreflexo cardíaco espontâneo (sBRG of HR; painel inferior) em ratos com hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe 2R1C e normotensos (retirado e adaptado de Oliveira-Sales et. al, 2014).19

Figura 4 - Representações esquemáticas do NTS intermediário (A) e NTS comissural (B) (adaptado de Paxino & Watson,1986). AP, área postrema; cc, canal central; X, núcleo dorsal motor do vago; XII, núcleo do hipoglosso; Gr, núcleo grácil; Cu, núcleo cuneiforme.21

Figura 5 - Representação esquemática da divisão anatômica do NTS em três porções: rostral, intermediário e comissural (adaptado de Herbert et al. 1990). AP, área postrema.21

Figura 6 - MIF endógeno. Fotomicrografias de fluorescência representativas foram feitas a partir de secções coronais do bulbo nos ratos naïves 2R1C e NT. (A e B) mostram a imunorreatividade ao MIF no nível do NTS intermediário (AP, área postrema; cc, canal central; X, núcleo dorsal motor do vago. Escala = 100 µm em (A) e 50 µm em (B).35

Figura 7 - Transdução de MIF no NTS mediada por vetor viral. Fotomicrografias de fluorescência representativas foram feitas a partir de secções coronais do bulbo nos ratos 2R1C e normotensos (NT), que receberam microinjeções de MIF no NTS, conforme descrito nos Métodos. (A) mostra a imunorreatividade da super-expressão de MIF no nível do NTS intermediário (NTSi) e (B) no NTS comissural (NTSc). AP, área postrema; cc, canal central; X, núcleo dorsal motor do vago. Escala = 100 µm.36

Figura 8 - Transdução de GFP no NTS mediada por vetor viral. Fotomicrografias de fluorescência representativas foram feitas a partir de secções coronais do tronco

encefálico nos ratos 2R1C e normotensos (NT), que receberam microinjeções de GFP no NTS, conforme descrito nos Métodos. (A) mostra a imunorreatividade da super-expressão de GFP no nível do NTS intermediário (NTSi) e (B) no NTS comissural (NTSc). AP, área postrema; cc, canal central; X, núcleo dorsal motor do vago. Escala = 100 μ m.37

Figura 9 - Níveis de RNAm para MIF no NTS de ratos 2R1C e NT. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n representa o número de ratos por grupo. * $p < 0,05$ vs. GFP. Análise de variância de uma via, associada ao teste de Student-Newman-Keuls.38

Figura 10 - Valores de PAM (mmHg) e FC (bpm) de ratos com hipertensão 2R1C e ratos NT, registrados nos ciclos claro (A e B) e escuro (C e D), nas semanas indicadas antes e após as injeções dos vetores virais (AAV2-CBA-eGFP, símbolos abertos; AAV2-CBA-MIF, símbolos fechados) no NTS. As injeções dos vetores virais foram feitas na 3ª semana após a colocação do clipe de prata ou cirurgia fictícia (seta). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n representa o número de ratos por grupo. * $p < 0,05$ vs. NT a partir da 2ª semana de registro; # $p < 0,05$ vs. 2R1C-GFP. Análise de variância de duas vias, associada ao teste de Student-Newman-Keuls.40

Figura 11 - Registro da PAM e FC e teste da função barorreflexa. Valores basais de (A) PAM, (B) FC e (C) curvas da função do barorreflexo em ratos NT ou com hipertensão renovascular 2R1C após 4 semanas da da microinjeção no NTS de AAV2-CBA-eGFP ou AAV2-CBA-MIF. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n indica o número de animais por grupo. * $p < 0,05$ vs. NT; # $p < 0,05$ vs. 2R1C-GFP. Análise de variância de uma via, associada ao teste de Student-Newman-Keuls.42

Figura 12 - Potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS) dos animais NT e com hipertensão 2R1C, com a super-expressão de GFP ou de MIF. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n indica o número de animais por grupo. * $p < 0,05$ vs. NT. Análise de variância de uma via, associada ao teste de Student-Newman-Keuls.44

Figura 13 - Multiplicidade das ações sistêmicas da ANG II. ADH, hormônio antidiurético; SNC, sistema nervoso central; FSR, fluxo sanguíneo renal (adaptado de Navar et al., 1998).46

Figura 14 - Esquema mostrando as ações da ANG II, via receptor AT1 e o efeito contra-regulatório do MIF.51

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Razão entre os pesos do rim esquerdo/rim direito (RE/RD) de ratos 2R1C e de ratos NT 4 semanas após microinjeção no NTS de AAV2-CBA-eGFP ou AAV2-CBA-MIF.....	45
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2R1C – 2 rins, 1 clipe

AAV2 – adenovírus associado do tipo 2

ADH – hormônio antidiurético

ANG II – angiotensina II

AP – área postrema

AT1 – receptor de angiotensina II do tipo 1

AT2 – receptor angiotensina II do tipo 2

AVC – acidente vascular cerebral

cc – canal central

CVL – bulbo caudo ventrolateral

Cu – núcleo cuneiforme

DOCA – desoxicorticosterona

ECA – enzima conversora de angiotensina

EPM – erro padrão da média

EROs – espécies reativas de oxigênio

FC – frequência cardíaca

FSR – fluxo sanguíneo renal

GFP – proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*)

Gr – núcleo grácil

IL- interleucina

im – intramuscular

LF – low frequency

MIF – fator inibitório da migração de macrófagos

NT - normotenso

NTS – núcleo do trato solitário

NTSc – NTS comissural

NTSi – NTS intermediário

PAM – pressão arterial média

PAP – pressão arterial pulsátil

PAS – pressão arterial sistólica

pc – peso corporal

PFA - paraformaldeído

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

RT-PCR – real-time polymerase chain reaction

RVL – bulbo rostroventrolateral

sc - subcutâneo

SHR – ratos espontaneamente hipertensos

SNC – sistema nervoso central

SRA – sistema renina-angiotensina

TPOR – proteína tiol-oxireductase

X – núcleo dorsal motor do vago

XII – núcleo do hipoglosso

RESUMO

Os altos níveis de pressão arterial atingem cerca de 22% da população mundial, aumentando os fatores de risco para doenças coronarianas, infarto e falência cardíaca. Muitos estudos tentam entender as causas da hipertensão e os possíveis mecanismos que facilitem o tratamento da hipertensão. O sistema nervoso central parece ter um papel chave no desenvolvimento e na manutenção da hipertensão. Dentre as diversas áreas encefálicas, podemos destacar o papel do núcleo do trato solitário (NTS), que é o sítio primário das aferências viscerais. O fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) é um regulador inibitório intracelular das ações da angiotensina II (ANG II) em receptores do subtipo AT1. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) bem como os ratos com hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe (2R1C), exibem uma atividade aumentada do sistema renina-angiotensina, do sistema nervoso simpático e uma diminuição da função do barorreflexo. Recentemente demonstramos que a super-expressão de MIF no NTS de SHRs reduziu a pressão arterial destes animais bem como melhorou a função do barorreflexo. Portanto, neste estudo testamos se a expressão aumentada de MIF no NTS de ratos 2R1C poderia atenuar o desenvolvimento da hipertensão e melhorar a função do barorreflexo nestes animais. Para tanto, a artéria renal esquerda foi parcialmente obstruída em ratos Holtzman (150-180 g) utilizando um clipe de prata (0,2 mm de abertura) para induzir a hipertensão 2R1C (n = 5-10/grupo) ou a cirurgia fictícia [ratos normotensos (NT); n = 5-11/grupo] foi realizada. Três semanas após a inserção do clipe renal ou após a cirurgia fictícia, os ratos receberam microinjeções do vetor viral AAV2-CBA-MIF no NTS para aumentar a expressão de MIF na área ou de AAV2-CBA-eGFP, que promoveu a expressão de GFP (proteína fluorescente verde), que serviu como vetor controle. A pressão arterial e a frequência cardíaca foram registradas por telemetria e testes do barorreflexo foram realizados. Ao término dos experimentos, os encéfalos foram colhidos para imunohistoquímica ou RT-PCR. As microinjeções de MIF no NTS atenuaram a hipertensão em ratos 2R1C a partir de 2 semanas após a transfecção viral até o fim dos experimentos (4 semanas após a transfecção), (2R1C-MIF: 145 ± 7 , vs. 2R1C-eGFP: 176 ± 9 mmHg; $p < 0,05$). MIF no NTS também melhorou a bradicardia reflexa (2R1C-MIF slope: $-1,4 \pm 0,3$, vs. 2R1C-eGFP slope: $-0,41 \pm 0,3$ bpm/mmHg; $p < 0,05$) e taquicardia reflexa (2R1C-MIF slope: $-4,7 \pm 0,6$, vs. 2R1C-eGFP slope: $-1,7 \pm 0,3$ bpm/mmHg; $p < 0,05$).

A frequência cardíaca basal foi diminuída em ratos 2R1C-MIF. Em contraste com os ratos 2R1C, MIF super-expresso no NTS de ratos normotensos não produziu alteração na pressão arterial ou na função do barorreflexo. Como esperado, a transdução de MIF no NTS aumentou os níveis de RNAm para MIF no mesmo local (NT-MIF: $3,80 \pm 0,97$, vs. NT-eGFP: $1,00 \pm 0,16$ número de vezes e 2R1C-MIF: $3,53 \pm 0,68$, vs. 2R1C-eGFP: $0,88 \pm 0,09$ número de vezes; $p < 0,05$). Estes resultados sugerem que a expressão aumentada de MIF nos neurônios do NTS atenua a hipertensão, melhora a função do barorreflexo em ratos 2R1C, possivelmente através de uma ação anti-ANG II.

Palavras-chaves: hipertensão renovascular, núcleo do trato solitário, fator inibitório da migração de macrófagos.

ABSTRACT

The high blood pressure levels reach about 22% of the world population, increasing the risk factors for coronary disease, heart attack and heart failure. Many studies have tried to understand the causes of hypertension and possible mechanisms to facilitate the treatment of hypertension. The central nervous system seems to play a key role in the development and maintenance of hypertension. Among the various brain areas, we can highlight the role of the nucleus of the solitary tract (NTS), which is the primary site of visceral afferents. The macrophage migration inhibitory factor (MIF) is an intracellular inhibitory regulator of the actions of angiotensin II (ANG II) in the ANG II type 1 receptors. The spontaneously hypertensive rats (SHRs) and the rats with renovascular hypertension 2 kidney, 1 clip (2K1C) exhibit an increased activity of the renin-angiotensin system, increased sympathetic activity and reduced baroreflex function. We recently demonstrated that MIF overexpression in the NTS of SHRs lowers blood pressure of these animals and improved the function of the baroreflex. Therefore, in this study we tested if increased expression of MIF in the NTS of the 2K1C rats could alter the development of hypertension and improve the baroreflex function in these animals. For this, the left renal artery was partially obstructed in male Holtzman rats (150-180 g) using a silver clip (0.2 mm width) to induce 2K1C hypertension (n = 5-10/group) or sham surgery [normotensive rats (NT); n = 5-11/group] was performed. Three weeks after renal clip placement or sham surgery, rats received AAV2-CBA-MIF microinjections into the NTS to increase MIF expression in the area or AAV2-CBA-eGFP, which promoted the expression of GFP (enhanced green protein), which served as a control vector. Arterial pressure and heart rate were recorded by telemetry and baroreflex tests were performed. At the end of the experiments, the brains were harvested for immunohistochemistry RT-PCR. MIF injections into the NTS attenuated the hypertension in 2K1C rats from 2 weeks after viral transfection until the end of the experiment (4 weeks after viral transfection), (2K1C-MIF: 145 ± 7 , vs. 2K1C-eGFP: 176 ± 9 mmHg; $p < 0.05$). MIF into the NTS also improved the reflex bradycardia (2K1C-MIF slope: -1.4 ± 0.3 , vs. 2K1C-eGFP slope: -0.41 ± 0.3 bpm/mmHg; $p < 0.05$) and reflex tachycardia (2K1C-MIF slope: -4.7 ± 0.6 , vs. 2K1C-eGFP slope: -1.7 ± 0.3 bpm/mmHg; $p < 0.05$). Baseline heart rate was decreased in 2K1C-MIF rats. In

contrast to 2K1C rats, MIF overexpressed in the NTS in normotensive rats produced no change in arterial pressure neither baroreflex function. As expected, the transduction of MIF in the NTS increased mRNA levels for MIF at the same site (NT-MIF: 3.80 ± 0.97 , vs. NT-eGFP: 1.00 ± 0.16 fold change and 2K1C-MIF: 3.53 ± 0.68 , vs. 2K1C-eGFP: 0.88 ± 0.09 fold change; $p < 0.05$). These results suggest that increased expression of MIF in neurons within NTS attenuates the hypertension and improves baroreflex function in 2K1C rats, possibly through anti-ANG II actions.

Keywords: renovascular hypertension, nucleus of the solitary tract, macrophage migration inhibitory factor.

1 INTRODUÇÃO

A manutenção e regulação da pressão arterial envolvem mecanismos complexos, tais como regulação local, hormonal, neural e renal. Esses mecanismos atuam em conjunto e são responsáveis pela redistribuição dos fluxos sanguíneos regionais por meio de alterações na resistência periférica e no débito cardíaco nas diversas situações comportamentais a que os mamíferos são submetidos. Desta forma, o controle da pressão arterial é essencial para uma adequada perfusão tecidual.

A hipertensão, usualmente chamada de pressão alta, é por definição um aumento crônico nos valores da pressão arterial. Uma hipertensão arterial já está bem estabelecida quando o valor da pressão arterial sistólica é maior ou igual a 140 mmHg e o valor da pressão arterial diastólica é maior ou igual a 90 mmHg (Grassi et al., 2012). Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde e da Sociedade Brasileira de Hipertensão, aproximadamente 22% da população mundial acima de 18 anos tem níveis aumentados de pressão arterial, hipertensão, aumentando o risco de doenças coronarianas, de infarto e de insuficiência cardíaca congestiva (http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence/en/; <http://www.sbh.org.br/>) (Feitosa et al., 2012).

Existem duas linhas científicas que tentam estabelecer os possíveis mecanismos para o desenvolvimento e a manutenção da hipertensão. A primeira delas defende que alterações na função renal agiriam como gatilho para a hipertensão. Esta linha de estudo é chamada de “Guytoniana”. Já outros pesquisadores acreditam que alterações em áreas do sistema nervoso central (SNC) levariam a alterações no sistema nervoso autônomo, gerando então uma hipertensão “neurogênica”. Sabemos, no entanto, que a hipertensão é uma doença multifatorial e que é também influenciada por outros fatores como genética, alimentação e atividade física. Por isso, ambas as linhas de pesquisa são importantes para o entendimento desta patologia. Sabe-se, inclusive, que clinicamente quando se usa apenas uma droga que atue em um desses fatores (renal ou neurogênico) é comum que esse tratamento se torne falho ao tentar reestabelecer a pressão arterial a níveis normais em pacientes com hipertensão

essencial (Grassi et al., 2010;Grassi et al., 2012). Assim, como discutido por Mann (Mann, 2003), outros estudos se fazem necessários para que o conhecimento nessa área seja aprofundado, levando assim ao melhor controle desta patologia em pacientes.

Vários modelos experimentais já foram desenvolvidos para se estudar a hipertensão gerada por diferentes causas, como o modelo genético de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Okamoto and Aoki, 1963), o modelo de hipertensão gerada pela infusão crônica do peptídeo angiotensina II (ANG II) (Bruner et al., 1985), modelos que dependem da associação entre deoxicorticosterona (DOCA) e uma dieta rica em sódio (Bell and McLachlan et al., 1979) e o modelo de hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe (2R1C) (Goldblatt et al., 1934).

O modelo de hipertensão renovascular 2R1C desenvolvido há aproximadamente 80 anos por Goldblatt (Goldblatt, 1938;Goldblatt et al., 1934), apresenta similaridades com a hipertensão renovascular em humanos que corresponde a aproximadamente 5-7% das hipertensões em idosos (Hansen et al., 2002). Pacientes com hipertensão renovascular tem um aumento dos níveis de renina plasmática e aumento da atividade simpática (Johansson et al., 1999;Petersson et al., 2002;Remuzzi, 1999). A hipertensão renovascular é um tipo de hipertensão de causa secundária (diferente da hipertensão primária ou essencial), decorrente de uma estenose significativa da artéria renal (Baekey et al., 2010;Pradhan and Rossi, 2013). Em animais, este modelo de hipertensão renovascular é feito através da oclusão parcial de uma das artérias renais por um clipe de prata, promovendo assim uma constrição parcial desta artéria, o que leva a um aumento nos níveis de renina circulante e conseqüente exacerbação do sistema renina-angiotensina (SRA) (Berg et al., 1979;Goldblatt et al., 1934;Leenen and De, 1970;Leenen and De, 1975), Figura 1. Além da hiperatividade do SRA, é também observado um aumento da atividade simpática e redução do barorreflexo (Berenguer et al., 1991;Berg et al., 1979;Blanch et al., 2014;Leenen and De, 1970;Leenen and De, 1975;Oliveira-Sales et al., 2009;Oliveira-Sales et al., 2014;Tsyrlin et al., 2013).

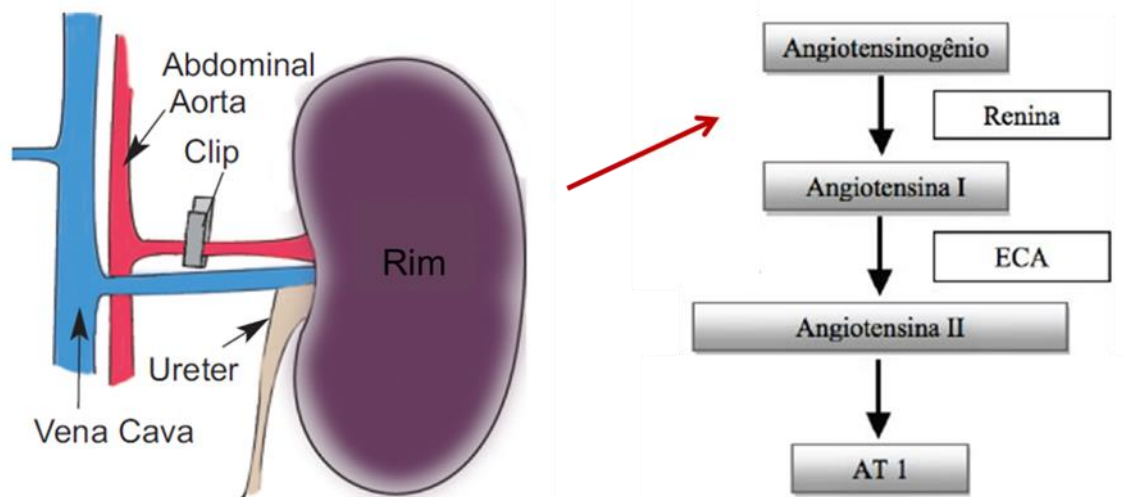


Figura 1 - Esquema mostrando a indução da hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe (2R1C) e a conseqüente exacerbação do sistema renina-angiotensina. ECA, enzima conversora de angiotensina. AT1, receptor de angiotensina II do tipo 1 (adaptado de <http://www.transonic.com/resources/research/renovascular-hypertension-model/>).

Em 1991, Martinez-Maldonado dividiu o desenvolvimento da hipertensão renovascular em ratos em 3 fases (Martinez-Maldonado, 1991). A fase I ocorre durante as 4 primeiras semanas após a clipagem da artéria renal; nesta fase existe um aumento da renina e ANG II circulantes. Caso o clipe seja removido durante a fase I, ocorre uma rápida normalização da pressão arterial. A fase II, mais conhecida pela retenção de sal, ocorre durante as 5ª e 8ª semanas após a clipagem da artéria renal; as características desta fase são uma maior sensibilidade à ANG II. Se o clipe for removido durante a fase II, a pressão arterial se normaliza, porém, o tempo para essa normalização é maior do que na fase I. E a fase III ocorre na 9ª semana em diante após a clipagem da artéria renal. A remoção do clipe nesta fase não é capaz de normalizar a pressão arterial (Figura 2). A partir da fase I já há uma alteração na função do barorreflexo e um aumento significativo da pressão arterial (Oliveira-Sales et al., 2014), Figura 3. Embora alguns estudos demonstraram que a renina plasmática esteja diminuída a partir da fase II desta hipertensão, dados não publicados do nosso laboratório e da literatura (Berg et al., 1979; Leenen and De, 1970; Leenen and De, 1975) tem demonstrado que a renina circulante permanece elevada pelo menos até a 6ª semana após a clipagem da artéria renal.

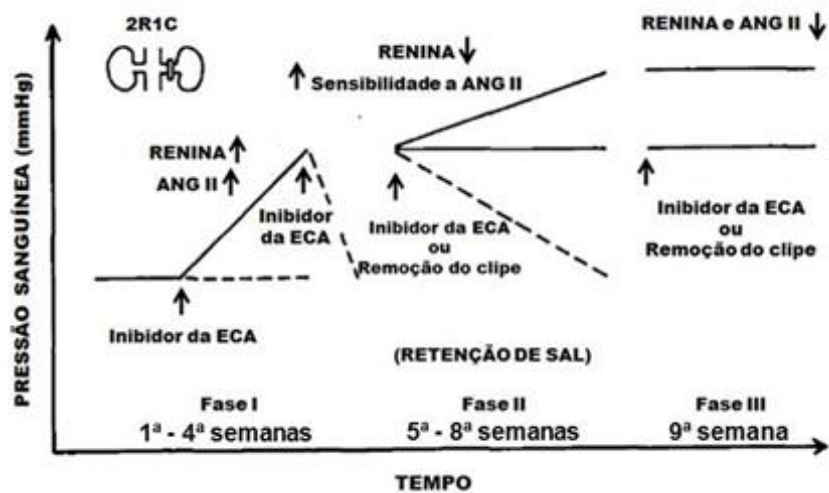


Figura 2 - Esquema mostrando as três fases da evolução da hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe (2R1C) (adaptado de Martinez-Maldonado, 1991).

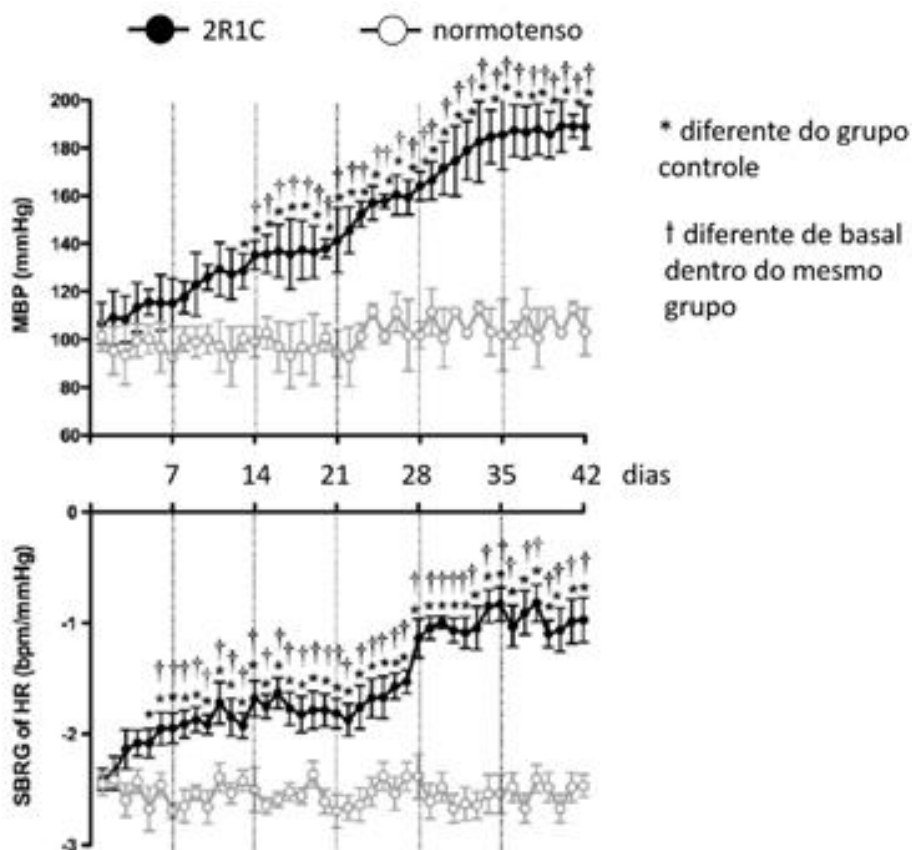


Figura 3 - Alterações na pressão arterial média (MBP; painel superior) e ganho do barorreflexo cardíaco espontâneo (sBRG of HR; painel inferior) em ratos com hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe 2R1C e normotensos (retirado e adaptado de Oliveira-Sales et. al, 2014).

Conforme demonstrado acima (ver Figura 3), esta hipertensão inicia-se com aproximadamente 3 semanas após a inserção do clipe ao redor de uma das artérias renais e estabiliza-se após 5 semanas (Blanch et al., 2014;Martinez-Maldonado, 1991;Oliveira-Sales et al., 2014;Pradhan and Rossi, 2013). Tendo em vista que os animais 2R1C tem alteração no barorreflexo e na atividade simpática, a participação do SNC no desenvolvimento desta hipertensão tem sido demonstrada por diferentes estudos (Blanch et al., 2014;Carvalho et al., 2003;Marson et al., 1983;Oliveira-Sales et al., 2009). Desta forma, é de grande interesse compreender os mecanismos fundamentais que desencadeiam as alterações no barorreflexo e na atividade simpática para o desenvolvimento e manutenção de estratégias terapêuticas que irão reduzir a pressão arterial em indivíduos hipertensos e modelos animais com hipertensão neurogênica.

Há uma série de evidências experimentais mostrando que estruturas bulbares e hipotalâmicas regulam o fluxo autonômico cardiovascular [revisão em (Guyenet, 2006)]. Dentre as estruturas bulbares importantes para o controle cardiovascular, podemos citar o núcleo do trato solitário (NTS). O NTS é constituído por grupos heterogêneos de neurônios, dispostos dorsalmente no bulbo, que se estendem no sentido rostro-caudal, desde a extremidade caudal no núcleo do nervo facial até a parte caudal da decussação piramidal (Ciriello et al., 1994;Ter Horst and Streefland, 1994). A parte rostral é formada por colunas bilaterais, que se unem na altura do óbex para formar uma única estrutura na linha média. No sentido rostro-caudal, considerando a proximidade com a área postrema, o NTS pode ser dividido em três porções: NTS rostral, NTS intermediário e NTS comissural (Cottle, 1964;Herbert et al., 1990), conforme podemos observar nas Figuras 4 e 5.

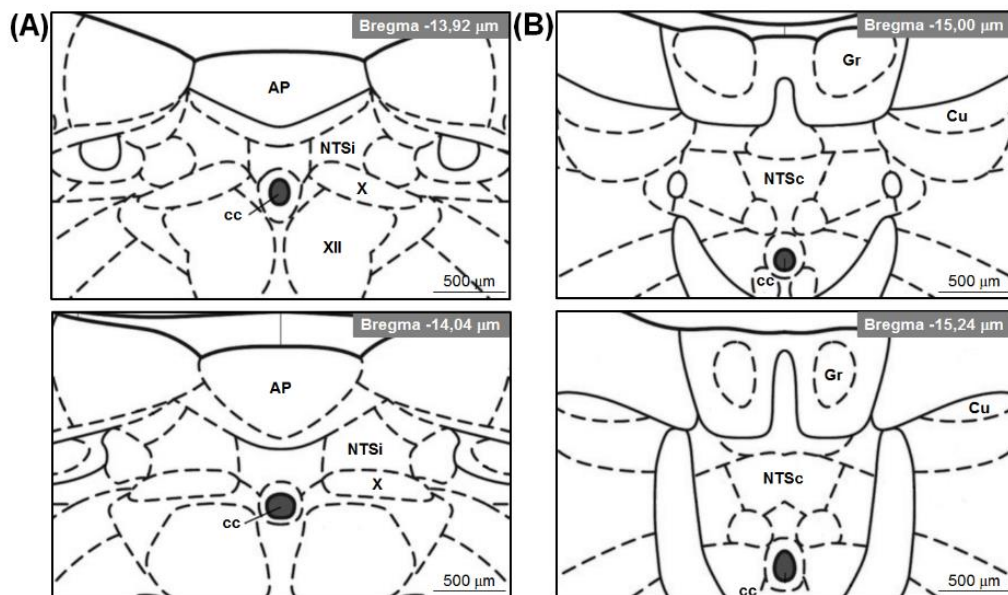


Figura 4 - Representações esquemáticas do NTS intermediário (A) e NTS comissural (B) (adaptado de Paxino & Watson, 1986). AP, área postrema; cc, canal central; X, núcleo dorsal motor do vago; XII, núcleo do hipoglosso; Gr, núcleo grácil; Cu, núcleo cuneiforme.

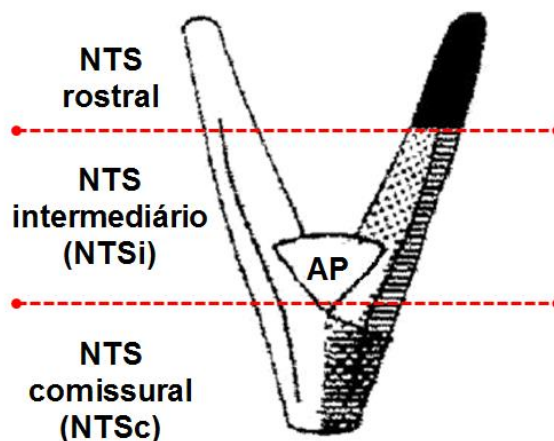


Figura 5 - Representação esquemática da divisão anatômica do NTS em três porções: rostral, intermediário e comissural (adaptado de Herbert et al. 1990). AP, área postrema.

O NTS é o sítio primário das aferências viscerais, incluindo as aferências cardiovasculares, ou seja, é no NTS que ocorre a primeira sinapse dos

barorreceptores arteriais, dos quimiorreceptores arteriais e dos receptores cardiopulmonares (Ciriello et al., 1994;Cottle, 1964;Ter Horst and Streefland, 1994). Do NTS, ocorrem conexões sinápticas com diferentes áreas do tronco cerebral envolvidas com o controle autonômico da circulação, como o bulbo rostroventrolateral (RVL) e o bulbo caudoventrolateral (CVL) (Guyenet, 2006;Ross et al., 1985). Além de ser uma área essencial para a regulação do barorreflexo e quimiorreflexo (Colombari et al., 1996;Furuya et al., 2014;Reis et al., 1981;Talman et al., 1980), é importante salientar que o NTS também tem um papel muito importante para modular a pressão arterial e a atividade simpática em animais hipertensos (Blanch et al., 2014;Freiria-Oliveira et al., 2013;Moreira et al., 2009;Sato et al., 2001). A lesão eletrolítica da porção comissural do NTS reduz a pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (Moreira et al., 2009;Sato et al., 2001). Ademais, recentemente, nosso laboratório demonstrou que o aumento na expressão de receptores tipo 2 (AT2) de ANG II no complexo solitário-vagal, induzido por vetor viral, atenuou o pleno desenvolvimento da hipertensão e restaurou a função do barorreflexo em ratos hipertensos 2R1C.

O SRA tem sido, há várias décadas, alvo de estudos para o controle da hipertensão e, dados da literatura demonstraram que seus constituintes estão aumentados em SHR (Morishita et al., 1995;Veerasingham and Raizada, 2003), bem como em ratos com hipertensão renovascular 2R1C (Oliveira-Sales et al., 2010). Deste modo, os mecanismos da ativação dos receptores angiotensinérgicos são alvo dos estudos para o entendimento do controle da hipertensão em diferentes modelos de hipertensão, incluindo a hipertensão renovascular 2R1C.

Há pelo menos duas grandes classes de receptores de ANG II, o subtipo AT1 e o subtipo AT2, (De Gasparo et al., 2000), que foram identificados em vários tecidos de mamíferos adultos, incluindo o SNC (Allen et al., 1987;Tsutsumi and Saavedra, 1991;Tsutsumi et al., 1993;Yu et al., 2010). Evidências experimentais sugerem que os receptores AT1, quando ativados, seriam responsáveis pelas respostas clássicas da ANG II, como hipertensão, aumento da atividade simpática e aumento da ingestão de água e de sódio (Kaschina and Unger, 2003;McKinley et al., 1996). Por outro lado, a ativação de receptores AT2 promoveria muitas vezes ações antagônicas àquelas observadas pela ativação de receptores AT1, como por exemplo, hipotensão e natriurese (Carey, 2013;Foulquier et al., 2013;Kaschina and

Unger, 2003). Ademais, sabe-se que o peptídeo ANG II é um importante fator para os aumentos na atividade nervosa simpática e para a inibição do barorreflexo, atuando em receptores do subtipo AT1 centrais (Chen et al., 2011; de Oliveira-Sales et al., 2010; Matsumura et al., 1998; Michelini and Bonagamba, 1990; Nishi et al., 2013; Paton and Kasparov, 1999; Toney and Porter, 1993). O NTS é rico em receptores AT1 (Allen et al., 1987; Allen et al., 1988) que, uma vez ativado diminui a função do barorreflexo (Matsumura et al., 1998; Michelini and Bonagamba, 1990; Paton and Kasparov, 1999). Dados recentes de Oliveira-Sales et al. (Oliveira-Sales et al., 2014) sugerem que a diminuição da função barorreflexa em ratos 2R1C pode estar associada aos maiores níveis de ANG II neste modelo de hipertensão renovascular.

Recentemente a função do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) no controle neural da pressão arterial tem sido investigada em diferentes estudos (Busche et al., 2001; Colombari et al., 2010; Freiria-Oliveira et al., 2013; Li et al., 2006; Li et al., 2008). Foi descrito há pouco mais de uma década que o MIF é um regulador inibitório para as ações intracelulares da ANG II (Busche et al., 2001; Sun et al., 2004). O MIF é uma proteína de 12,5 kDa, que é expressa em células do tecido imunológico e tem funções já estabelecidas nas respostas imunes [revisão em (Calandra and Roger, 2003)]. Ademais, no SNC, o MIF é expresso em neurônios do hipotálamo, córtex, hipocampo, ponte e bulbo, incluindo o NTS (Bacher et al., 1998; Colombari et al., 2010; Freiria-Oliveira et al., 2013). Evidências experimentais têm demonstrado que o MIF exerce suas funções enzimáticas intracelulares por meio da proteína TPOR (proteína tiol-oxireductase) que tem ação intrínseca tiol-oxireductase, sendo considerada não apenas uma citocina, mas uma “citoenzima” (Busche et al., 2001; Colombari et al., 2010). Os efeitos da ANG II em receptores AT1 no SNC têm sido descritos depender da formação de espécies reativas de oxigênio (Zimmerman and Davisson, 2004; Zimmerman et al., 2002). As ações dipsogênicas e pressoras induzidas pela injeção intracerebroventricular de ANG II são reduzidas em animais que tiveram os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) transfectados com o vetor viral que promove a super-expressão da proteína MIF (Li et al., 2006). Com isso, tem sido discutido que o MIF atuaria como um contra-regulador intracelular das ações da ANG II atuando em receptores AT1, provavelmente atuando como sequestrador de espécies reativas de oxigênio

formadas a partir da ligação da ANG II aos receptores AT1 (Li et al., 2006;Li et al., 2008).

Em estudo recente de nosso laboratório, demonstramos que a super-expressão de MIF no NTS de SHR reduziu os níveis pressóricos mais altos destes animais (Freiria-Oliveira et al., 2013), entretanto, não se sabe, até o momento, os efeitos da super-expressão de MIF no NTS sobre o desenvolvimento e a manutenção da hipertensão em ratos 2R1C, os quais tem uma hiperatividade do SRA e um aumento do estresse oxidativo central (Nishi et al., 2013;Oliveira-Sales et al., 2009). Uma vez que os animais 2R1C tem prejuízo do barorreflexo (Berenguer et al., 1991;Blanch et al., 2014;Britto et al., 1997), também seria interessante estudar os efeitos da super-expressão de MIF no NTS de ratos hipertensos 2R1C e verificar se com esta super-expressão há uma melhora no ganho do barorreflexo, à semelhança do que foi demonstrado em estudo anterior em SHR (Freiria-Oliveira et al., 2013).

Neste projeto foram utilizados vetores virais cedidos pelo laboratório do Dr. Colin Sumners (projeto colaboração FAPESP – University of Florida 2013/02607-0). Foram utilizados vetores virais (adenovírus associados – AAV2) para transferência gênica (transfecção) no NTS. Este método nos oferece algumas vantagens, tais como: a) obter dados controles do mesmo animal antes da manipulação genética; b) restringir a manipulação genética a regiões específicas do encéfalo; c) é um método altamente específico para determinado alvo, portanto, sem os problemas da falta de especificidade que ocorre com algumas ferramentas farmacológicas; d) especificidade celular da expressão gênica. A taxa de transfecção, quando injetados diretamente no encéfalo de ratos por estereotaxia, é muito alta e com grande eficácia fisiológica. Vale ressaltar que um dos pré-requisitos para a utilização de vetores virais é que os mesmos sejam incapazes de se replicar [revisão em (Carter and Murphy, 1999)].

2 OBJETIVOS

A fim de nos ajudar a compreender melhor a patologia da hipertensão renovascular, os objetivos do presente estudo foram estudar em ratos normotensos (NT) e com hipertensão renovascular 2R1C os efeitos da super-expressão de MIF no NTS sobre o desenvolvimento e a manutenção desta hipertensão. Uma vez que os ratos 2R1C tem prejuízo da função barorreflexa, também estudamos os efeitos da super-expressão de MIF no NTS sobre os reflexos cardiovasculares nestes animais.

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Holtzman jovens (150-180 g) foram utilizados para a indução da hipertensão renovascular 2R1C, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia e Farmácia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Araraquara. Os animais foram mantidos com água e ração granulada *ad libitum* em ambiente com temperatura (23 ± 2 °C) e umidade ($55 \pm 10\%$) controladas e ciclo claro/escuro de 12:12 horas. A Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista aprovou todos os protocolos experimentais utilizados (Proc. CEUA 17/2014).

3.2 Cirurgia para desenvolvimento da hipertensão 2R1C

Para todas as cirurgias, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (80 mg/kg de peso corporal (pc); Cristália, Itapira, SP, Brasil) combinada com xilazina (7 mg/kg de p.c.; Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil); a seguir, foram posicionados em uma mesa cirúrgica e foi feita uma laparotomia para exposição do rim esquerdo. A artéria renal foi então cuidadosamente limpa e isolada para a colocação de um clipe de prata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que ocluiu parcialmente a artéria (diâmetro interno de 0,2 mm). Nos animais com cirurgia fictícia (ratos NT), o mesmo procedimento cirúrgico foi feito, exceto a inserção do clipe de prata.

3.3 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca por telemetria

As variáveis cardiovasculares, pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), foram monitoradas continuamente em animais acordados através de transdutores de telemetria (DSI, St. Paul, MN, EUA), que foram implantados na aorta abdominal dos animais logo após a colocação do clipe de prata na artéria renal esquerda, conforme descrito acima. Em seguida, a incisão foi suturada e os animais foram tratados com uma dose profilática de antibiótico intramuscular (im) (benzilpenicilina – 80,000 UIs e estreptomicina – 33 mg; Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte, Ford Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, Brasil) e de anti-

inflamatório subcutânea (sc) (cetoprofeno 1% - 0,03 mL/rato; Ketoflex, Mundo Animal, São Paulo, Brasil) para prevenir infecção e dor/inflamação pós-operatórios. O primeiro registro foi realizado 1 semana após a clipagem do rim esquerdo e implante do transdutor de telemetria (modelo TA11PA-C40; Data Sciences Int., St. Paul, MN, USA), que foi implantado na aorta descendente, contra o fluxo sanguíneo, para registrar a pressão arterial. Dataquest 4.31 software (Data Sciences Int.) foi utilizado para analisar os dados brutos, que são expressos como PAM e FC. Os registros de pressão arterial foram programados com as seguintes condições: segmentos de 24 h/d, 5 min/h e 20 s, a uma frequência de 1000 Hz. O método da telemetria nos permite o registro das variáveis cardiovasculares por um longo período de tempo (várias semanas). As variáveis cardiovasculares foram monitoradas uma vez por semana por 24 h, a partir da 1ª semana após a clipagem, e por até 4 semanas após a transfecção viral no NTS, totalizando 7 semanas de registro.

3.4 Registro da pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda

A pressão arterial da cauda foi medida em animais conscientes pela utilização de um sistema não invasivo de registro de pressão pela cauda (modelo MRBP-R01-IITC, USA) uma vez por semana, na semana seguinte à clipagem do rim esquerdo até a 3ª semana após a clipagem. Esta medida foi realizada naqueles animais que não passaram pela cirurgia de telemetria. Antes das medições, os animais foram aquecidos durante 5 minutos a 28 °C, a fim de permitir a detecção das pulsações arteriais da cauda e para atingir um nível estável de pulsos.

3.5 Microinjeções no NTS

Foram utilizados vetores virais construídos no laboratório do Dr. Colin Sumners (Universidade da Flórida) conforme descrito anteriormente (Li et al., 2006; Li et al., 2008) para super-expressão de MIF: AAV2-CBA-MIF ($1,2 \times 10^{12}$ cópias genômicas (cg)/mL), que promoveu a super-expressão de MIF e o vetor repórter: AAV2-CBA-eGFP ($1,8 \times 10^{12}$ cg/mL), que promoveu a super-expressão de GFP, uma proteína sem função fisiológica, atuando como controle. A super-expressão de MIF ou de GFP foi preferencialmente em neurônios (sem distinção de fenótipos)

devido à presença do promotor CBA (*chicken beta actin* – que é mais específico para neurônios). Os animais foram anestesiados, conforme descrito acima, e colocados em um aparelho estereotáxico (modelo 900, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Uma craniotomia parcial do osso occipital foi realizada e a superfície dorsal do tronco encefálico foi exposta. Por meio de uma micropipeta de vidro acoplada a um sistema de injeção Picospritzer (Parker, Cleveland, OH, USA), as microinjeções dos vírus recombinantes AAV2-CBA-MIF ou AAV2-CBA-eGFP (200 nL/sítio de injeção) foram feitas em cinco pontos do NTS, conforme as seguintes coordenadas: 0,5 mm médio-lateral, 0,5 mm rostral e 0,5 mm dorso-ventral; 0,2 mm médio-lateral, 0 mm rostral e 0,4 mm dorso-ventral; e, 0 mm médio-lateral, 0,4 mm caudal e 0,4 mm dorso-ventral ao *calamus scriptorius*. Desta forma, o vetor viral foi microinjetado nos subnúcleos intermediário e comissural do NTS conforme descrito anteriormente (Blanch et al., 2014;Freiria-Oliveira et al., 2013). Após as microinjeções, a musculatura da nuca e a pele foram suturadas e os animais receberam uma dose profilática de antibiótico e de anti-inflamatório, conforme descrito acima. O efeito da transfecção com AAV2 é irreversível, uma vez que o vetor se integra ao DNA das células transfectadas e há super-expressão da proteína avaliada por pelo menos 3 meses após a transfecção (Li et al., 2006). As microinjeções dos vetores virais foram feitas na 3ª semana após a colocação do clipe na artéria renal.

3.6 Canulação da artéria e veia femorais para o teste dos reflexos

Nos animais que durante o desenvolvimento da hipertensão 2R1C foi realizada medida indireta da pressão arterial (pletismografia de cauda, como descrito acima), e apenas nos animais que se mostraram hipertensos na 3ª semana após a clipagem (PAS > 150 mmHg), 28-30 dias após a injeção do vetor viral (ou seja, 7 semanas após a clipagem do rim esquerdo), foi realizado o procedimento de anestesia como descrito acima e foi feita a canulação da artéria e da veia femorais para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP), PAM e FC e para a injeção de drogas, respectivamente. As cânulas consistem em tubos de polietileno PE-10 soldados a tubos de polietileno PE-50. No final da canulação, as cânulas foram exteriorizadas e suturadas na pele do dorso do animal. As cânulas foram preenchidas com uma solução fisiológica estéril. No dia seguinte, a cânula inserida

na artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão [Statham Gould (P23 Db), El Segundo, CA, USA] acoplado a um amplificador (model ETH-200, Bridge Bio Amplifier, Chicago, IL, USA) e a um sistema de aquisição de análise de dados (model Powerlab 16SP, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA); e a PAP, PAM e FC foram registradas em animais não anestesiados. A PAM foi calculada a partir da PAP. A FC foi calculada com a frequência instantânea do sinal de PAP.

3.7 Variabilidade cardiovascular

A variabilidade da PAS foi realizada utilizando um software apropriado (CardioSeries, versão 2.3, disponível em (<https://www.sites.google.com/site/cardioseries/>), como descrito anteriormente (Blanch et al., 2014; Pires et al., 2013). Séries temporais batimento a batimento obtidas a partir da PAS foram convertidas em pontos de dados de 100 ms usando a interpolação de spline cúbica (10 Hz). As séries interpoladas foram divididas em conjuntos sequenciais semi-sobrepostos em 512 pontos de dados (51,2 s). Antes de calcular a potência da densidade espectral, os segmentos foram inspecionados visualmente e os dados não estacionários não foram levados em consideração. Uma janela de Hanning foi usada para atenuar os efeitos secundários e o espectro foi calculado usando um algoritmo FFT direto para as séries de tempo discretas. Os espectros foram integrados em bandas de baixa frequência (LF; 0,2 – 0,75 Hz) e de alta frequência (HF; 0,75 – 3 Hz) e os resultados foram expressos em absolutos para a PAS (mmHg²). LF da PAS é um índice do tônus vasoconstritor simpático.

3.8 Animais naïves

Dois grupos extras de animais foram preparados: grupo normotensos naïves e grupo 2R1C naïves. Estes animais passaram pela cirurgia de indução da hipertensão renovascular 2R1C ou pela cirurgia fictícia e permaneceram aos devidos cuidados pelas próximas 7 semanas. Após este período, os encéfalos foram retirados e processados de acordo com o protocolo de imunohistoquímica, descrito abaixo, para a marcação do MIF endógeno.

3.9 Eutanásia

Após o término dos experimentos, parte do grupo dos animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg de pc; Cristália, Itapira, SP, Brasil), o coração foi exposto cirurgicamente e por meio de uma bomba de perfusão, foi realizada inicialmente uma perfusão com salina tamponada (PBS 0,1 M), seguida de solução de paraformaldeído a 4% (PFA 4%).

3.10 Análise para detecção de MIF por meio de imunohistoquímica

Após a perfusão com PFA 4%, os encéfalos foram retirados e fixados no mesmo fixador por 1 hora e depois foram imersos em uma solução de sacarose a 20% até o momento de serem processados (não mais que 1 semana). Posteriormente, os bulbos foram seccionados em cortes coronais de 30 μ m de espessura em um micrótomo de congelamento (Leica CM 1850 UV, Alemanha) e armazenados em uma placa de 24 poços com PBS 0,1 M ou solução crioprotetora. Para certificação do local da super-expressão da proteína MIF no NTS, uma em cada 4 secções de bulbo (120 μ m entre cada corte) foram processadas imunohistoquimicamente para detecção de MIF. Inicialmente, os cortes foram incubados por 15 minutos em solução bloqueadora composta de 10% de soro normal de cabra (NGS; Sigma, St. Louis, MO, USA) e Triton-X 0,3% (Sigma, St. Louis, MO, USA) em PBS 0,1 M. Os cortes foram, então, incubados em anticorpo policlonal anti-MIF feito em coelho (1:500 ou 1:300; Torrey Pines Biolabs, Inc., Houston, TX, EUA) em PBS 0,1 M contendo 1% de NGS e Triton-X 0,3% por 24 horas a 4 °C. A diluição do MIF utilizada (1:500 ou 1:300), foi feita para marcarmos respectivamente, MIF super-expressão e MIF endógeno conforme descrito em trabalhos anteriores (Freiria-Oliveira et al., 2013; Li et al., 2008). No final das 24 h de incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados por 1 h em anticorpo anti-coelho biotilado feito em cabra (1:500, em PBS contendo 1% de NGS e Triton-X 0,3%; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Após essa incubação, os cortes foram incubados por mais 1 hora em Streptavidin Alexa Fluor 488 (1:500; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Entre cada passo, os cortes foram lavados 3 x 10 minutos com PBS 0,1 M. Após a última lavagem em PBS 0,1 M, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e então cobertos com solução protetora de fluorescência Fluoromount (Sigma, St. Louis, MO, USA). As secções (uma a cada 120 μ m) foram visualizadas em microscópio de fluorescência usando um

microscópio Leica (Leica DM5500 B, Wetzlar, Hesse, Alemanha), utilizando-se o filtro apropriado, em secções semelhantes, representativas dos diferentes grupos. Este procedimento foi realizado com os encéfalos dos animais que passaram pelo protocolo de telemetria.

3.11 Análise para detecção de MIF por meio de RT-PCR no NTS

Após a eutanásia sob anestesia, conforme descrito acima, os encéfalos foram rapidamente retirados e congelados em gelo seco e conservados em freezer -80 °C até o momento da realização de RT-PCR, descrito a seguir. Para a realização do RT-PCR, o NTS foi extraído por micropunção com a ajuda de um microscópio cirúrgico, utilizando a área postrema e o *calamus scriptorius* como sítios de referência. O atlas de Paxinos e Watson (Paxinos and Watson, 1986) para ratos também foi utilizado como referência para identificação do NTS. O RNA isolado foi submetido a reação de transcriptase reversa para conversão em cDNA (Life Technologies, Grand Island, EUA) e as amostras foram testadas em duplicata utilizando um sistema de PCR em tempo real StepOne, Master Mix Taqman para expressão gênica universal e primers TaqMan validados (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações com 45 ciclos foram realizadas em um aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O gene selecionado foi o MIF (Rn00821234_g1; Life Technologies, Grand Island, EUA). Padrões de expressão do MIF foi normalizados pelo gene GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Rn99999916_s1; Life Technologies, Grand Island, EUA) constitutivamente expresso e a expressão relativa foi quantificada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Este procedimento foi realizado com os encéfalos dos animais que passaram pelo protocolo do teste da função do barorreflexo.

3.12 Análise dos rins

No final dos experimentos, os animais foram pesados e sob anestesia profunda, como descrito acima, os rins foram removidos para confirmar a atrofia do rim clipado e a hipertrofia do rim contralateral (Smith and Bishop, 1986).

3.13 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados através da análise de variância (uma ou duas vias), associada ao teste de Student-Newman-Keuls, assumindo-se $p < 0,05$.

3.14 Protocolos experimentais

Os ratos com hipertensão 2R1C e seus pares NT foram sempre divididos em animais que receberam o vetor viral que causou a super-expressão de MIF (AAV2-CBA-MIF) ou o gene repórter GFP (AAV2-CBA-eGFP), o qual não tem ação fisiológica e é o controle da transfecção viral no NTS. Desta forma, foram realizados sempre 4 grupos experimentais: NT-GFP; NT-MIF; 2R1C-GFP e 2R1C-MIF.

3.14.1 Efeito da super-expressão de MIF no NTS sobre o desenvolvimento da hipertensão renal 2R1C

Em ratos com hipertensão 2R1C e em ratos NT acordados, a PAM e a FC foram monitoradas continuamente através de transdutores de telemetria. O acompanhamento das variáveis foi feito 3 semanas antes e até 4 semanas após as microinjeções dos vetores virais no NTS. O registro da PAM e da FC foi feito durante 24 horas, uma vez por semana.

3.14.2 Efeito da super-expressão de MIF no NTS sobre o barorreflexo

No dia anterior ao registro das variáveis cardiovasculares (4 semanas após a transfecção viral), os animais tiveram a artéria e a veia femorais canuladas, conforme descrito anteriormente. No dia do experimento, os animais foram conectados ao sistema de registro de pressão arterial e após um período basal de registro, foram feitas injeções intravenosas em bôlus de fenilefrina (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pc) e de nitroprussiato de sódio (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pc) para testar o barorreflexo. Todas as injeções tiveram intervalos de 5 minutos ou até que os parâmetros cardiovasculares voltassem aos níveis basais. As análises das alterações da FC foram feitas a cada 10 mmHg de intervalo de aumento ou queda da PAM, iniciando-se aos (+ ou -) 5 mmHg e finalizando-se aos (+ ou -) 35 mmHg. Os valores foram plotados e uma regressão linear foi usada para cada animal e o slope de cada regressão linear foi

usado para calcular as diferenças entre os grupos (Blanch et al., 2014; Farah et al., 1999).

4 RESULTADOS

4.1 Expressão de MIF e GFP no NTS

Em ratos naïves observamos que com a diluição de 1:300 do anticorpo primário, ocorreu a marcação de células positiva ao MIF, mostrando a presença desta proteína no NTS (Figura 6). Em outros grupos de animais, foram utilizados AAV2-CBA-MIF e AAV2-CBA-eGFP para induzir, respectivamente, a expressão de MIF e da proteína controle GFP, a qual ocorre primariamente em neurônios do SNC (Klein et al., 2002; Li et al., 2008). As fotomicrografias mostrando a super-expressão de MIF (Figura 7) ou GFP (Figura 8) 4 semanas após as microinjeções de AAV2-CBA-MIF ou AAV2-CBA-eGFP, respectivamente.

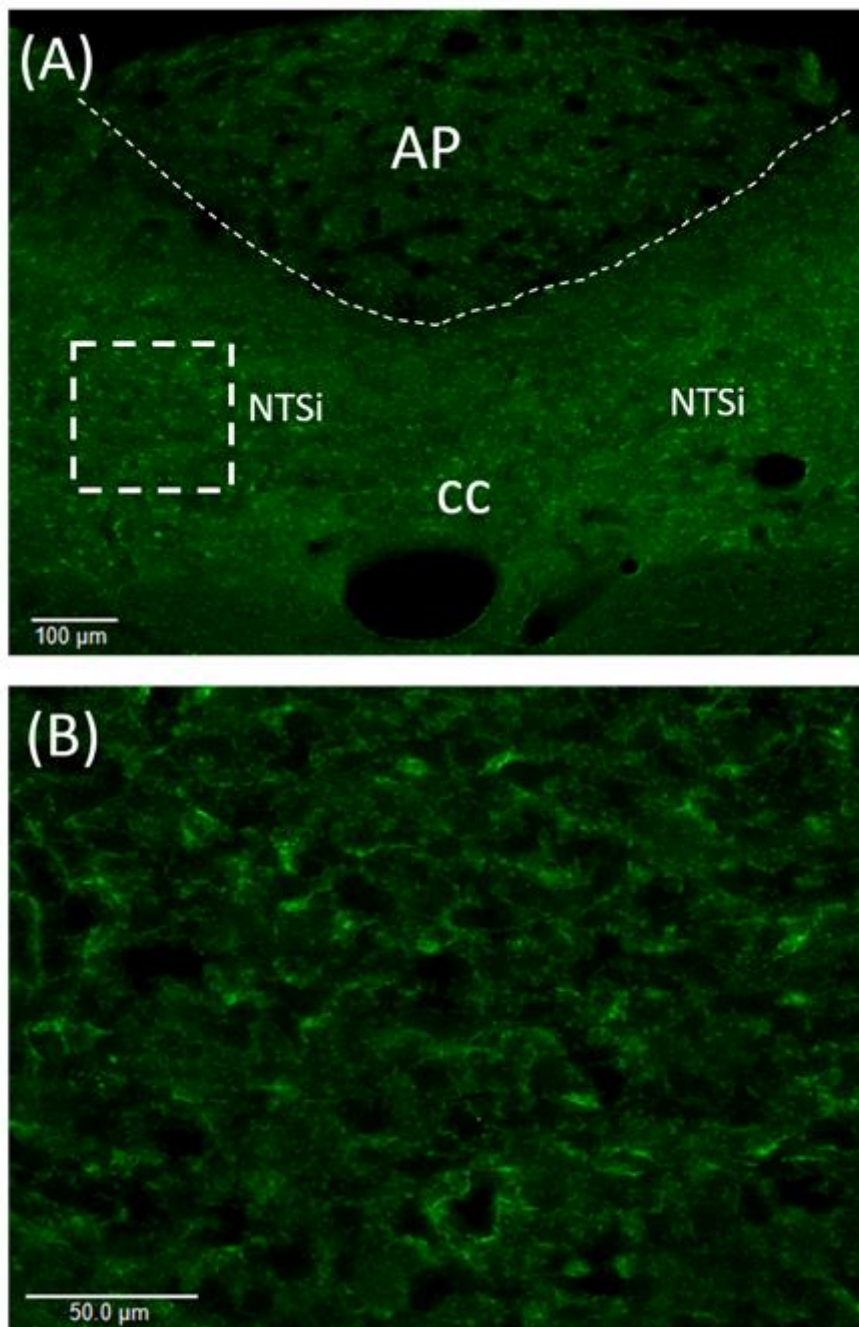


Figura 6 - MIF endógeno. Fotomicrografias de fluorescência representativas foram feitas a partir de secções coronais do bulbo nos ratos naïves 2R1C e NT. (A e B) mostram a imunorreatividade ao MIF no nível do NTS intermediário (AP, área postrema; cc, canal central; X, núcleo dorsal motor do vago. Escala = 100 μm em (A) e 50 μm em (B).

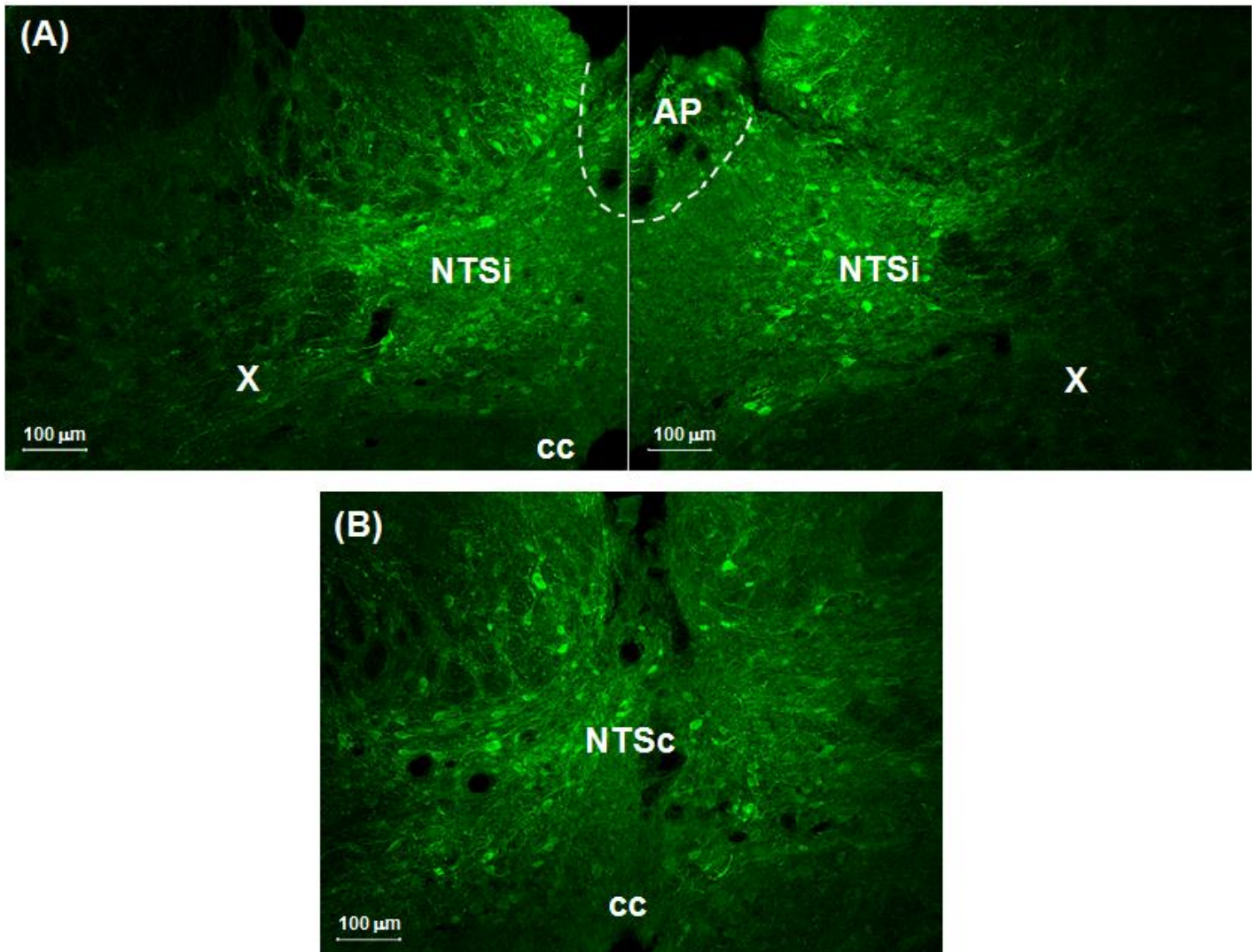


Figura 7 - Transdução de MIF no NTS mediada por vetor viral. Fotomicrografias de fluorescência representativas foram feitas a partir de secções coronais do bulbo nos ratos 2R1C e normotensos (NT), que receberam microinjeções de MIF no NTS, conforme descrito nos Métodos. (A) mostra a imunorreatividade da super-expressão de MIF no nível do NTS intermediário (NTSi) e (B) no NTS comissural (NTSc). AP, área postrema; cc, canal central; X, núcleo dorsal motor do vago. Escala = 100 µm.

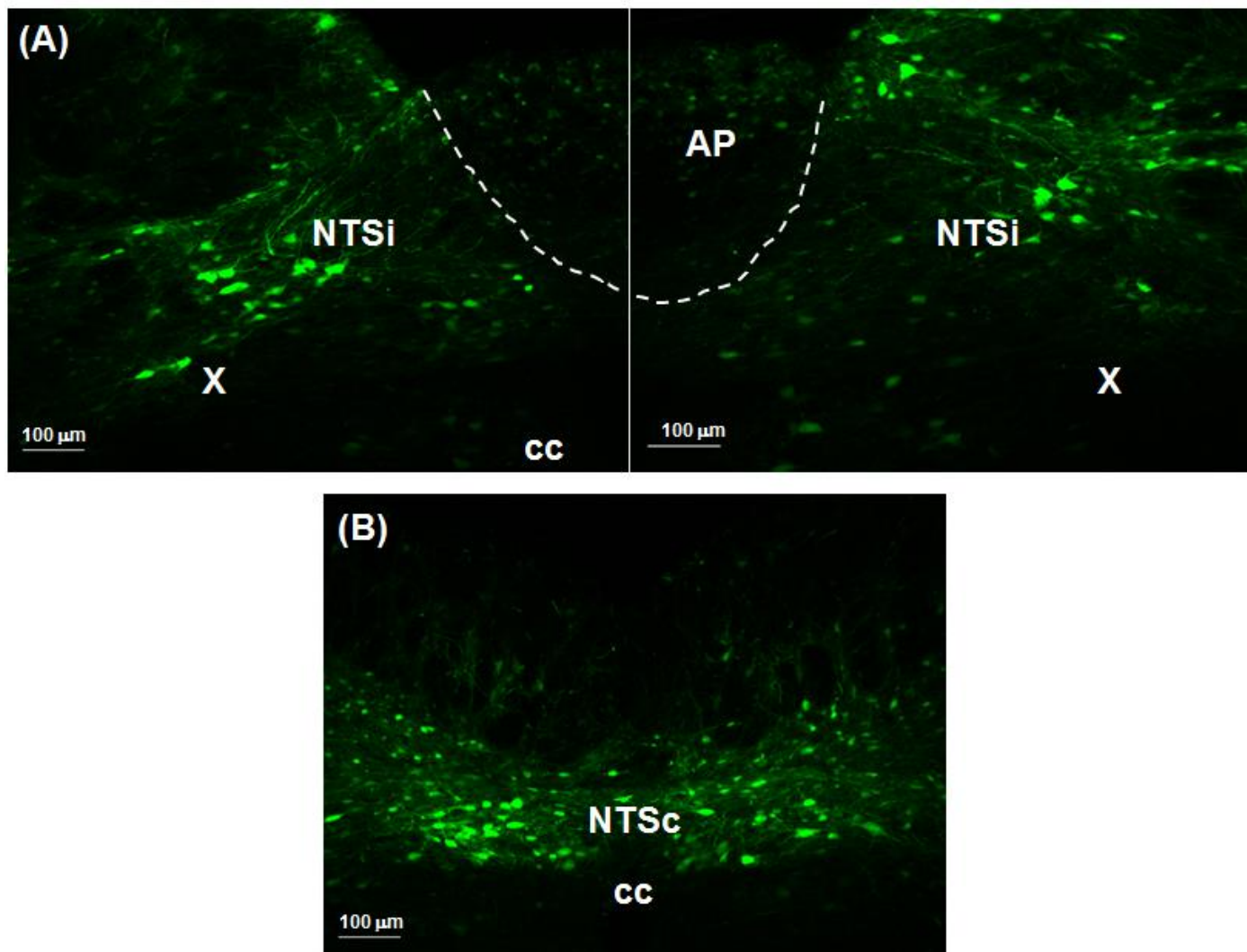


Figura 8 - Transdução de GFP no NTS mediada por vetor viral. Fotomicrografias de fluorescência representativas foram feitas a partir de secções coronais do tronco encefálico nos ratos 2R1C e normotensos (NT), que receberam microinjeções de GFP no NTS, conforme descrito nos Métodos. (A) mostra a imunorreatividade da super-expressão de GFP no nível do NTS intermediário (NTSi) e (B) no NTS comissural (NTSc). AP, área postrema; cc, canal central; X, núcleo dorsal motor do vago. Escala = 100 μm.

4.2 Níveis de RNAm para MIF no NTS mediada por vetor viral

Conforme o esperado, os grupos 2R1C-MIF e NT-MIF apresentaram um maior nível de RNAm para MIF no NTS comparados com os animais que super-expressaram a proteína GFP [2R1C-MIF: $3,53 \pm 0,68$ e NT-MIF: $3,80 \pm 0,97$, vs. 2R1C-GFP: $0,88 \pm 0,09$ e NT-GFP: $1,00 \pm 0,16$; $F(3,17) = 5,869$; $p < 0,05$], Figura 9.

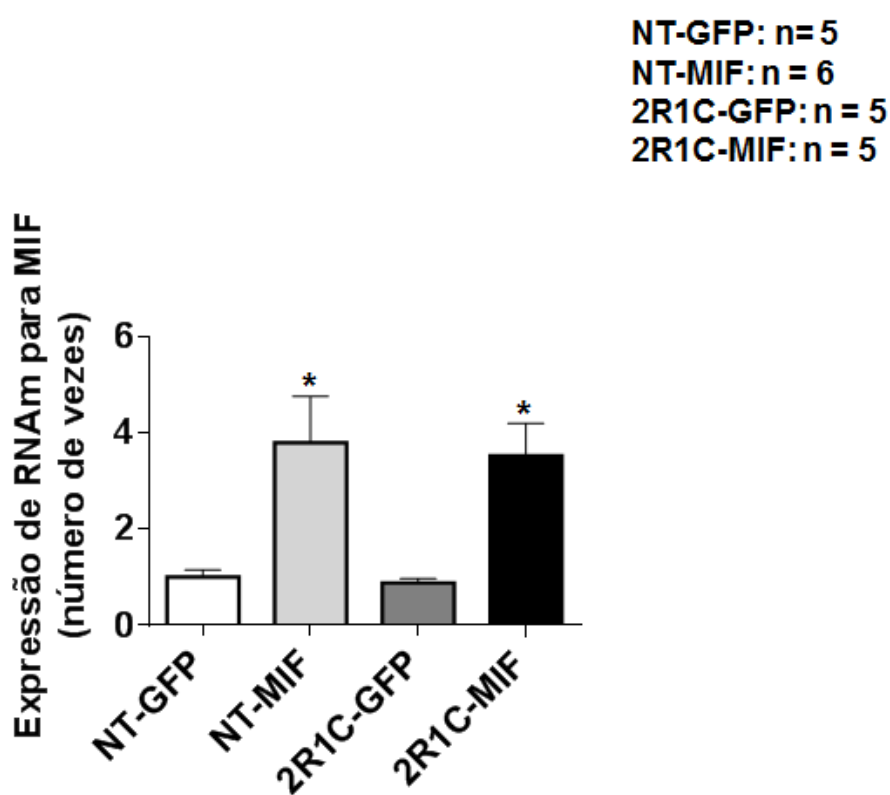


Figura 9 - Níveis de RNAm para MIF no NTS de ratos 2R1C e NT. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n representa o número de ratos por grupo. * $p < 0,05$ vs. GFP. Análise de variância de uma via, associada ao teste de Student-Newman-Keuls.

4.3 Aumento na expressão de MIF no NTS atenua o desenvolvimento da hipertensão 2R1C

Os níveis basais de PAM (2 semanas antes das injeções dos vetores virais e 1 semana após a clipagem) foram similares nos grupos de ratos que foram designados 2R1C-MIF e 2R1C-GFP durante os ciclos claro (MIF, 117 ± 8 e GFP, 114 ± 2 mmHg) e escuro (MIF, 126 ± 8 e GFP, 126 ± 4 mmHg) e também foram similares nos grupos de ratos NT-MIF e NT-GFP durante os ciclos claro (MIF, 93 ± 2 e GFP, 94 ± 2 mmHg) e escuro (MIF, 102 ± 3 e GFP, 104 ± 1 mmHg). A partir de 2 semanas após a colocação do clipe, foram observadas diferenças significantes na PAM entre os grupos 2R1C e NT ($p < 0,001$), Figuras 10A e 10C. Nos ratos 2R1C-MIF, o desenvolvimento da hipertensão foi atenuado comparado aos animais 2R1C-GFP durante os ciclos claro (2R1C-MIF: 145 ± 7 , vs. 2R1C-GFP: 176 ± 9 mmHg; medido na 7^a semana) e escuro (2R1C-MIF: 157 ± 6 , vs. 2R1C-GFP: 185 ± 12 mmHg; medido na 7^a semana); [$F(3,140) = 200,21$; $p < 0,001$] e [$F(3,140) = 173,62$; $p < 0,001$], respectivamente para os ciclos claro e escuro, Figuras 10A e 10C. Observamos que os ratos 2R1C-MIF apresentaram uma redução da FC ao longo das semanas comparado com os ratos 2R1C-GFP durante os ciclos claro e escuro [$F(3,140) = 6,407$; $p < 0,001$] e [$F(3,140) = 16,906$; $p < 0,001$], respectivamente Figuras 10B e 10D. Não houve alterações significativas na PAM e FC dos ratos NT-MIF e NT-GFP ao longo das semanas ($p > 0,05$).

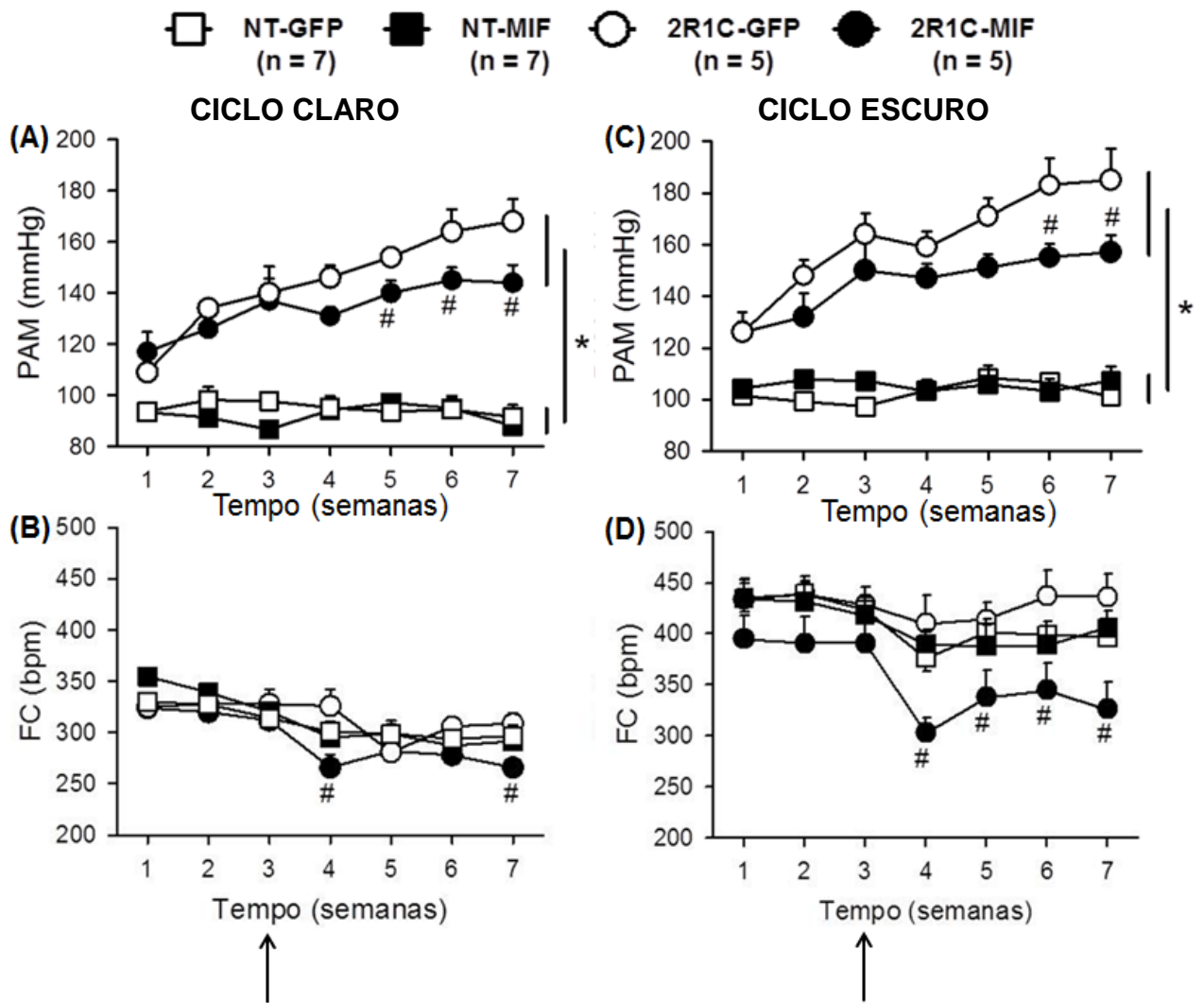


Figura 10 - Valores de PAM (mmHg) e FC (bpm) de ratos com hipertensão 2R1C e ratos NT, registrados nos ciclos claro (A e B) e escuro (C e D), nas semanas indicadas antes e após as injeções dos vetores virais (AAV2-CBA-eGFP, símbolos abertos; AAV2-CBA-MIF, símbolos fechados) no NTS. As injeções dos vetores virais foram feitas na 3ª semana após a colocação do clipe de prata ou cirurgia fictícia (seta). Os resultados estão apresentados como média ± EPM, n representa o número de ratos por grupo. * p < 0,05 vs. NT a partir da 2ª semana de registro; # p < 0,05 vs. 2R1C-GFP. Análise de variância de duas vias, associada ao teste de Student-Newman-Keuls.

4.4 Função barorreflexa foi melhorada após o aumento da expressão de MIF no NTS de ratos 2R1C

Os valores basais de PAM nos animais que foram submetidos ao teste de barorreflexo estão representados na Figura 11A. Os dados indicam que 7 semanas após a colocação do clipe, os altos níveis de PAM observados nos ratos 2R1C-GFP foram significativamente reduzidos nos ratos 2R1C-MIF (2R1C-GFP: 194 ± 9 , vs. 2R1C-MIF: 146 ± 5 mmHg, $p < 0,05$), porém sempre mais elevados em comparação aos valores observados nos ratos NT (107 ± 3 e 103 ± 2 mmHg, respectivamente, NT-GFP e NT-MIF), [$F(3,25) = 74,150$; $p < 0,001$] os quais não foram diferentes entre si ($p > 0,05$), Figura 11A. Os valores basais de FC nestes animais não foram diferentes entre os grupos experimentais [$F(3,25) = 1,018$; $p = 0,4013$], Figura 11B. Os testes de barorreflexo foram realizados através de uma dose pressora de fenilefrina e de uma dose depressora de nitroprussiato de sódio, conforme descrito nos Métodos. Os ratos 2R1C-GFP exibiram uma diminuição das respostas bradicárdica [2R1C-GFP slope: $-0,41 \pm 0,3$, vs. NT-GFP slope: $-1,9 \pm 0,2$ bpm/mmHg; $F(3,26) = 10,560$; $p < 0,001$; Figura 6C] e taquicárdica [2R1C-GFP slope: $-1,7 \pm 0,3$, vs. NT-GFP slope: $-3,3 \pm 0,4$ bpm/mmHg; $F(3,26) = 8,208$; $p = 0,0005$; Figura 11C]. Porém nos ratos 2R1C-MIF houve uma melhora na resposta bradicárdica a valores semelhantes ao grupo NT (2R1C-MIF slope: $1,4 \pm 0,3$, vs. NT-MIF slope: $-1,9 \pm 0,2$ bpm/mmHg; Figura 7C) e taquicárdica (2R1C-MIF slope: $4,7 \pm 0,6$, vs. NT-MIF slope: $-4,2 \pm 0,4$ bpm/mmHg; Figura 11C). Também observamos que a razão do rim esquerdo com o rim direito dos ratos 2R1C foram menores do que nos ratos NT [$F(3,49) = 36,240$; $p < 0,0001$], como pode ser observado na Tabela 1, à semelhança de outros estudos (Blanch et al., 2014; Lazartigues et al., 2004). Não há diferença entre a razão dos rins entre os grupos NT (Tabela 1).

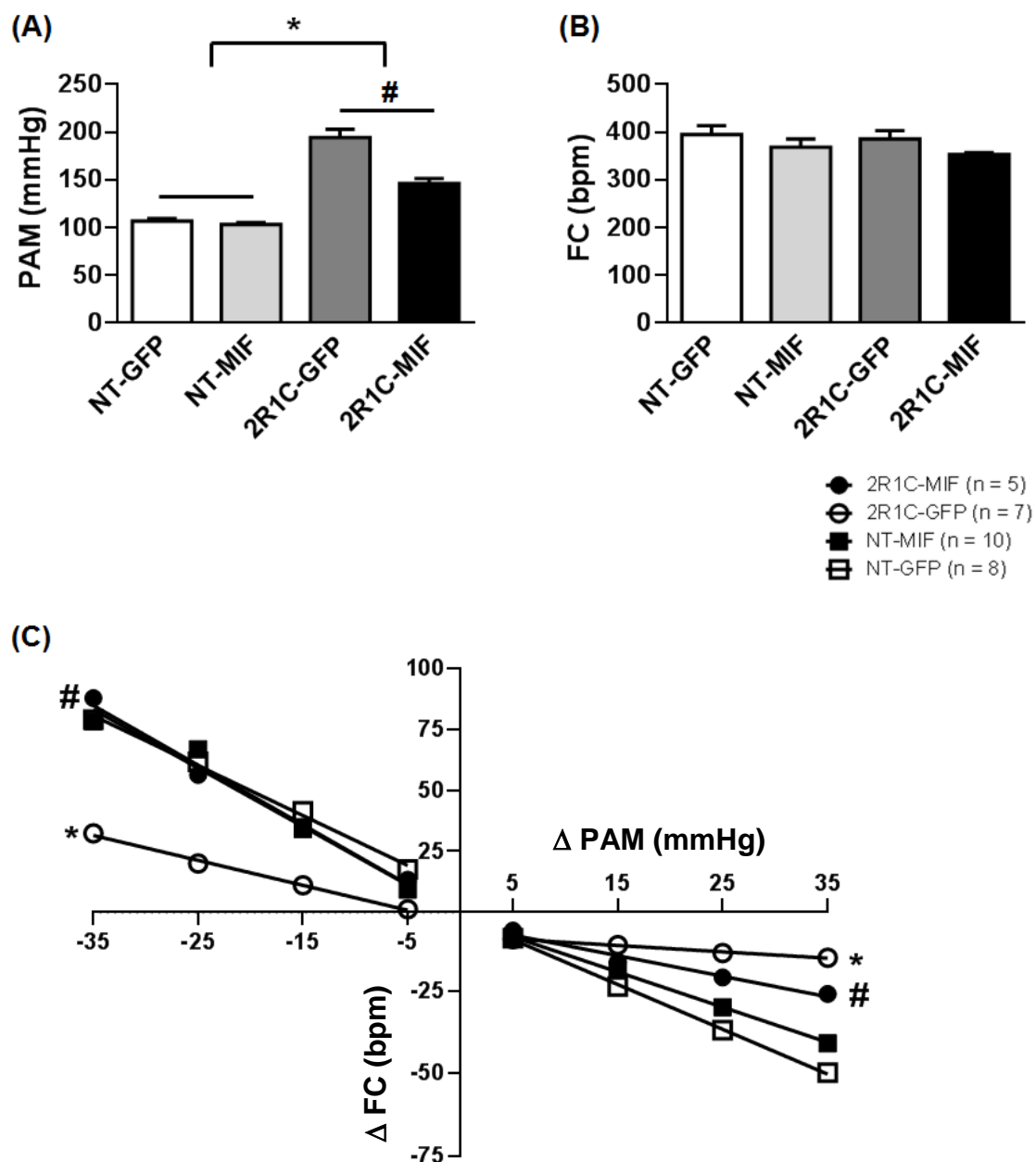


Figura 11 - Registro da PAM e FC e teste da função barorreflexa. Valores basais de (A) PAM, (B) FC e (C) curvas da função do barorreflexo em ratos NT ou com hipertensão renovascular 2R1C após 4 semanas da da microinjeção no NTS de AAV2-CBA-eGFP ou AAV2-CBA-MIF. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n indica o número de animais por grupo. * $p < 0,05$ vs. NT; # $p < 0,05$ vs. 2R1C-GFP. Análise de variância de uma via, associada ao teste de Student-Newman-Keuls.

4.5 Modulação simpática vasomotora não foi alterada após o aumento na expressão de MIF no NTS de ratos 2R1C

Utilizando a análise espectral da pressão sistólica (PAS) foi verificada a modulação simpática, analisada pela modulação de baixa frequência (Low Frequency – LF) dos animais normotensos e com hipertensão 2R1C. Como era o esperado, os animais hipertensos 2R1C apresentaram uma maior modulação simpática (LF) da PAS, que é um índice da modulação simpática vasomotora, em comparação com os animais normotensos (2R1C-GFP: $5,78 \pm 1,00$, vs. NT-GFP: $2,97 \pm 0,33$ mmHg²; $F(3,628) = 3,526$ $p < 0,05$). No entanto, a super-expressão de MIF não foi capaz de diminuir a LF da PAS (2R1C-MIF: $5,25 \pm 0,71$, vs. 2R1C-GFP: $5,78 \pm 1,00$ mmHg²), Figura 12.

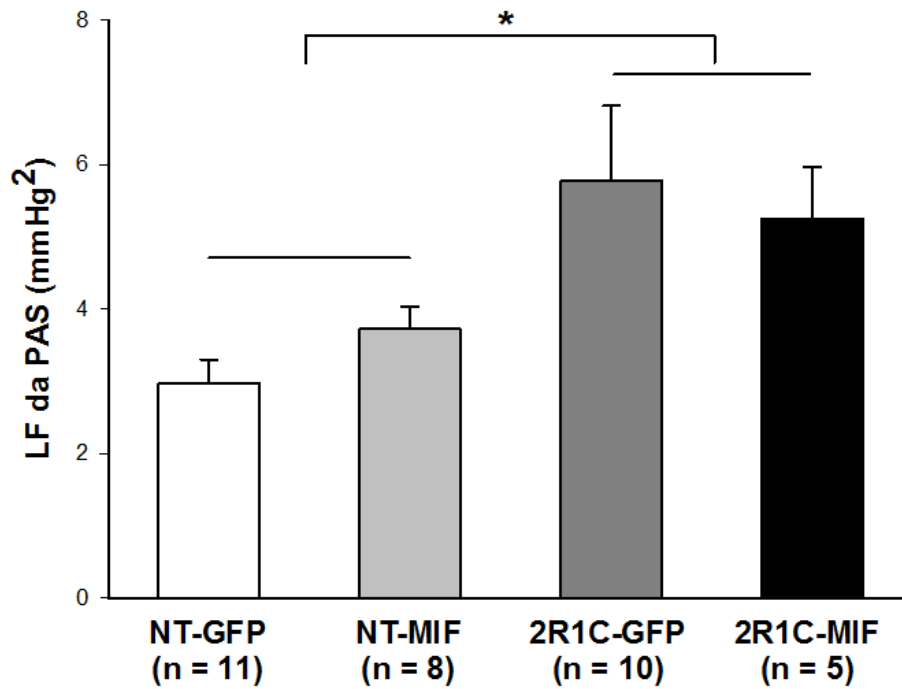


Figura 12 - Potência do espectro da banda de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS) dos animais NT e com hipertensão 2R1C, com a super-expressão de GFP ou de MIF. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n indica o número de animais por grupo. * $p < 0,05$ vs. NT. Análise de variância de uma via, associada ao teste de Student-Newman-Keuls.

Tabela 1 - Razão entre os pesos do rim esquerdo/rim direito (RE/RD) de ratos 2R1C e de ratos NT 4 semanas após microinjeção no NTS de AAV2-CBA-eGFP ou AAV2-CBA-MIF.

Rato	Tratamento	n	RE/RD
NT	AAV2-CBA-eGFP	22	0,98 ± 0,01
NT	AAV2-CBA-MIF	17	0,98 ± 0,01
2R1C	AAV2-CBA-eGFP	17	0,63 ± 0,04*
2R1C	AAV2-CBA-MIF	11	0,65 ± 0,06*

Os resultados são apresentados como média ± EPM, n indica o número de animais por grupo. * p < 0,05 vs. NT. Análise de variância de uma via, associada ao teste de Student-Newman-Keuls.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que a super-expressão de MIF nos neurônios do NTS atenua significativamente o desenvolvimento e a manutenção da hipertensão renovascular em ratos 2R1C, mas não causa qualquer alteração nos ratos normotensos. Observamos também uma melhora no barorreflexo e uma redução na FC basal nos ratos 2R1C-MIF. Nos dados obtidos até o momento não houve redução da modulação simpática nos ratos 2R1C-MIF.

O papel do SRA no desenvolvimento e na manutenção da hipertensão renovascular é bem conhecido (Cervenka et al., 2002; Gavras et al., 1973; Leenen and De, 1970; Martinez-Maldonado, 1991; Navar et al., 1998). No modelo animal de hipertensão 2R1C, a maior ativação do SRA já está presente desde a Fase I, que compreende as primeiras semanas após a clipagem da artéria renal (Martinez-Maldonado, 1991; Navar et al., 1998). De acordo com Navar et al. (1998), as ações da ANG II e de seus metabólitos ativos podem ser resumidos na figura abaixo (Figura 13).

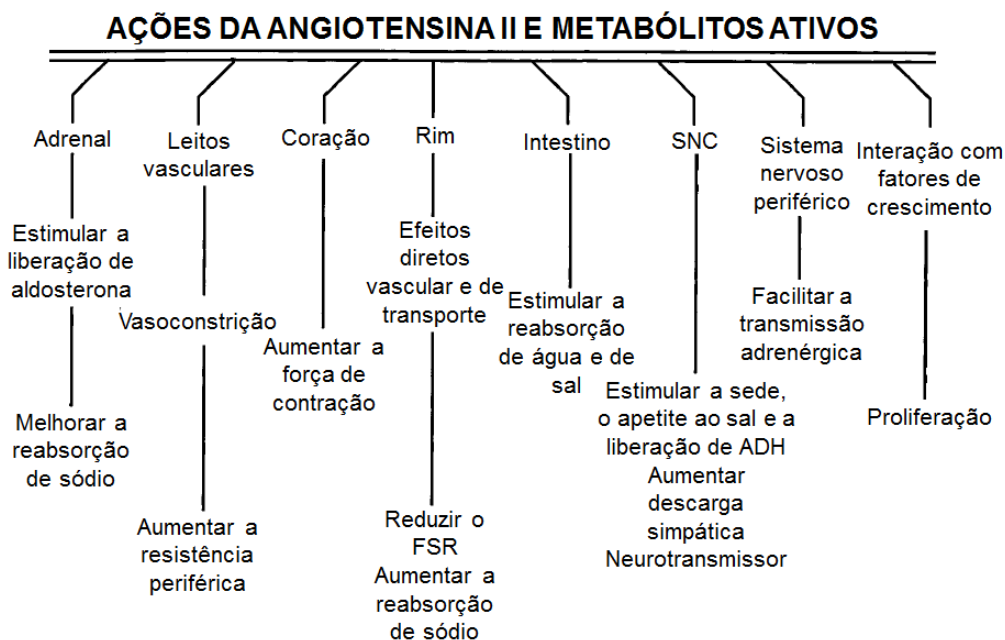


Figura 13 - Multiplicidade das ações sistêmicas da ANG II. ADH, hormônio antidiurético; SNC, sistema nervoso central; FSR, fluxo sanguíneo renal (adaptado de Navar et al., 1998).

Além do SRA periférico, níveis mais elevados de receptores de ANG II do subtipo AT1 estão presentes em diferentes áreas encefálicas nos ratos hipertensos 2R1C, incluindo o PVN e o RVL (Chen et al., 2011;de Oliveira-Sales et al., 2010), dois núcleos que contém neurônios pré-motores simpáticos (Strack et al., 1989). Losartan, antagonista de receptores AT1, microinjetado no RVL ou no PVN promove uma diminuição na atividade simpática em ratos 2R1C, sugerindo que a ativação desses receptores centrais neste modelo de hipertensão seja importante para a manutenção da hipertensão (Chen et al., 2011;de Oliveira-Sales et al., 2010).

Como citado anteriormente, o MIF é um fator contra-regulatório das ações intracelulares da ANG II atuando em receptores do subtipo AT1 (Busche et al., 2001;Sun et al., 2004). O presente estudo demonstrou que a super-expressão de MIF nos neurônios do NTS de ratos com hipertensão renovascular 2R1C atenua o desenvolvimento e a manutenção desta hipertensão. Estes dados reforçam a ação do MIF como um agente regulador negativo das ações da ANG II, à semelhança do que foi observado em estudos anteriores em SHRs (Freiria-Oliveira et al., 2013;Li et al., 2008). O presente trabalho, entretanto, é o primeiro a mostrar que em ratos com hipertensão renovascular 2R1C, que é dependente da ativação do SRA, a inibição de seus efeitos pelo MIF no NTS, diminui o desenvolvimento da hipertensão renal.

Apesar de sabermos que o MIF é um fator contra-regulatório das ações intracelulares da ANG II, não sabemos até o momento se a inibição das ações da ANG II pelo MIF deve-se a alterações na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estudos mostram que a ANG II atuando em receptores AT1 induz a formação de EROs iniciada pela ativação do complexo enzimático NADPH-oxidase, que promove a redução incompleta do oxigênio molecular, produzindo o ânion superóxido, o qual ativaria vias responsáveis pelas ações da ANG II (Zimmerman and Davisson, 2004;Zimmerman et al., 2002). Nishi e colaboradores (Nishi et al., 2013) demonstraram que o losartan, antagonista de receptores AT1, reduz o estresse oxidativo no RVL e diminui a PAM destes animais. Outros estudos também observaram que a administração no RVL de antioxidantes diminuiu a pressão arterial apenas em ratos com hipertensão renovascular (Oliveira-Sales et al., 2009). Assim, parece que o estresse oxidativo é um importante mecanismo para manter a pressão arterial alta em modelos de hipertensão renovascular. É possível que o mesmo

mecanismo esteja acontecendo no NTS. Estudos futuros deverão ser realizados para testar essa hipótese.

O NTS, além de estar intimamente relacionado com a regulação do barorreflexo (Reis et al., 1981; Talman et al., 1980), também está envolvido com a hiperatividade simpática encontrada em ratos SHR ou com hipertensão 2R1C (Blanch et al., 2014; Sato et al., 2001). Desta forma, é possível sugerir que a diminuição nos níveis de EROs no NTS pelo MIF possa ser um mecanismo que impede o total desenvolvimento da hipertensão renovascular por redução da atividade simpática. De fato, Colombari et al. (Colombari et al., 2010) demonstraram que o bloqueio do aumento da atividade simpática induzida pela hiperosmolaridade plasmática em ratos com super-expressão de MIF no PVN é revertida quando o vetor viral tem em sua construção a codificação de MIF sem a porção TPOR. Desta forma, de acordo com estudo anterior em ratos 2R1C (Blanch et al., 2014), esperaríamos que o MIF no NTS diminuísse o aumento na modulação simpática (banda LF do espectro) observado nos animais 2R1C. Entretanto, nos dados obtidos até o momento, não observamos este efeito.

Já é bem conhecido que a função barorreflexa é prejudicada em ratos 2R1C (Berenguer et al., 1991; Blanch et al., 2014; Oliveira-Sales et al., 2014). Dados da literatura mostram que um prejuízo no barorreflexo parece ser crucial no desenvolvimento e na manutenção da hipertensão (Berenguer et al., 1991; Tsyrlin et al., 2013), isto porque uma das causas do aumento da atividade simpática e da alta pressão arterial pode ser a redução no ganho do barorreflexo (Lohmeier, 2001; Lohmeier et al., 2004). Dados da literatura demonstram de maneira inequívoca que a ANG II atuando em receptores AT1 no NTS diminuem a sensibilidade do barorreflexo (Matsumura et al., 1998; Michelini and Bonagamba, 1990; Paton and Kasparov, 1999). Uma vez que os ratos 2R1C tem uma hiperatividade do sistema renina-angiotensina (Leenen and De, 1970; Leenen and De, 1975; Morishita et al., 1995; Niederberger et al., 1995), é possível que os níveis aumentados de ANG II atuem no NTS promovendo uma atenuação do barorreflexo. O presente estudo demonstrou que após a super-expressão de MIF nos neurônios do NTS de ratos 2R1C, houve uma melhora na função do barorreflexo. Uma vez que o MIF atua como inibidor das ações intracelulares da ANG II, é possível que a super-expressão do MIF tenha reduzido os efeitos deletérios da ANG II no barorreflexo. Esta melhora

na função do barorreflexo pode ser de extrema importância para a atenuação do desenvolvimento e da manutenção da hipertensão nos animais hipertensos 2R1C com a super-expressão de MIF no NTS.

Apesar da atenuação dos níveis pressóricos elevados em ratos 2R1C, a super-expressão de MIF no NTS desses animais não foi capaz de normalizar a pressão arterial. Uma possível explicação para a não normalização da PAM seria a ação da ANG II periférica através de receptores AT1 nos órgãos circunventriculares, os quais ativariam por vias neurais o PVN e o RVL (Badoer and Merolli, 1998; Bains et al., 1992; Johnson and Loewy, 1990; Oldfield et al., 1994; Shafton et al., 1998), com consequente aumento da pressão arterial, uma vez que ambos contem neurônios pré-motores simpáticos (Strack et al., 1989). Ademais, estudos recentes demonstraram que a hipertensão pode danificar a barreira hematoencefálica nestas regiões, formando as chamadas janelas, e, desta forma, torná-las suscetíveis às ações da ANG II circulante (Biancardi et al., 2014). Sendo assim, a ANG II circulante poderia atuar diretamente no PVN e RVL, aumentando a pressão arterial e a atividade simpática. Outro fator a ser levado em consideração é que a hipertensão renovascular também causa aumento da reabsorção de sódio e aumento da volemia (Leenen and De, 1975), os quais contribuem com a hipertensão observada e seus efeitos não são afetados pela super-expressão de MIF no NTS.

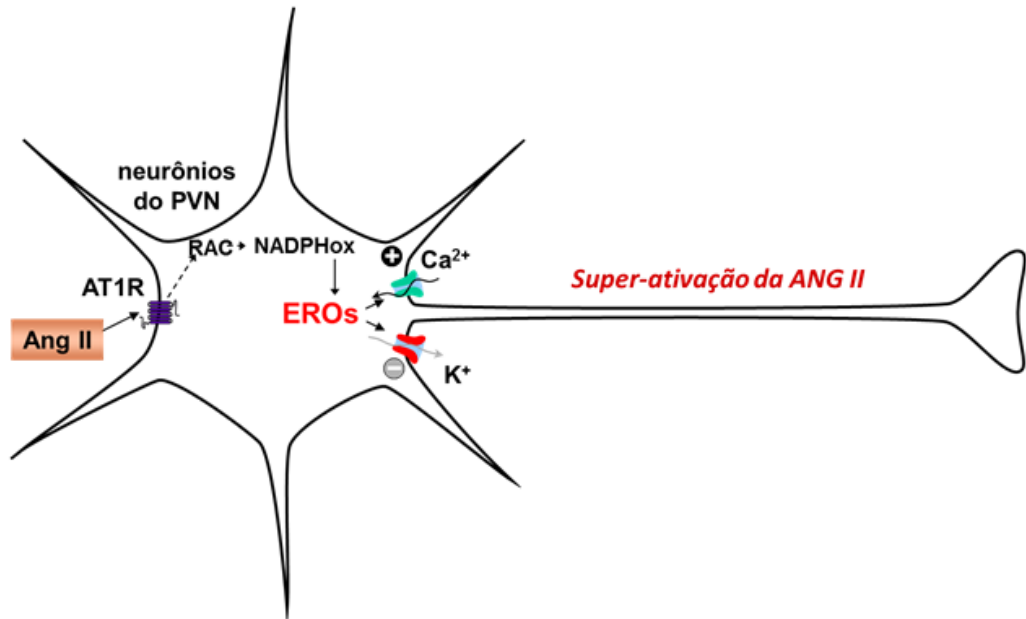
Alguns estudos relacionam o processo inflamatório com doenças cardiovasculares e hipertensão dependente de ANG II (Ferrario and Strawn, 2006; Shi et al., 2010). Recentemente, Waki et al. (Waki et al., 2007) demonstraram que no NTS de animais SHR há um aumento de moléculas de adesão (JAM-1), as quais estão associada à processos inflamatórios. Outro estudo demonstrou que a injeção de IL-6 no NTS é capaz de atenuar as respostas reflexas cardíacas, diminuindo a sensibilidade do barorreflexo, mostrando que as citocinas inflamatórias no NTS podem participar na regulação das respostas cardiovasculares moduladas pelo barorreflexo (Takagishi et al., 2010). À semelhança dos ratos SHR, os ratos hipertensos 2R1C podem apresentar, no NTS, um aumento das citocinas inflamatórias e uma diminuição das citocinas anti-inflamatórias, o que ajudaria a manutenção desta hipertensão. Além disso, a super-expressão de MIF no NTS de ratos hipertensos 2R1C poderia eventualmente normalizar estas possíveis alterações de citocinas anti-inflamatórias, contribuindo para a atenuação do

desenvolvimento e da manutenção desta hipertensão. Entretanto até o momento, não se sabe como se encontram os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no NTS de ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

Em humanos, está descrito que a hipertensão renovascular aumenta a atividade simpática cardíaca, o que pode aumentar o fator de risco para arritmias ventriculares e morte súbita (Petersson et al., 2002). Em ratos 2R1C, tem também sido descrito aumento da FC basal (Oliveira-Sales et al., 2014). No presente trabalho, verificamos que houve uma tendência ao aumento da FC em ratos 2R1C no final das 7 semanas. Porém, de forma clara, a super-expressão de MIF no NTS promoveu uma redução na FC basal, principalmente na fase do ciclo escuro, fase esta que os animais apresentam maior atividade. Desta forma, uma redução da FC pelo MIF pode auxiliar na redução da pressão arterial em ratos com hipertensão renovascular.

O mecanismo de ação pelo qual o MIF promove ações anti-ANG II tem sido descritas principalmente pelo laboratório do Dr. Colins Sumners da Universidade da Flórida. A ligação da ANG II nos receptores AT1 promove abertura canais de cálcio e fechamento de canais de potássio, promovendo uma despolarização celular, ativando os neurônios e induzindo formação de EROs (Kang et al., 1992; Sumners et al., 1994). Uma das EROs, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ativa a formação de MIF, que pela sua porção TPOR sequestra as EROs (Harrison and Sumners, 2009), conforme esquematizado na Figura 14. Dessa maneira, em animais normotensos, a ativação dos receptores AT1 pela ANG II induz a formação de MIF, que contra-regula as ações intracelulares da ANG II. Podemos dizer que, nestes animais, a formação de MIF seria um mecanismo de proteção às ações da ANG II. No entanto, por algum motivo, esse mecanismo de auto-proteção pode estar prejudicado em neurônios do NTS de ratos hipertensos 2R1C, e a super-expressão de MIF no NTS atuaria contribuindo para reduzir os efeitos na pressão arterial e barorreflexo da ANG II.

(A)



(B)

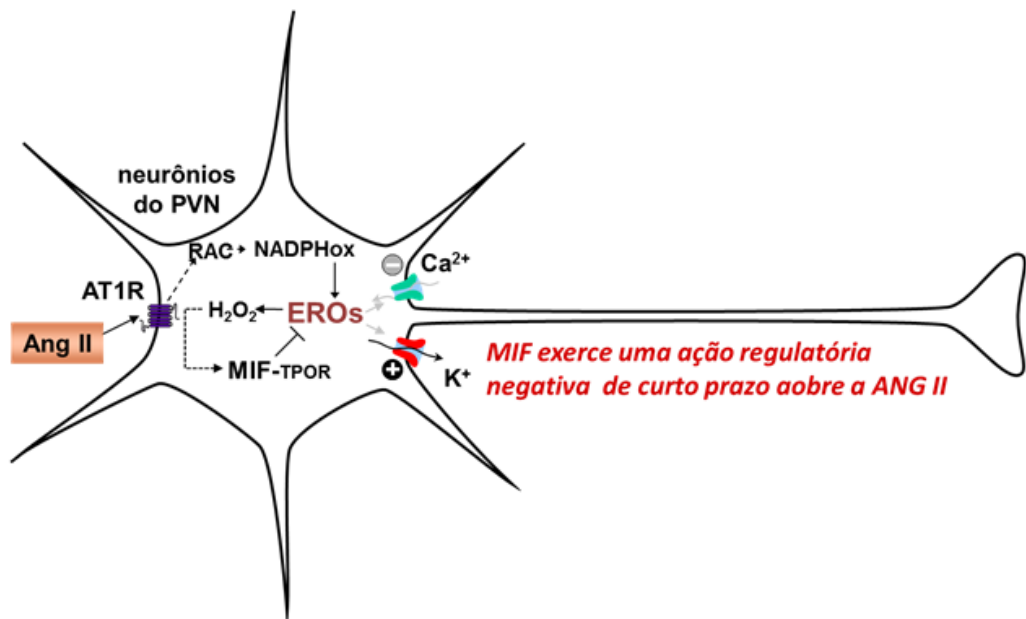


Figura 14 - Esquema mostrando as ações da ANG II, via receptor AT1 e o efeito contra-regulatório do MIF.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam que a super-expressão de MIF nos neurônios do NTS de ratos com hipertensão renovascular 2R1C impede o pleno desenvolvimento da hipertensão e melhora a função do barorreflexo, possivelmente por uma ação anti-ANG II do MIF. A melhora do barorreflexo e da FC basais podem ter contribuído para os efeitos observados na pressão arterial de ratos com hipertensão renovascular.

7. REFERÊNCIAS

Allen, A. M. et al., 1987, Angiotensin II receptors and angiotensin converting enzyme in the medulla oblongata: *Hypertension*, v. 9, no. 6 Pt 2, p. III198-III205.

Allen, A. M., M. J. McKinley, B. J. Oldfield, R. A. Dampney, and F. A. Mendelsohn, 1988, Angiotensin II receptor binding and the baroreflex pathway: *Clin.Exp.Hypertens.A*, v. 10 Suppl 1, p. 63-78.

Bacher, M. et al., 1998, MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function: *Mol.Med.*, v. 4, no. 4, p. 217-230.

Badoer, E., and J. Merolli, 1998, Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that project to the rostral ventrolateral medulla are activated by haemorrhage: *Brain Res.*, v. 791, no. 1-2, p. 317-320.

Baekey, D. M., Y. I. Molkov, J. F. Paton, I. A. Rybak, and T. E. Dick, 2010, Effect of baroreceptor stimulation on the respiratory pattern: insights into respiratory-sympathetic interactions: *Respir.Physiol Neurobiol.*, v. 174, no. 1-2, p. 135-145.

Bains, J. S., A. Potyok, and A. V. Ferguson, 1992, Angiotensin II actions in paraventricular nucleus: functional evidence for neurotransmitter role in efferents originating in subfornical organ: *Brain Res.*, v. 599, no. 2, p. 223-229.

Berenguer, L. M., J. Garcia-Estan, M. Ubeda, A. J. Ortiz, and T. Quesada, 1991, Role of renin-angiotensin system in the impairment of baroreflex control of heart rate in renal hypertension: *J Hypertens*, v. 9, no. 12, p. 1127-1133.

Berg, R. G., F. H. Leenen, and J. W. De, 1979, Plasma renin activity and sodium, potassium and water excretion during reversal of hypertension in the one-clip two-kidney hypertensive rat: *Clin.Sci.(Lond)*, v. 57, no. 1, p. 47-52.

Biancardi, V. C., S. J. Son, S. Ahmadi, J. A. Filosa, and J. E. Stern, 2014, Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier: *Hypertension*, v. 63, no. 3, p. 572-579.

Blanch, G. T., A. H. Freiria-Oliveira, G. F. Speretta, E. J. Carrera, H. Li, R. C. Speth, E. Colombari, C. Sumners, and D. S. Colombari, 2014, Increased Expression of Angiotensin II Type 2 Receptors in the Solitary-Vagal Complex Blunts Renovascular Hypertension: *Hypertension*, v. 64, no. 4, p. 777-783.

Britto, R. R., R. A. Santos, C. R. Fagundes-Moura, M. C. Khosla, and M. J. Campagnole-Santos, 1997, Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats: *Hypertension*, v. 30, no. 3 Pt 2, p. 549-556.

Busche, S., S. Gallinat, M. A. Fleegal, M. K. Raizada, and C. Sumners, 2001, Novel role of macrophage migration inhibitory factor in angiotensin II regulation of neuromodulation in rat brain: *Endocrinology*, v. 142, no. 11, p. 4623-4630.

Calandra, T., and T. Roger, 2003, Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 3, no. 10, p. 791-800.

Carey, R. M., 2013, Newly Discovered Components and Actions of the Renin-angiotensin System: *Hypertension*, v. 62, no. 5, p. 818-822.

Carter, D., and D. Murphy, 1999, *Molecular Neuroscience Essex*, Pearson Education Limited.

Carvalho, T. H., C. T. Bergamaschi, O. U. Lopes, and R. R. Campos, 2003, Role of endogenous angiotensin II on glutamatergic actions in the rostral ventrolateral medulla in Goldblatt hypertensive rats: *Hypertension*, v. 42, no. 4, p. 707-712.

Cervenka, L., V. Horacek, I. Vaneckova, J. A. Hubacek, M. I. Oliverio, T. M. Coffman, and L. G. Navar, 2002, Essential role of AT1A receptor in the development of 2K1C hypertension: *Hypertension*, v. 40, no. 5, p. 735-741.

Chen, A. D., S. J. Zhang, N. Yuan, Y. Xu, W. De, X. Y. Gao, and G. Q. Zhu, 2011, Angiotensin AT1 receptors in paraventricular nucleus contribute to sympathetic activation and enhanced cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats: *Exp.Physiol*, v. 96, no. 2, p. 94-103.

Ciriello, J., S. L. Hochstenbach, and S. Roder, 1994, Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferents fibers in the rat, in IRA Barraco ed., *Nucleus of the Solitary Tract*: Boca Raton, Florida, CRC Press, p. 35-50.

Colombari, E. et al., 2010, Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Paraventricular Nucleus Plays a Major Role in the Sympathoexcitatory Response to Salt: *Hypertension*, v. 56, p. 956-963.

Colombari, E., J. V. Menani, and W. T. Talman, 1996, Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats: *Am.J.Physiol.*, v. 270, p. R1220-R1225.

Cottle, M. A., 1964, Degeneration studies of the primary afferents of IXth and Xth cranial nerves in the cat: *The Journal of Comparative Neurology*, v. 122, p. 329-345.

De Gasparo, M., K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright, and T. Unger, 2000, *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors: Pharmacol.Rev.*, v. 52, no. 3, p. 415-472.

de Oliveira-Sales, E. B., E. E. Nishi, M. A. Boim, M. S. Dolnikoff, C. T. Bergamaschi, and R. R. Campos, 2010, Upregulation of AT1R and iNOS in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) is essential for the sympathetic hyperactivity and hypertension in the 2K-1C Wistar rat model: *Am.J.Hypertens.*, v. 23, no. 7, p. 708-715.

Farah, V. M., E. D. Moreira, M. D. Pires, M. C. Irigoyen, and E. M. Krieger, 1999, Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats: *Braz.J Med.Biol.Res.*, v. 32, no. 3, p. 361-369.

Feitosa, G. S., G. S. Feitosa Filho, and E. N. Carvalho, 2012, Alterações cardiovasculares da hipertensão arterial: hipertrofia ventricular esquerda, doença coronária e insuficiência cardíaca: *Rev.Bras.Hipertens*, v. 9, p. 280-287.

Ferrario, C. M., and W. B. Strawn, 2006, Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease: *Am.J Cardiol.*, v. 98, no. 1, p. 121-128.

Foulquier, S., U. M. Steckelings, and T. Unger, 2013, Perspective: A tale of two receptors: *Nature*, v. 493, no. 7434, p. S9.

Freiria-Oliveira, A. H., G. T. Blanch, H. Li, E. Colombari, D. S. A. Colombari, and C. Sumners, 2013, Macrophage migration inhibitory factor in the nucleus of solitary tract decreases blood pressure in SHR: *Cardiovascular Research*, v. 97, no. 1, p. 153-160.

Furuya, W. I., M. Bassi, J. V. Menani, E. Colombari, D. B. Zoccal, and D. S. Colombari, 2014, Differential modulation of sympathetic and respiratory activities by cholinergic mechanisms in the nucleus of the solitary tract in rats: *Exp.Physiol*, v. 99, no. 5, p. 743-758.

Gavras, H., H. B. Brunner, E. D. Vaughan, and J. H. Laragh, 1973, Angiotensin-sodium interaction in blood pressure maintenance of renal hypertensive and normotensive rats: *Science*, v. 180, no. 4093, p. 1369-1371.

Goldblatt, H., 1938, STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION : VII. THE PRODUCTION OF THE MALIGNANT PHASE OF HYPERTENSION: *J.Exp.Med.*, v. 67, no. 5, p. 809-826.

Goldblatt, H., J. Lynch, R. F. Hanzal, and W. W. Summerville, 1934, STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION : I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA: *J.Exp.Med.*, v. 59, no. 3, p. 347-379.

Grassi, G., F. Quarti-Trevano, G. Brambilla, and G. Seravalle, 2010, Blood pressure control in resistant hypertension: new therapeutic options: *Expert.Rev.Cardiovasc.Ther.*, v. 8, no. 11, p. 1579-1585.

Grassi, G., G. Seravalle, F. Q. Trevano, R. Dell'Oro, and G. Mancia, 2012, Blood pressure control and antihypertensive treatment: *Curr.Vasc.Pharmacol.*, v. 10, no. 4, p. 506-511.

Guyenet, P. G., 2006, The sympathetic control of blood pressure: *Nat.Rev Neurosci*, v. 7, no. 5, p. 335-346.

Hansen, K. J., M. S. Edwards, T. E. Craven, G. S. Cherr, S. A. Jackson, R. G. Appel, G. L. Burke, and R. H. Dean, 2002, Prevalence of renovascular disease in the elderly: a population-based study: *J.Vasc.Surg.*, v. 36, no. 3, p. 443-451.

Harrison, R. A., and C. Sumners, 2009, Redox regulation of macrophage migration inhibitory factor expression in rat neurons: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 390, no. 1, p. 171-175.

Herbert, H., M. M. Moga, and C. B. Saper, 1990, Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat: *The Journal of Comparative Neurology*, v. 293, p. 540-580.

Johansson, M., M. Elam, B. Rundqvist, G. Eisenhofer, H. Herlitz, G. Lambert, and P. Friberg, 1999, Increased sympathetic nerve activity in renovascular hypertension: *Circulation*, v. 99, no. 19, p. 2537-2542.

Johnson, A. K., and A. D. Loewy, 1990, Circumventricular organs and their role in visceral functions, in AD Loewy and KM Spyer eds., *Central regulation of autonomic functions*: New York, Oxford University Press, p. 247-267.

Kang, J., C. Sumners, and P. Posner, 1992, Modulation of net outward current in cultured neurons by angiotensin II: involvement of AT1 and AT2 receptors: *Brain Res.*, v. 580, no. 1-2, p. 317-324.

Kaschina, E., and T. Unger, 2003, Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function: *Blood Press*, v. 12, no. 2, p. 70-88.

Klein, R. L., M. E. Hamby, Y. Gong, A. C. Hirko, S. Wang, J. A. Hughes, M. A. King, and E. M. Meyer, 2002, Dose and promoter effects of adeno-associated viral vector for green fluorescent protein expression in the rat brain: *Exp.Neurol.*, v. 176, no. 1, p. 66-74.

Leenen, F. H., and J. W. De, 1970, Plasma renin activity and renal blood flow in renal hypertensive rats with different blood pressure levels: *J.Endocrinol.*, v. 48, no. 4, p. lxxv.

Leenen, F. H., and J. W. De, 1975, Plasma renin and sodium balance during development of moderate and severe renal hypertension in rats: *Circ.Res.*, v. 36, no. 6 Suppl 1, p. 179-186.

Li, H., Y. Gao, C. D. Freire, M. K. Raizada, G. M. Toney, and C. Sumners, 2006, Macrophage migration inhibitory factor in the PVN attenuates the central pressor and dipsogenic actions of angiotensin II: *FASEB J*, v. 20, no. 10, p. 1748-1750.

Li, H., Y. Gao, Y. Qi, M. J. Katovich, N. Jiang, L. N. Braseth, D. A. Scheuer, P. Shi, and C. Sumners, 2008, Macrophage migration inhibitory factor in hypothalamic paraventricular nucleus neurons decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats: *FASEB J*, v. 22, no. 9, p. 3175-3185.

Livak, K. J., and T. D. Schmittgen, 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method: *Methods*, v. 25, no. 4, p. 402-408.

Lohmeier, T. E., 2001, The sympathetic nervous system and long-term blood pressure regulation: *Am.J.Hypertens.*, v. 14, no. 6 Pt 2, p. 147S-154S.

Lohmeier, T. E., E. D. Irwin, M. A. Rossing, D. J. Serdar, and R. S. Kieval, 2004, Prolonged activation of the baroreflex produces sustained hypotension: *Hypertension*, v. 43, no. 2, p. 306-311.

Mann, S. J., 2003, Neurogenic essential hypertension revisited: the case for increased clinical and research attention: *Am J Hypertens.*, v. 16, no. 10, p. 881-888.

Marson, O., M. A. Saragoca, A. B. Ribeiro, D. Bossolan, S. Tufik, and O. L. Ramos, 1983, Anteroventral third ventricle and renin-angiotensin system interaction in the two-kidney, one clip hypertensive rat: *Hypertension*, v. 5, no. 6 Pt 3, p. V90-V93.

Martinez-Maldonado, M., 1991, Pathophysiology of renovascular hypertension: *Hypertension*, v. 17, no. 5, p. 707-719.

Matsumura, K., D. B. Averill, and C. M. Ferrario, 1998, Angiotensin II acts at AT1 receptors in the nucleus of the solitary tract to attenuate the baroreceptor reflex: *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 275, no. 5, p. R1611-R1619.

McKinley, M. J., R. M. McAllen, G. L. Pennington, A. Smardencas, R. S. Weisinger, and B. J. Oldfield, 1996, Physiological actions of angiotensin II mediated by AT1 and AT2 receptors in the brain: *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol Suppl*, v. 3, p. S99-104.

Michelini, L. C., and L. G. Bonagamba, 1990, Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats: *Hypertension*, v. 15, no. 2 Suppl, p. I45-I50.

Moreira, T. S., A. C. Takakura, E. Colombari, and J. V. Menani, 2009, Antihypertensive effects of central ablations in spontaneously hypertensive rats: *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, v. 296, no. 6, p. R1797-R1806.

Morishita, R. et al., 1995, Effect of an antihypertensive drug on brain angiotensin II levels in renal and spontaneously hypertensive rats: *Clin.Exp Pharmacol.Physiol*, v. 22, no. 9, p. 665-669.

Navar, L. G., L. Zou, A. Von Thun, C. Tarng Wang, J. D. Imig, and K. D. Mitchell, 1998, Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension: *Physiology*, v. 13, no. 4, p. 170-176.

Niederberger, M., J. F. Aubert, J. Nussberger, H. R. Brunner, and B. Waeber, 1995, Sympathetic nerve activity in conscious renal hypertensive rats treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor or an angiotensin II antagonist: *J Hypertens*, v. 13, no. 4, p. 439-445.

Nishi, E. E., C. T. Bergamaschi, E. B. Oliveira-Sales, K. A. Simon, and R. R. Campos, 2013, Losartan reduces oxidative stress within the rostral ventrolateral medulla of rats with renovascular hypertension: *Am.J.Hypertens.*, v. 26, no. 7, p. 858-865.

Oldfield, B. J., E. Badoer, D. K. Hards, and M. J. McKinley, 1994, Fos Production in retrogradely labelled neurons of the lamina terminalis following intravenous infusion of either hypertonic saline or angiotensin II: *Neuroscience*, v. 60, no. 1, p. 255-262.

Oliveira-Sales, E. B., E. E. Nishi, B. A. Carillo, M. A. Boim, M. S. Dolnikoff, C. T. Bergamaschi, and R. R. Campos, 2009, Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension: *Am.J.Hypertens.*, v. 22, no. 5, p. 484-492.

Oliveira-Sales, E. B., M. A. Toward, R. R. Campos, and J. F. Paton, 2014, Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in rats: *Auton.Neurosci.*, v. 183, p. 23-29.

Paton, J. F., and S. Kasparov, 1999, Differential effects of angiotensin II on cardiorespiratory reflexes mediated by nucleus tractus solitarii - a microinjection study in the rat: *J Physiol*, v. 521 Pt 1, p. 213-225.

Paxinos, G., and C. Watson, 1986, *The rat brain in stereotaxic coordinates* San Diego, Academic Press, Inc.

Petersson, M. J., B. Rundqvist, M. Johansson, G. Eisenhofer, G. Lambert, H. Herlitz, G. Jensen, and P. Friberg, 2002, Increased cardiac sympathetic drive in renovascular hypertension: *J.Hypertens.*, v. 20, no. 6, p. 1181-1187.

Pires, W., S. P. Wanner, M. R. Lima, I. A. Fonseca, U. Fumega, A. S. Haibara, C. C. Coimbra, and N. R. Lima, 2013, Physical exercise performance in temperate and warm environments is decreased by an impaired arterial baroreflex: *PLoS.One.*, v. 8, no. 8, p. e72005.

Pradhan, N., and N. F. Rossi, 2013, Interactions between the sympathetic nervous system and angiotensin system in renovascular hypertension: *Curr.Hypertens.Rev.*, v. 9, no. 2, p. 121-129.

Reis, D. J., A. R. Granata, M. H. Perrone, and W. T. Talman, 1981, Evidence that glutamic acid is the neurotransmitter of baroreceptor afferent terminating in the nucleus tractus solitarius (NTS): *J.Auton.Nerv.Syst.*, v. 3, no. 2-4, p. 321-334.

Remuzzi, G., 1999, Sympathetic overactivity in hypertensive patients with chronic renal disease: *N.Engl.J.Med.*, v. 340, no. 17, p. 1360-1361.

Ross, C. A., D. A. Ruggiero, and D. J. Reis, 1985, Projections from the nucleus tractus solitarius to the rostral ventrolateral medulla: *The Journal of Comparative Neurology*, v. 242, no. 511, p. 534.

Sato, M. A., J. V. Menani, O. U. Lopes, and E. Colombari, 2001, Lesions of the Commissural Nucleus of the Solitary Tract Reduce Arterial Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats: *Hypertension*, v. 38, no. 3, p. 560-564.

Shafton, A. D., A. Ryan, and E. Badoer, 1998, Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat: *Brain Res.*, v. 801, p. 239-243.

Shi, P. et al., 2010, Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension: *Hypertension*, v. 56, no. 2, p. 297-303.

Smith, S. H., and S. P. Bishop, 1986, Selection criteria for drug-treated animals in two-kidney, one clip renal hypertension: *Hypertension*, v. 8, no. 8, p. 700-705.

Strack, A. M., W. B. Sawyer, H. C. Hughes Jr, K. B. Platt, and A. D. Loewy, 1989, A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal cell body labelling with pseudorabies virus: *Brain Res.Rev.*, v. 491, p. 274-296.

Sumners, C., M. K. Raizada, J. Kang, D. Lu, and P. Posner, 1994, Receptor-mediated effects of angiotensin II on neurons: *Front Neuroendocrinol.*, v. 15, no. 3, p. 203-230.

Sun, C., H. Li, L. Leng, M. K. Raizada, R. Bucala, and C. Sumners, 2004, Macrophage migration inhibitory factor: an intracellular inhibitor of angiotensin II-induced increases in neuronal activity: *Journal of Neuroscience*, v. 24, no. 44, p. 9944-9952.

Takagishi, M., H. Waki, M. E. Bhuiyan, S. S. Gouraud, A. Kohsaka, H. Cui, T. Yamazaki, J. F. Paton, and M. Maeda, 2010, IL-6 microinjected in the nucleus tractus solitarius attenuates cardiac baroreceptor reflex function in rats: *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, v. 298, no. 1, p. R183-R190.

Talman, W. T., M. H. Perrone, and D. J. Reis, 1980, Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers: *Science*, v. 209, no. 4458, p. 813-815.

Ter Horst, G. J., and D. C. Streefland, 1994, Ascending projections of the solitary tract nucleus, in IRA Barraco ed., *Nucleus of the Solitary Tract*: Boca Raton, Florida, CRC Press, p. 93-104.

Toney, G. M., and J. P. Porter, 1993, Effects of blockade of AT1 and AT2 receptors in brain on the central angiotensin II pressor response in conscious spontaneously hypertensive rats: *Neuropharmacology*, v. 32, no. 6, p. 581-589.

Tsutsumi, K., and J. M. Saavedra, 1991, Quantitative autoradiography reveals different angiotensin II receptor subtypes in selected rat brain nuclei: *J.Neurochem.*, v. 56, no. 1, p. 348-351.

Tsutsumi, K., A. Seltzer, and J. M. Saavedra, 1993, Angiotensin II receptor subtypes and angiotensin-converting enzyme in the fetal rat brain: *Brain Res.*, v. 631, no. 2, p. 212-220.

Tsyrlin, V. A., M. M. Galagudza, N. V. Kuzmenko, M. G. Pliss, N. S. Rubanova, and Y. I. Shcherbin, 2013, Arterial baroreceptor reflex counteracts long-term blood pressure increase in the rat model of renovascular hypertension: *PLoS ONE*, v. 8, no. 6, p. e64788.

Veerasingham, S. J., and M. K. Raizada, 2003, Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives: *Br.J.Pharmacol.*, v. 139, no. 2, p. 191-202.

Waki, H., B. Liu, M. Miyake, K. Katahira, D. Murphy, S. Kasparov, and J. F. Paton, 2007, Junctional adhesion molecule-1 is upregulated in spontaneously hypertensive rats: evidence for a prohypertensive role within the brain stem: *Hypertension*, v. 49, no. 6, p. 1321-1327.

Yu, L., M. Zheng, W. Wang, G. J. Rozanski, I. H. Zucker, and L. Gao, 2010, Developmental changes in AT1 and AT2 receptor-protein expression in rats: *J.Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.*, v. 11, no. 4, p. 214-221.

Zimmerman, M. C., and R. L. Davisson, 2004, Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function: *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 84, no. 2-3, p. 125-149.

Zimmerman, M. C., E. Lazartigues, J. A. Lang, P. Sinnayah, I. M. Ahmad, D. R. Spitz, and R. L. Davisson, 2002, Superoxide Mediates the Actions of Angiotensin II in the Central Nervous System: *Circulation Research*, v. 91, no. 11, p. 1038-1045.