
Universidade Federal de São Carlos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
PIPGCF UFSCar/UNESP

MARIANA RUIZ LAUAR

**ENVOLVIMENTO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DAS
CITOCINAS NA HIPERTENSÃO**

ARARAQUARA

2017

Universidade Federal de São Carlos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
PIPGCF UFSCar/UNESP

MARIANA RUIZ LAUAR

**ENVOLVIMENTO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DAS
CITOCINAS NA HIPERTENSÃO**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas PIPGCF UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: José Vanderlei Menani

ARARAQUARA

2017



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 da Tese de Doutorado da candidata Marliana Ruiz Lauer, realizada em 23/03/2017:

Prof. Dr. José Vanderlei Menani
UNESP

Prof. Dra. Arés Carolina Thomaz Akakura
USP

Prof. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari
UNESP

Prof. Dra. Regina Célia Vencramini
UNESP

Prof. Dra. Graziela Torres Bend
PUC GO

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha querida mãe, Regina Aparecida Ruiz Lauar, por ser o meu maior exemplo de força, coragem e determinação e ao meu saudoso pai, Walid Geraldo Amin Lauar que deixou o legado dos estudos como sua maior herança. Meu eterno agradecimento pela vida, pelo amor, pelos esforços, pela educação, e por nunca terem desistido de mim. Amo vocês incondicionalmente.

Aos meus amados irmãos Juliana Ruiz Lauar e Tarik Ruiz Lauar por serem meus melhores amigos, conselheiros e incentivadores durante toda a minha vida. Muito grata pelo amor e pelo apoio de sempre.

E a minha avó, Isabel Tecco, pelo amor e por ser um exemplo de mulher forte e batalhadora.

Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida, pelas graças alcançadas, e pelas inúmeras chances que me são oferecidas de ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao Prof. José Vanderlei Menani pela orientação, ensinamento, dedicação e, principalmente, pela paciência durante estes dez anos, desde minha iniciação científica até o final do doutorado.

Ao Prof. Dr. Thiago Moreira Santos pela oportunidade de realizar o estágio científico para o aprendizado de técnicas eletrofisiológicas e ao doutorando Leonardo Tedesco Totola pela ajuda na realização do protocolo de registro de atividade simpática.

As Professoras, Dr^a. Débora Simões de Almeida Colombari, Dr^a. Ana Carolina Thomaz Takakura, Dr^a. Graziela Torres Blanch e Dr^a. Regina Célia Vendramini por aceitarem o convite para participar da banca de defesa e contribuírem com seus conhecimentos para enriquecer esta tese.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia da UNESP de Araraquara e do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos durante minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da UNESP de Araraquara Silas Pereira Barbosa, Silvana A. D. Malavolta, Carla Molina, Mikail D. dos Santos e Ana V. de Oliveira por participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho.

A todos meus amigos do laboratório de Fisiologia da UNESP de Araraquara pela amizade desprendida, pelo companheirismo nos bons e maus momentos, pela ajuda na execução dos experimentos e pela oportunidade de poder aprender a cada dia com todos vocês.

Aos meus amigos Mariana Melo, Guilherme Speretta, Silvia Gasparini, Rafaela Barbosa, Naira Marques e André Henrique Freiria-Oliveira pela colaboração nos experimentos executados.

Aos ratos, seres estes que ofereço meu profundo respeito e ética e sem os quais não seria possível alcançar os progressos científicos.

A toda minha família que mesmo a distância sempre manifestou tamanho amor, apoio e cuidado. E a todos os meus amigos, que mesmo longe, participaram ativamente das minhas conquistas.

Aos meus amados sobrinhos, Manuela e Henrique, por me transbordarem de amor e alegria a cada dia além de serem minha maior motivação para seguir em frente.

As agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (processo 2013/05189-4), e também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sem as quais seria impossível à realização deste trabalho.

*“É o que nós pensamos que sabemos
que nos impede de aprender”*

(Claude Bernard)

RESUMO

A hipertensão arterial (HA) é uma doença multifatorial, caracterizada pelo aumento dos níveis de pressão arterial (PA) que ocasiona um aumento de risco de doenças coronarianas, derrame cerebral e insuficiência cardíaca. Vários estudos visam compreender as possíveis causas e mecanismos da hipertensão na tentativa de se buscar novos tratamentos para esta doença. Estudos já demonstraram a participação do estresse oxidativo, causado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no desenvolvimento e a manutenção da hipertensão. As EROs como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são produzidas endogenamente e podem participar da sinalização intra e intercelular, incluindo a mediação das respostas à angiotensina II (ANG II). Injeções intracerebroventriculares de H_2O_2 ou o aumento de H_2O_2 endógeno utilizando o inibidor da catalase, o ATZ, reduziram a resposta pressora produzida pela injeção central de ANG II em ratos normotensos e hipertensos. No presente estudo, investigamos os efeitos da administração subcutânea (sc) aguda ou crônica do ATZ na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e com hipertensão do tipo 2 rins, 1 clipe (2R1C). Estudamos também a modulação autonômica da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP), da atividade nervosa simpática renal (ANSr), o barorreflexo, a expressão gênica de citocinas inflamatórias, de componentes do sistema renina-angiotensina (SRA), das isoformas da NADPH oxidase e da ativação da micróglia (CD11) no hipotálamo em ratos normotensos e/ou hipertensos tratados com ATZ sc. Adicionalmente foram testados a resposta pressora da noradrenalina ou ANG II injetadas intravenosamente (iv), a resposta hipotensiva causada pelo bloqueio ganglionar com hexametônio, a ingestão de água e alimento e excreção urinária em ratos normotensos e hipertensos tratados com ATZ sc. Foram utilizados ratos Holtzman normotensos, ratos Holtzman com hipertensão 2R1C e SHR. A PAM e FC foram registradas em ratos conscientes e com livre movimentação, exceto ratos que foram usados para registro de atividade simpática. A injeção sc de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) agudamente reduziu por pelo menos 4 horas a PAM em SHR (192 ± 4 mmHg pré-injeção de ATZ, vs. 173 ± 6 mmHg após ATZ) e em ratos com hipertensão 2R1C (170 ± 8 mmHg pré-injeção de ATZ, vs. 158 ± 13 mmHg após ATZ) por pelo menos 4 horas e também reduziu a FC. O tratamento crônico com ATZ (600 mg/kg de peso corporal/dia) sc por 9 dias também reduziu a PAM em ratos SHR (ATZ: 172 ± 8 mmHg, vs. salina: 198 ± 2 mmHg) e em ratos 2R1C (ATZ: 137 ± 12 mmHg, vs. salina: 181 ± 9 mmHg), sem alterar a FC, o comprometimento do barorreflexo presente em animais hipertensos, a ingestão de água e

alimento e a excreção urinária. O tratamento com ATZ sc cronicamente reduziu a modulação simpática da PAS em ratos SHR (ATZ: $2,6 \pm 1,2$ mmHg², vs. salina: $6,3 \pm 3,4$ mmHg²) e em ratos 2R1C (ATZ: $3,2 \pm 0,4$ mmHg², vs. salina: $7,6 \pm 1,5$ mmHg²) e do IP, aumentou a modulação parassimpática do IP em ratos SHR (ATZ: $90,5 \pm 4,5$ un, vs. salina: $76,5 \pm 7,8$ un) e em ratos 2R1C (ATZ: $85,3 \pm 2,9$ un vs. salina: $68,6 \pm 3$ un) e melhorou o balanço simpato-vagal em ratos SHR (ATZ: $0,11 \pm 0,05$, vs. salina: $0,35 \pm 0,17$) e em ratos 2R1C (ATZ: $0,19 \pm 0,05$, vs. salina: $0,52 \pm 0,09$). O tratamento crônico com ATZ sc por 9 dias em ratos com hipertensão 2R1C também reduziu a expressão de RNAm para interleucina 6 (IL-6) (ATZ: $0,80 \pm 0,06$ número de vezes, vs. salina: $2,32 \pm 0,36$ número de vezes), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e do receptor AT1 (AT1r) (ATZ: $0,74 \pm 0,04$ número de vezes, vs. salina: $1,19 \pm 0,22$ número de vezes) no hipotálamo. ATZ cronicamente em ratos SHR também reduziu a expressão de RNAm da IL-6 (ATZ: $1,17 \pm 0,07$ número de vezes, vs. salina: $1,53 \pm 0,11$ número de vezes), AT1r (ATZ: $0,81 \pm 0,03$ número de vezes, vs. salina: $1,0 \pm 0,04$ número de vezes), da isoforma NOX2 da NADPH oxidase (ATZ: $0,85 \pm 0,06$ número de vezes, vs. salina: $1,52 \pm 0,27$ número de vezes) e da ativação da micróglia (CD11) (ATZ: $1,47 \pm 0,06$ número de vezes, vs. salina: $1,79 \pm 0,08$ número de vezes) no hipotálamo. A injeção de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc em ratos com hipertensão 2R1C reduziu agudamente a atividade nervosa simpática renal ($-51,5 \pm 10\%$) e a resposta hipotensiva produzida pela injeção iv do bloqueador ganglionar hexametônio (ATZ: $\Delta -58 \pm 5$ mmHg, vs. salina: $\Delta -106 \pm 7$ mmHg), sem alterar a resposta pressora da noradrenalina ou ANG II iv, o que sugere que os efeitos anti-hipertensivos do ATZ seriam mais provavelmente causados pela redução da atividade simpática por uma ação central desta droga e não por uma ação vascular direta do ATZ. Portanto, os presentes resultados sugerem que o aumento da disponibilidade de H₂O₂ endógeno pela administração aguda ou crônica de ATZ sc produz efeitos anti-hipertensivos que são devidos a uma diminuição da atividade nervosa simpática que está associada com a diminuição da neuroinflamação, de receptores AT1, RNAm para NADPH oxidase e da ativação da micróglia no hipotálamo. Estes efeitos podem ser resultados de um bloqueio ou comprometimento das ações centrais da ANG II como demonstrado em estudo anterior (LAUAR et al., 2010).

Palavras-chave: Hipertensão, inibidor da catalase, neuroinflamação, hipotálamo, modulação autonômica, atividade simpática, balanço hidroeletrólítico, peróxido de hidrogênio, angiotensina II, pressão arterial.

ABSTRACT

Arterial hypertension (AH) is a multifactorial disease, characterized by increased levels of arterial pressure (AP) that causes an increased risk of coronary disease, stroke and congestive heart failure. Several studies have addressed the possible causes and mechanisms of hypertension in the attempt to seek new treatments for this disease. Studies have already showed the participation of oxidative stress, caused by increased production of reactive oxygen species (ROS) in the development and maintenance of hypertension. ROS like hydrogen peroxide (H_2O_2) are produced endogenously and may participate in intra- and extracellular signaling, including mediation of angiotensin II (ANG II) responses. Intracerebroventricular injection of H_2O_2 or the increase of endogenous H_2O_2 using the catalase inhibitor ATZ reduced the pressor responses to central ANG II in normotensive and hypertensive rats. In the present study, we investigated the effects of acute or chronic subcutaneous (sc) administration of ATZ on mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) in normotensives, spontaneously hypertensive rats (SHR) and 2-kidney, 1clip hypertensive rats (2K1C). We also studied the possible changes of autonomic modulation of systolic arterial pressure (SAP) and the pulse interval (PI), the renal sympathetic nerve activity, the baroreflex, the genic expression of inflammatory cytokines, components of the renin-angiotensin system (RAS), NADPH oxidase isoforms and microglia activity (CD11) in the hypothalamus in rats treated with sc ATZ. In addition, it was also tested the pressor response to noradrenaline or ANG II injected intravenously (iv), the hypotensive response to the ganglionic blockade with hexamethonium, food and water intake and urinary excretion in normotensive and hypertensive rats treated with sc administration of ATZ. Male normotensive Holtzman, 2K1C hypertensive Holtzman rats and SHR were used. MAP and HR were recorded in conscious, unrestrained rats, except in rats used to record sympathetic activity. The sc injection of ATZ (300 mg/kg of body weight) acutely reduced MAP in SHR (192 ± 4 mmHg pre-injection of ATZ vs. 173 ± 6 mmHg after ATZ) and in 2K1C rats (170 ± 8 mmHg pre-injection of ATZ, vs. 158 ± 13 mmHg after ATZ) for at least 4 h and also slightly reduced HR. Chronic daily treatment with ATZ (600 mg/kg of body weight/day) sc for 9 days also reduced MAP in SHR (ATZ: 172 ± 8 mmHg, vs. saline: 198 ± 2 mmHg) and in 2K1C rats (ATZ: 137 ± 12 mmHg, vs. saline: 181 ± 9 mmHg) without altering HR, the impairment of baroreflex present in hypertensive rats, food and water intake and urinary excretion. The treatment with ATZ sc chronically reduced sympathetic modulation of SAP in SHR (ATZ: 2.6 ± 1.2 mmHg², vs. saline: 6.3 ± 3.4 mmHg²) and in 2K1C rats (ATZ: 3.2 ± 0.4

mmHg², vs. saline: 7.6 ± 1.5 mmHg²) and PI, enhanced the parasympathetic modulation of PI in SHR (ATZ: 90.5 ± 4.5 un, vs. saline: 76.5 ± 7.8 un) and 2K1C rats (ATZ: 85.3 ± 2.9 un vs. saline: 68.6 ± 3 un) and improved the sympatho-vagal balance in SHR (ATZ: 0.11 ± 0.05 , vs. saline: 0.35 ± 0.17) and in 2K1C rats (ATZ: 0.19 ± 0.05 , vs. saline: 0.52 ± 0.09). Chronic treatment with ATZ sc for 9 days in 2K1C hypertensive rats also reduced the mRNA expression of interleukin-6 (IL-6) (ATZ: 0.80 ± 0.06 , vs. saline: 2.32 ± 0.36 fold change), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and AT1 receptor (AT1r) (ATZ: 0.74 ± 0.04 , vs. saline: 1.19 ± 0.22 fold change) in the hypothalamus. ATZ chronically in SHR also decreased mRNA expression of IL-6 (ATZ: 1.17 ± 0.07 , vs. saline: 1.53 ± 0.11 fold change), AT1r (ATZ: 0.81 ± 0.03 , vs. saline: 1.0 ± 0.04 fold change), NADPH oxidase isoform NOX2 (ATZ: 0.85 ± 0.06 , vs. saline: 1.52 ± 0.27 fold change) and the microglia activation indicator gene (CD11) (ATZ: 1.47 ± 0.06 , vs. saline: 1.79 ± 0.08 fold change) in the hypothalamus. The injection of ATZ (300 mg/kg of body weight) sc in 2K1C hypertensive rats acutely reduced renal sympathetic nerve activity ($-51.5 \pm 10\%$) and the hypotensive response to iv injection of the ganglionic blocker hexamethonium (ATZ: -58 ± 5 mmHg; vs. saline: -106 ± 7 mmHg), without changing the pressor responses to noradrenaline or ANG II iv, in rats treated with sc ATZ. Therefore, the present results suggest that increasing the availability of endogenous H₂O₂ by the acute or chronic administration of ATZ sc produces anti-hypertensive effects due to decreases in sympathetic nerve activity that are associated with a decrease in neuroinflammation, AT1 receptor and NADPH oxidase mRNA and activation the microglia in the hypothalamus. These effects might result from an impairment of the central action of ANG II as demonstrated in a previous study (LAUAR et al., 2010).

Keywords: Hypertension, catalase inhibitor, neuroinflammation, hypothalamus, autonomic modulation, sympathetic activity, hydroelectrolytic balance, hydrogen peroxide, angiotensin II, arterial pressure.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mudanças na PAM induzida **(A)** pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) combinada com injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 µmol/1 µl) e pela **(B)** injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) combinada com injeções icv de salina ou ATZ (5 nmol/1 µl) em ratos normotensos. Os resultados são representados pela média ± EPM, n= número de animais. (Lauar et al., 2010).31
- Figura 2:** Mudanças na PAM induzida **(A)** pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) combinada com injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 µmol/1 µl) e pela **(B)** injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) combinada com injeções icv de salina ou ATZ (5 nmol/1 µl) em ratos SHR. Os resultados são representados pela média ± EPM, n= número de animais. (Lauar et al., 2011).31
- Figura 3:** Mudanças na PAM induzida **(A)** pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) combinada com injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 µmol/1 µl) e pela **(B)** injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) icv combinada com injeções iv de salina ou ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) em ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados são representados pela média ± EPM, n= número de animais. (Lauar et al., 2012).32
- Figura 4:** Proposta de modelo de ação das EROS no controle da resposta pressora da ANG II [baseado em (LAUAR et al., 2010; ZIMMERMAN et al., 2002)].33
- Figura 5:** Modificações da **(A)** PAM e **(B)** FC imediatamente após a injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc em ratos normotensos. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.....49
- Figura 6:** Modificações da **(A)** PAM e **(B)** FC imediatamente após a injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc em ratos SHR. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.51
- Figura 7:** Modificações da **(A)** PAM e **(B)** FC imediatamente após a injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc em ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.....53
-
-

Figura 8: Modificações da (A) PAM e (B) FC após o tratamento crônico com (600 mg/kg de peso corporal) sc em ratos SHR. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.....	55
Figura 9: Modificações da (A) PAM e (B) FC após o tratamento crônico com (600 mg/kg de peso corporal) sc em ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.	57
Figura 10: Análise espectral da (A) modulação simpática (LF) da PAS, da (B) modulação simpática (LF) do IP, da(C) modulação parassimpática (LF) do IP e da (D) razão LF/HF do IP dos animais normotensos (NT) e SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.	60
Figura 11: Análise espectral da (A) modulação simpática (LF) da PAS, da (B) modulação simpática (LF) do IP, da (C) modulação parassimpática (LF) do IP e da (D) razão LF/HF do IP dos animais normotensos (NT) e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.....	63
Figura 12: Modificações da (A) atividade nervosa simpática renal (ANSr), (B) atividade nervosa simpática esplâncnica (ANSs) e (C, D) PAM dos animais testados em A e B, respectivamente, após a injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc em ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.....	65
Figura 13: Traçado representativo demonstrando as modificações de PAM, atividade nervosa simpática renal (ANSr) e atividade nervosa simpática esplâncnica (ANSs) após a injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc em ratos com hipertensão 2R1C.	66
Figura 14: Expressão do RNAm no hipotálamo da (A) interleucina-6 (IL-6), do (B) fator de necrose tumoral- α (TNF- α), da (C) interleucina-1 β (IL-1 β) e da (D) interleucina-10 (IL-10) de animais normotensos (NT) e SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.	69

Figura 15: Expressão do RNAm no hipotálamo da (A) enzima conversora de angiotensina (ECA) e do (B) receptor AT1(AT1r) de animais normotensos (NT) e SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais..... 70

Figura 16: Expressão do RNAm no hipotálamo da (A) subunidade da NADPH oxidase NOX2 (NOX2), da (B) subunidade da NADPH oxidase NOX4 (NOX4) e do (C) marcador de ativação de micróglia (CD11) de animais normotensos (NT) e SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais. 71

Figura 17: Expressão do RNAm no hipotálamo da (A) interleucina-6 (IL-6), do (B) fator de necrose tumoral- α (TNF- α), da (C) interleucina-1 β (IL-1 β) e da (D) interleucina-10 (IL-10) de animais normotensos (NT) e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais..... 74

Figura 18: Expressão do RNAm no hipotálamo da (A) enzima conversora de angiotensina (ECA) e do (B) receptor AT1 (AT1r) de animais normotensos (NT) e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.. 75

Figura 19: Expressão do RNAm no hipotálamo da (A) subunidade da NADPH oxidase NOX2 (NOX2), da (B) subunidade da NADPH oxidase NOX4 (NOX4) e do (C) marcador de ativação de micróglia (CD11) de animais normotensos (NT) e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais..... 76

Figura 20: Função barorreflexa de ratos normotensos (NT) e SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc avaliada pelas injeções intravenosas de fenilefrina (5 μ g/kg) e nitroprussiato de sódio (30 μ g/kg). Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais. 78

Figura 21: Função barorreflexa de ratos normotensos (NT) e SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc avaliada pelas

injeções intravenosas de fenilefrina (5 µg/kg) e nitroprussiato de sódio (30 µg/kg). Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais. 80

Figura 22: Modificações da (A) PAM e (B) FC induzidas por injeções intravenosas (iv) de noradrenalina (1 nmol/0,1 ml) pré e pós-injeção de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc em ratos normotensos (NT) e ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais. 83

Figura 23: Modificações da (A) PAM e (B) FC induzidas por injeções intravenosas (iv) de angiotensina II (50 ng/0,1 ml) pré e pós-injeção de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc em ratos normotensos (NT) e ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais. 84

Figura 24: Modificações da (A) PAM e (B) FC após o bloqueio ganglionar com injeção intravenosa (iv) de hexametônio (30 mg/kg de peso corporal) pós-injeção de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc em ratos normotensos (NT) e com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais. 85

Figura 25: (A) ingestão diária de água, (B) ingestão diária de alimento, (C) peso corporal de ratos normotensos tratados cronicamente com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc e (D) ingestão diária de água, (E) ingestão diária de alimento, (F) peso corporal de ratos normotensos tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais. 87

Figura 26: (A) volume urinário diário, (B) excreção diária de Na⁺, (C) excreção diária de K⁺ de ratos normotensos tratados cronicamente com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc e (D) volume urinário diário, (E) excreção diária de Na⁺, (F) excreção diária de K⁺ de ratos normotensos tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais. 89

Figura 27: (A) ingestão diária de água, (B) ingestão diária de alimento, (C) peso corporal de ratos SHR tratados cronicamente com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc e (D) ingestão diária de água, (E) ingestão diária de alimento, (F) peso

corporal de ratos SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais..... 91

Figura 28: (A) volume urinário diário, (B) excreção diária de Na⁺, (C) excreção diária de K⁺ de ratos SHR tratados cronicamente com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc e (D) volume urinário diário, (E) excreção diária de Na⁺, (F) excreção diária de K⁺ de ratos SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais. 93

Figura 29: (A) ingestão diária de água, (B) ingestão diária de alimento, (C) peso corporal de ratos com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc e (D) ingestão diária de água, (E) ingestão diária de alimento, (F) peso corporal de ratos com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais..... 95

Figura 30: (A) volume urinário diário, (B) excreção diária de Na⁺, (C) excreção diária de K⁺ de ratos com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc e (D) volume urinário diário, (E) excreção diária de Na⁺, (F) excreção diária de K⁺ de ratos com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais. 97

Figura 31: Representação esquemática mostrando que a inibição da catalase pelo tratamento com ATZ diminui vários fatores, como IL-6, TNF- α , IL-1 β , AT1r, NOX2 e micróglia (gene CD11) no hipotálamo de animais hipertensos que leva a uma diminuição da atividade de neurônios pré-motores simpático que contribuem para a diminuição da atividade simpática cardíaca, vasomotora e renal que culmina na diminuição da pressão arterial dos animais hipertensos [corte encefálico modificado de (PAXINOS; WATSON, 1986)]..... 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados no presente estudo.	42
Tabela 2: PAM e FC em ratos normotensos e SHR tratados cronicamente com ATZ sc ou salina por 9 dias	59
Tabela 3: PAM e FC em ratos normotensos e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ ou salina sc por 9 dias	62
Tabela 4: Resumo das principais respostas obtidas após injeções agudas ou crônicas de ATZ em ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2R1C	98

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

µg – micrograma(s)

2R1C - hipertensão do tipo 2 rins-1 clipe

ANG I – angiotensina I

ANG II - angiotensina II

ANOVA- análise de variância

ANSr - atividade nervosa simpática renal

ANSs - atividade nervosa simpática esplâncnica

ASM – área septal medial

AT1 - receptor AT1

ATZ – 3-amino-1,2,4-triazol

AV3V – região anteroventral do terceiro ventrículo

bpm – batimentos por minuto

CD11 - marcador da ativação da micróglia

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CIL – coluna intermédio lateral

ECA - enzima conversora de angiotensina

EPM – erro padrão da média

EROs - espécies reativas de oxigênio

FC - frequência cardíaca

g – grama(s)

GABA – ácido γ-aminobutírico

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

h – hora(s)

H₂O – água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HA - hipertensão arterial

HF (IP) - alta frequência de análise espectral em relação ao intervalo de pulso

icv – intracerebroventricular

IL- 1β - interleucina 1β

IL-10 - interleucina 10

IL-6 - interleucina 6

IP - intervalo de pulso

iv - intravenosa

K⁺: potássio

K⁺_{ATP} – canais de potássio sensíveis a ATP

kg – quilograma(s)

LF (IP) - baixa frequência de análise espectral em relação ao intervalo de pulso

LF (PAS) - baixa frequência de análise espectral em relação à pressão arterial sistólica

mEq – miliequivalente

mg – miligrama(s)

MIF - fator inibitório de migração de macrófagos

min – minutos

ml – mililitro(s)

mmHg – milímetros de mercúrio

mmHg² – milímetros de mercúrio ao quadrado

MnPO – núcleo pre-óptico mediano

mV - milivolt

Na⁺: sódio

NADPH oxidase – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

ng – nanograma(s)

nmol – nanomol

NOS – núcleo supraóptico do hipotálamo

NOX2 - NADPH oxidase 2

NOX4 - NADPH oxidase 4

NPS – nitroprussiato de sódio

NTS – Núcleo do trato solitário

O₂ – oxigênio molecular

O₂⁻ - ânion superóxido

OCVs – órgãos circunventriculares

OSF – órgão subfornical

OVLT – órgão vasculoso da lâmina terminal

PA - pressão arterial

PAM - pressão arterial média

PAP – Pressão arterial pulsátil

PAS - pressão arterial sistólica

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

RNAm – ácido ribonucleico mensageiro

RT-PCR – reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase

RVL – região rostroventrolateral do bulbo

s - segundo

sc - subcutânea

SHR - ratos espontaneamente hipertensos

SNC – sistema nervoso central

SOD – enzima superóxido dismutase

SRA- sistema renina-angiotensina

TNF- α - fator de necrose tumoral- α

un – unidades normalizadas

VL – ventrículo lateral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL E MODELOS UTILIZADOS NA PESQUISA	25
1.2. ANGIOTENSINA II NA REGULAÇÃO CARDIOVASCULAR.....	27
1.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	28
1.4. INTERAÇÃO ENTRE ANG II E EROS.....	29
1.5. ENVOLVIMENTO ENTRE NEUROINFLAMAÇÃO, EROS E SIMPATOEXCITAÇÃO	34
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAL E MÉTODO	38
3.1. ANIMAIS	38
3.2. CIRURGIA PARA DESENVOLVIMENTO DA HIPERTENSÃO 2 RINS, 1 CLIPE	38
3.3. REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC)	38
3.4. FÁRMACOS UTILIZADOS.....	39
3.5. TESTE DAS RESPOSTAS BARORREFLEXAS	40
3.6. ANÁLISE DE VARIABILIDADE CARDIOVASCULAR	40
3.7. REAL TIME RT-PCR PARA MEDIDA DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS, DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA, DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA EXPRESSÃO GÊNICA PARA UM MARCADOR DE MICRÓGLIA (CD11)	41
3.8. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E ANESTÉSICOS PARA EXPERIMENTO EM ANIMAIS ANESTESIADOS.....	43
3.9. REGISTRO DA ATIVIDADE SIMPÁTICA	43
3.10. AVALIAÇÃO DA PAM E FC AS INJEÇÕES INTRAVENOSAS DE NORADRENALINA, ANG II E HEXAMETÔNIO EM ANIMAIS NORMOTENSOS E COM HIPERTENSÃO 2R1C	44
3.11. INGESTÃO DIÁRIA DE ÁGUA E RAÇÃO, PESO CORPORAL E EXCREÇÃO URINÁRIA.....	44
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
3.13. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS TESTADOS	45
3.13.1. <i>Estudo da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2R1C que receberam injeção aguda de ATZ sc. .</i>	<i>45</i>
3.13.2. <i>Estudo da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos SHR e com hipertensão 2R1C que receberam injeções crônicas de ATZ ou salina sc....</i>	<i>45</i>

3.13.3. Estudo da modulação simpática e parassimpática em ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2RIC tratados cronicamente com injeções de salina ou ATZ sc.....	45
3.13.4. Estudo da atividade simpática esplâncnica e renal em ratos com hipertensão 2RIC que receberam uma única injeção de ATZ sc.....	46
3.13.5. Estudo da expressão gênica no hipotálamo em ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2RIC tratados com injeção de salina ou ATZ sc cronicamente.....	46
3.13.6. Estudo das respostas barorreflexas em ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2RIC tratados com injeção de salina ou ATZ sc.....	46
3.13.7. Estudo das respostas pressoras da noradrenalina e ANG II injetada iv antes e depois da injeção sc de salina ou ATZ em ratos com hipertensão 2RIC.....	47
3.13.8. Estudo do bloqueio ganglionar em ratos normotensos e com hipertensão 2RIC após a injeção sc de salina ou ATZ.....	47
3.13.9. Estudo da ingestão diária de água e ração, peso corporal, excreção urinária e excreção de Na ⁺ e K ⁺ de ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2RIC tratados cronicamente com injeções sc diárias de ATZ ou salina	47
4. RESULTADOS	48
4.1. PAM E FC EM RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS TRATADOS COM INJEÇÃO AGUDA OU CRÔNICA SUBCUTÂNEA DE ATZ	48
4.1.1. Efeitos da injeção sc aguda de ATZ na PAM e FC em ratos normotensos.....	48
4.1.2. Efeitos da injeção sc aguda de ATZ na PAM e FC em ratos SHR.....	50
4.1.3. Efeitos da injeção sc aguda de ATZ na PAM e FC em ratos com hipertensão 2RIC	52
4.1.4. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na PAM e FC em ratos SHR	54
4.1.5. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na PAM e FC em ratos com hipertensão 2RIC.....	56
4.2. MODULAÇÃO AUTONÔMICA EM RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS TRATADOS COM INJEÇÃO CRÔNICA DE ATZ	58
4.2.1. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na modulação autonômica de ratos normotensos e SHR.....	58
4.2.2. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na modulação autonômica de ratos normotensos e com hipertensão 2RIC	61

4.3. EFEITOS DA INIBIÇÃO DA CATALASE PELA INJEÇÃO AGUDA DE ATZ SOBRE A PAM E ATIVIDADE SIMPÁTICA RENAL E ESPLÂNCNICA EM ANIMAIS COM HIPERTENSÃO 2R1C ANESTESIADOS.....	64
4.4. EXPRESSÃO DE RNAm DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS, DE COMPONENTES DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA, DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA ATIVAÇÃO DE MICRÓGLIA NO HIPOTÁLAMO DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS TRATADOS COM INJEÇÃO CRÔNICA DE ATZ	67
4.4.1. <i>Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na expressão de RNAm de citocinas inflamatórias, de componentes do sistema renina angiotensina (SRA), do estresse oxidativo e da ativação de micróglia no hipotálamo de ratos normotensos e SHR.....</i>	67
4.4.2. <i>Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na expressão de RNAm de citocinas inflamatórias, de componentes do sistema renina angiotensina (SRA), do estresse oxidativo e da ativação de microglia no hipotálamo de ratos normotensos e com hipertensão 2R1C.....</i>	72
4.5. EFEITOS NAS RESPOSTAS BARORREFLEXAS EM RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS TRATADOS COM INJEÇÕES CRÔNICAS DE ATZ	77
4.5.1. <i>Efeitos do tratamento crônico de ATZ sc nas respostas barorreflexas em ratos normotensos e SHR.....</i>	77
4.5.2. <i>Efeitos do tratamento crônico de ATZ sc nas respostas barorreflexas em ratos normotensos e com hipertensão 2R1C</i>	79
4.6. EFEITOS DA INJEÇÃO AGUDA DE ATZ SC SOBRE AS RESPOSTAS PRESSORAS DA NORADRENALINA E ANGIOTENSINA II INJETADA INTRAVENOSAMENTE E SOBRE O BLOQUEIO GANGLIONAR EM RATOS NORMOTENSOS E COM HIPERTENSÃO 2R1C	81
4.7. EFEITOS DO TRATAMENTO COM INJEÇÃO CRÔNICA DE ATZ SC NA INGESTÃO DE ÁGUA E ALIMENTO E PESO CORPORAL DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS	86
4.7.1. <i>Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na ingestão de água, de alimento e peso corporal em ratos normotensos.....</i>	86
4.7.2. <i>Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ no volume urinário e excreção de Na⁺ e K⁺ em ratos normotensos.....</i>	88
4.7.3. <i>Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na ingestão de água, de alimento e peso corporal em ratos SHR.....</i>	90

4.7.4. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ no volume urinário e excreção de Na^+ e K^+ em ratos SHR.....	92
4.7.5. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na ingestão de água, de alimento e peso corporal em ratos com hipertensão 2R1C	94
4.7.6. Efeito do tratamento crônico com injeções sc de ATZ no volume urinário e excreção de Na^+ e K^+ em ratos com hipertensão 2R1C.....	96
5. DISCUSSÃO	98
6. CONCLUSÃO.....	111
7. REFERÊNCIAS	112

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertensão arterial e modelos utilizados na pesquisa

A hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica multifatorial caracterizada pela elevação crônica e sustentada dos níveis de pressão arterial (PA). Em um indivíduo adulto, a PA é considerada normal nos valores de 120 mmHg de pressão sistólica e 80 mmHg de pressão diastólica. Entretanto, quando a pressão sistólica encontra-se igual ou acima de 140 mmHg e/ou a pressão diastólica está igual ou acima de 90 mmHg a PA é considerada elevada. De maneira geral, a HA é uma doença silenciosa e assintomática, porém, em alguns casos ela apresenta sintomas como dor de cabeça, falta de ar, tontura, dor torácica, entre outros. Os últimos dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostraram que as complicações geradas pela hipertensão acarretam 9,4 milhões de morte por ano em todo o mundo (<http://www.who.int/features/qa/82/en/>). Dados descritos na 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial indicam que no Brasil a hipertensão atinge mais de 32% dos adultos e cerca de 60% dos idosos (BRASILEIRA; CARDIOLOGIA, 2016) tornando essa patologia um problema de saúde pública para o país. A hipertensão predispõe a população para outras doenças de risco como infarto, doenças coronarianas, acidentes vasculares cerebrais, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, cegueira, comprometimento cognitivo entre outras. Fatores como idade, genética, dieta (principalmente as ricas em lipídeos, açúcares e sal), obesidade, sedentarismo, ingestão de álcool, uso de tabaco, exposições persistentes ao estresse e desordens fisiológicas do organismo aumentam a predisposição a esta patologia. Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil, o tratamento com hipertensão é extremamente dispendioso. Entretanto, dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia sugerem que estes gastos poderiam ser menores se o tratamento para esta patologia fosse realizado de forma mais correta e caso os diagnósticos fossem mais precisos (<http://www.cardiol.br/>). Por isso, os estudos sobre HA são necessários, uma vez que muitos mecanismos pelos quais esta doença se desenvolve e/ou se sustentam ainda não foram totalmente elucidados. A melhor compreensão de tais mecanismos pode ser útil no desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes e menos dispendiosos.

A HA pode ser classificada como hipertensão primária/essencial ou secundária. A hipertensão primária é caracterizada quando não se conhece as causas (p. ex. hipertensão neurogênica). Este tipo de hipertensão ocorre em torno de 95% dos casos diagnosticados. Já a hipertensão secundária caracteriza-se quando se conhece as causas, como por exemplo, o estreitamento das artérias renais (p. ex. hipertensão renovascular), doença renal

parenquimatosa, hiperaldosteronismo (hipertensão mineralcorticóide), coarctação da aorta, hipertensão gestacional, etc. Este tipo de hipertensão ocorre em torno de 5% dos casos diagnosticados (LUIZ; DA SILVA, 2006; SALGADO et al., 2001).

A hipertensão neurogênica ocorre por desordens no sistema nervoso central (SNC) que resulta em aumento de atividade do sistema nervoso simpático. O modelo genético de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é amplamente estudado na pesquisa experimental por apresentar grandes similaridade com a hipertensão essencial em humanos. Já o modelo de hipertensão induzido por uma estenose parcial da artéria renal pela utilização de um clipe de prata colocado ao redor desta artéria, conhecido como modelo 2 Rins-1 Clipe (2R1C), desenvolvido por Goldblatt em 1934, é considerado um modelo de hipertensão secundário (GOLDBLATT et al., 1934; OKAMOTO; AOKI, 1963).

Os SHRs foram desenvolvidos por Okamoto e Aoki em 1963, e representam um dos modelos de hipertensão mais estudados na pesquisa. A HA destes animais inicia-se a partir da 5^a semana de vida atingindo seu pico após a 20^a semana de vida destes animais. A HA do SHR está associada a um aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático que acarreta num aumento da resistência periférica total e da frequência cardíaca (FC), sustentando a hipertensão nestes animais. Neste modelo ocorre também à exacerbação do sistema renina-angiotensina (SRA), resultando numa maior produção de angiotensina II (ANG II) que produz uma intensa vasoconstrição periférica e, centralmente, causa aumento da atividade simpática (MOREIRA et al., 2009).

O modelo de hipertensão 2RIC foi desenvolvido por Goldblatt em 1934. A hipertensão é gerada pela estenose parcial da artéria renal esquerda levando a uma diminuição da pressão de perfusão do rim esquerdo, permanecendo o rim contralateral intacto. Com isso, ocorre um aumento na síntese e liberação de renina pelo rim clipado. Esta renina é liberada na corrente sanguínea e irá clivar enzimaticamente o angiotensinogênio circulante, formando assim a angiotensina I (ANG I). A ANG I é convertida em ANG II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Uma vez formada, a ANG II circulante pode agir diretamente nos vasos, aumentando a resistência periférica total culminando no aumento da PA. Além disso, a ANG II age em diversos sistemas do organismo levando a uma retenção de sódio, expansão do volume circulante, aumento na produção de aldosterona além das respostas de longo prazo, como a ativação do tônus do sistema nervoso simpático, o qual é um importante mecanismo para a manutenção da HA observada nesse modelo de hipertensão (BRAAM; NAVAR; MITCHELL, 1995; LERMAN et al., 2005; NAVAR et al., 1998; PLOTH, 1983). Com isso a

hipertensão renovascular caracteriza-se como “renina-dependente”, sendo muito estudada, uma vez que cerca de 2% dos indivíduos hipertensos no Brasil apresentam algum tipo de isquemia renovascular, causada principalmente por aterosclerose e displasia fibromuscular (NERY; RESUMO, 2002).

1.2. Angiotensina II na regulação cardiovascular

A formação da ANG II é promovida por meio de estímulos tais como a diminuição da pressão de perfusão renal, a redução da concentração do íon sódio nas células da mácula densa no aparelho justaglomerular dos rins, ou a estimulação dos receptores β_1 adrenérgicos renais, os quais provocam a liberação de renina que, conseqüentemente, leva a síntese de ANG II como descrito no item anterior (COWLEY; GUYTON, 1972; HACKENTHAL et al., 1990; HODGE; LOWE; VANE, 1966). A partir da sua formação, a ANG II atua em uma variedade de tecidos como a glândula adrenal estimulando a síntese e a liberação de aldosterona que aumenta a reabsorção de sódio; nos leitos vasculares levando a uma vasoconstrição e aumentando a resistência periférica; no coração levando ao aumento da força de contração; nos rins reduzindo o fluxo sanguíneo renal e aumentando a reabsorção de sódio; no SNC estimulando a sede, o apetite ao sódio, a liberação de vasopressina e aumentando a atividade nervosa simpática; e interagindo com fatores de crescimento favorecendo a proliferação celular (BLAIR-WEST et al., 1998; FITZSIMONS, 1998; LIANG; GAVRAS, 1978; NAVAR et al., 1998; SANTOS RAS & SAMPAIO WO, 2002). Estes efeitos citados acima são devidos a ações da ANG II ativando, predominantemente, seu receptor angiotensinérgico do tipo 1 (AT1), que são receptores acoplados à proteína Gq, responsável por estimular a atividade da fosfolipase C, determinando a hidrólise dos polifosfatos de fosfatidilinositol da membrana plasmática para formar polifosfatos de inositol. O principal isômero do fosfato de inositol, (1, 4, 5) trifosfato de inositol – IP3 promove a liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares, através da ligação a um receptor da membrana do retículo endoplasmático. O segundo produto da ação da fosfolipase, diacilglicerol (DAG), ativa a proteína-quinase C (em conjugação com o cálcio/calmodulina), que controla várias funções celulares através da fosforilação de diversas proteínas, culminando na abertura de canais iônicos que levará a uma despolarização celular (PHILLIPS; SUMNERS, 1998; ZHU et al., 1999).

Mais recentemente, foi descrito que os componentes do sistema renina angiotensina (SRA), incluindo precursores e enzimas necessárias para a produção de ANG II,

foram identificados no SNC, sugerindo a participação da ANG II como neuromodulador e/ou neurotransmissor (DE KLOET et al., 2015; GROBE; XU; SIGMUND, 2008; WRIGHT; HARDING, 2013). Estudos mostraram que astrócitos secretam angiotensinogênio no espaço intersticial e no líquido extracelular (DESCHEPPER; BOUHNİK; GANONG, 1986; STORNETTA et al., 1988) e que os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) são capazes de produzir angiotensinogênio (ARONSSON et al., 1988). Além disso, estudos demonstraram que a renina (GANTEN et al., 1971, 1983) e a ECA (CORREA; PLUNKETT; SAAVEDRA, 1986; DZAU et al., 1986; SAAVEDRA; FERNANDEZ-PARDAL; CHEVILLARD, 1982) também são produzidas no SNC. Os receptores AT1 estão localizados de forma difusa pelo encéfalo, mas apresentam-se predominantemente em neurônios e nas células da glia dos órgãos circunventriculares (OCVs). Os OCVs ativados diretamente pela ANG II central são o órgão subfornical (OSF), o órgão vasculoso da lâmina terminal, (OVLТ) e núcleo preóptico mediano (MnPO). Destas regiões, sinais facilitatórios podem chegar ao PVN e à região rostroventrolateral do bulbo (RVL) para aumentar a atividade simpática e ao PVN e núcleo supraóptico do hipotálamo (NSO) para aumentar a secreção de vasopressina (HOFFMAN et al., 1977; JOHNSON, 1985; JOHNSON; HOFFMAN; BUGGY, 1978; MAHON et al., 1995) o que culminará em aumento da PA, por exemplo. Além disso, áreas hipotalâmicas enviam projeções para áreas caudais como núcleo parabraquial (NPB) e o núcleo do trato solitário (NTS) (PHILLIPS; SUMNERS, 1998). O NTS é a primeira estação sináptica para onde convergem sinais de aferentes viscerais como, por exemplo, sinais dos barorreceptores arteriais (PALKOVITS; ZÁBORSZKY, 1977; TORVIK, 1956). Além disso, já foi demonstrado que a ANG II agindo em receptores AT1 no NTS promove uma atenuação na função do barorreflexo, um importante mecanismo para regulação momento a momento da PA (MATSUMURA; AVERILL; FERRARIO, 1998; MICHELINI; BONAGAMBA, 1990; PATON; KASPAROV, 1999).

1.3. Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecidas por suas propriedades microbicidas, compreendem espécies químicas endogenamente produzidas pelo organismo como os radicais livres sendo eles o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (HO^{\bullet}) além das espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (RHEE et al., 2003; WEINBERG, 1990). A formação das EROs inicia-se pela ativação da enzima NADPH oxidase que leva a formação de $O_2^{\bullet-}$ [revisado em (COHEN, 1994)] pela redução incompleta

do oxigênio molecular produzindo o $O_2^{\bullet-}$, o qual é dismutado enzimaticamente pela enzima superóxido dismutase (SOD) em H_2O_2 . O H_2O_2 é então degradado pela enzima catalase em água (H_2O) e oxigênio (O_2) ou então, quando o H_2O_2 entra em contato com íons ferroso, ele é convertido em HO^{\bullet} (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). A NADPH oxidase é um complexo enzimático formado por subunidade de membrana gp91phox e p22phox, pelas subunidades citoplasmáticas p^{47phox}, p^{40phox} e p^{67phox} e pelas proteínas G Rac e Rap1a (LASSÈGUE; CLEMPUS, 2003). Dentre essas subunidades podemos destacar o sítio catalítico, chamado de gp^{91phox}, o qual possui sete diferentes isoformas (NOX1-NOX5 e DUOX1/DUOX2) [revisão em (ÁLVAREZ et al., 2013)]. As isoformas NOX2 e NOX4 estão amplamente expressas no SNC e por isso são as mais estudadas.

A alta capacidade oxidante das EROs atribui-lhes propriedades destrutivas para as células sendo frequentemente associadas à morte celular e ao processo de apoptose (IRANI, 2000; JIANG et al., 2003). Apesar de seu potencial citotóxico quando em altas concentrações, vários estudos têm demonstrado que tais espécies, quando em baixas concentrações, podem participar na sinalização intra e intercelular, agindo conjuntamente com mediadores químicos clássicos como a ANG II, noradrenalina, dopamina e glutamato (RICE, 2011; ZIMMERMAN; DAVISSON, 2004).

1.4. Interação entre ANG II e EROs

Há vários estudos relacionando o envolvimento das EROs como sinalizador de mecanismos ativados pela ANG II central quando ela atua em receptores AT1. Evidências têm demonstrado que EROs podem ser formadas em resposta à ativação de receptores de membrana acoplados à proteína Gq (GROEMPING et al., 2003; LALOI; APEL; DANON, 2004; RHEE et al., 2003; SUN et al., 2005). A geração de EROs pela ativação de receptores AT1 é um exemplo de vias de sinalização que envolvem a ativação do complexo enzimático NADPH oxidase gerador de $O_2^{\bullet-}$ (LASSÈGUE; CLEMPUS, 2003) na parede vascular e possivelmente na mediação dos efeitos centrais da ANG II (SUN et al., 2005; WANG et al., 2002; ZHU et al., 2004; ZIMMERMAN et al., 2002; ZIMMERMAN; DAVISSON, 2004).

O silenciamento da NOX2 e/ou da NOX4 no OSF reduz a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II intracerebroventricularmente (icv) (PETERSON et al., 2009). Além disso, no SNC, foi descrito que as ações dipsogênicas e cardiovasculares da ANG II em camundongos são dependentes do aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ por neurônios dos OCVs (Zimmerman and Davisson, 2004; Zimmerman et al., 2002). Pelo mecanismo proposto, a

ativação de receptores AT1, pela ANG II, ativa uma cascata bioquímica intracelular que leva à ativação do complexo enzimático NADPH oxidase (Zimmerman and Davisson, 2004; Zimmerman et al., 2002). Uma vez ativada, esta enzima catalisa a transferência de dois elétrons da molécula de NADPH₂ para duas moléculas de oxigênio formando, dessa maneira, dois radicais O₂^{•-}. O radical O₂^{•-} foi identificado como um EROs pivô nos efeitos centrais da ANG II utilizando um modelo de animal transfectado por partículas virais (adenovírus) carregando genes que codificam a enzima SOD, uma enzima responsável pela dismutação do O₂^{•-} em H₂O₂ e oxigênio. Por meio de injeções icv em camundongos, os vírus alcançam neurônios dos órgãos circunventriculares que passam a superexpressar a SOD diminuindo a disponibilidade do O₂^{•-} formado quando o sistema NADPH oxidase é ativado pela ANG II (Zimmerman and Davisson, 2004; Zimmerman et al., 2002). A redução substancial tanto na resposta dipsogênica quanto nas respostas cardiovasculares sugere fortemente que a geração de EROs dependente de ANG II é um evento importante para os efeitos biológicos da ANG II centralmente (Zimmerman and Davisson, 2004; Zimmerman et al., 2002). Contudo, os autores que utilizaram esta técnica não levaram em consideração que embora o aumento na atividade SOD diminua a disponibilidade de O₂^{•-}, também pode aumentar a disponibilidade de H₂O₂ quando o complexo NADPH oxidase é acionado pela ANG II. Logo, os efeitos observados quando do aumento da atividade da SOD podem ser oriundos não apenas da redução da disponibilidade de O₂^{•-}, mas também do aumento da disponibilidade de H₂O₂.

Após essa observação, nosso laboratório iniciou seus estudos que demonstraram que a resposta dipsogênica induzida pela injeção central de ANG II era fortemente reduzida pela injeção icv prévia de H₂O₂ ou pelo acúmulo centralmente de H₂O₂ formado endogenamente após a inibição da enzima catalase com injeção icv de 3-amino-1,2,4-triazol (ATZ) em ratos normotensos (GIGLIOTI et al., 2006). Em um segundo momento, demonstramos que a injeção icv de H₂O₂ ou de ATZ ou mesmo a injeção intravenosa (iv) de uma dose adequada de ATZ reduziu a resposta pressora induzida pela injeção icv de ANG II de ratos normotensos (Figura 1) (LAUAR et al., 2010). Após se verificar as respostas do H₂O₂ sobre a resposta pressora da ANG II em ratos normotensos, investigou-se o que ocorreria na PA e na resposta pressora a ANG II central de ratos hipertensos. Para isso, foram utilizados os dois modelos de hipertensão descritos acima: os SHR e ratos com hipertensão 2R1C. Com isso, demonstrou-se que em SHR ou em ratos com hipertensão 2R1C, a injeção icv de H₂O₂ ou de ATZ também reduziu a resposta pressora da ANG II icv, enquanto a combinação de ambos aboliu a resposta pressora da ANG II e reduziu

a pressão arterial basal dos SHR (Figuras 2 e 3) (LAUAR et al., 2011). Em ratos com hipertensão 2R1C a injeção de ATZ iv sozinho também foi capaz de reduzir a pressão arterial basal (Figura 3) (LAUAR et al., 2012). Estes resultados de nosso laboratório sugerem fortemente que o aumento nos níveis de H_2O_2 de origem endógena ou exógena centralmente prejudica mecanismos pressores e dipsogênicos ativados pela ANG II central.

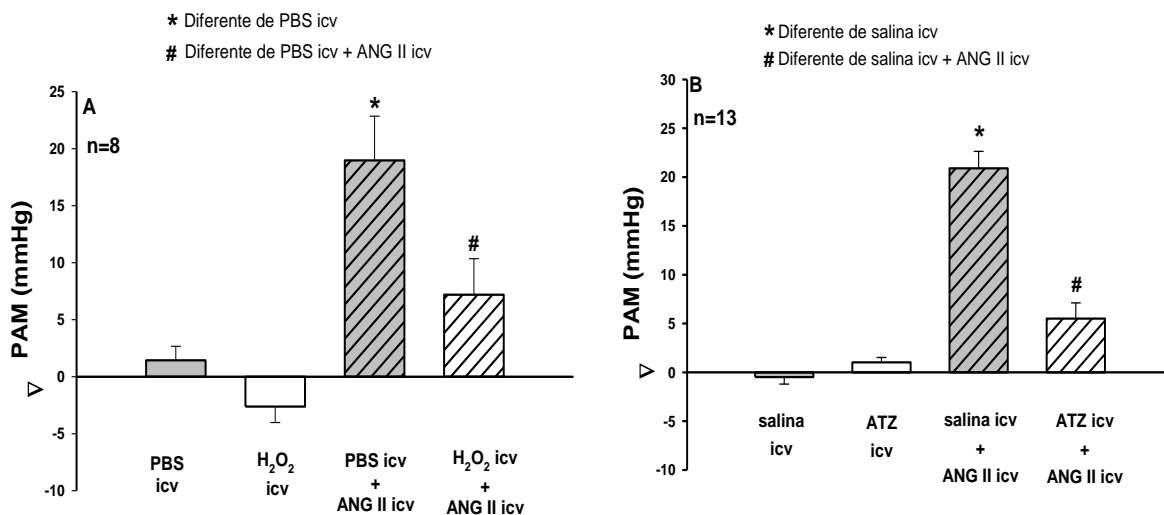


Figura 1: Mudanças na PAM induzida (A) pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 μ l) combinada com injeções icv de PBS ou H_2O_2 (5 μ mol/1 μ l) e pela (B) injeção icv de ANG II (50 ng/1 μ l) combinada com injeções icv de salina ou ATZ (5 nmol/1 μ l) em ratos normotensos. Os resultados são representados pela média \pm EPM, n= número de animais. (Laur et al., 2010).

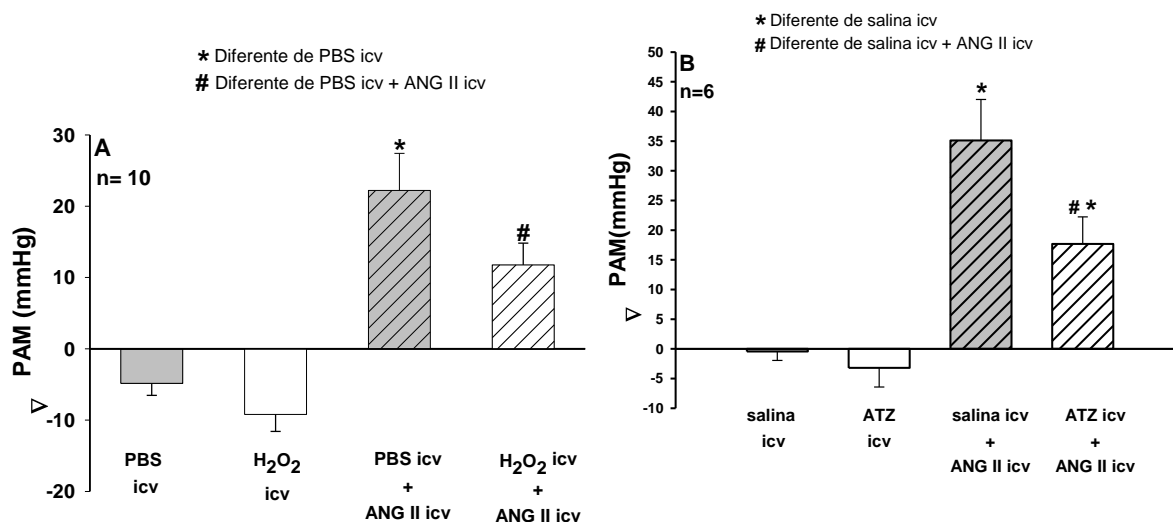


Figura 2: Mudanças na PAM induzida (A) pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 μ l) combinada com injeções icv de PBS ou H_2O_2 (5 μ mol/1 μ l) e pela (B) injeção icv de ANG II (50 ng/1 μ l) combinada com injeções icv de salina ou ATZ (5 nmol/1 μ l) em ratos SHR. Os resultados são representados pela média \pm EPM, n= número de animais. (Laur et al., 2011).

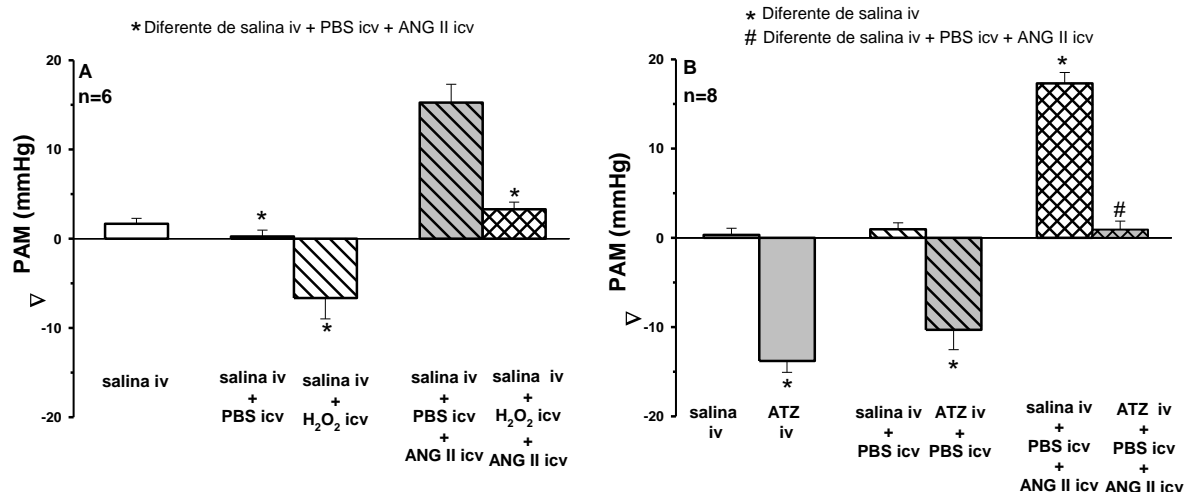


Figura 3: Mudanças na PAM induzida (A) pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) combinada com injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 µmol/1 µl) e pela (B) injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) icv combinada com injeções iv de salina ou ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) em ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados são representados pela média ± EPM, n= número de animais. (Lauar et al., 2012).

Nos ratos com hipertensão 2R1C ou SHR nos quais se testou os efeitos do tratamento com H₂O₂ ou ATZ ocorre aumento da atividade simpática e do sistema renina-angiotensina e alterações nos mecanismos centrais de controle cardiovascular (BRODY; O'NEILL; PORTER, 1984; GOLDBLATT, 1938, 1958; HAEUSLER; FINCH; THOENEN, 1972; JUDY et al., 1976; MARTINEZ-MALDONADO, 1991; MOREIRA et al., 2009; MORI, 1973; NAVAR et al., 1998; OLIVEIRA-SALES et al., 2014). Na hipertensão 2R1C, produzida pela oclusão parcial de uma das artérias renais por um clipe de prata, ocorre um aumento imediato dos níveis de renina circulante (GOLDBLATT, 1938, 1958). Após período de 5-6 semanas, quando a hipertensão já esta estabelecida tem-se o aumento da atividade simpática e concomitante prejuízo da função no barorreflexo (DIBONA, 2000; FERRARIO; STRAWN, 2006; GOLDBLATT, 1938, 1958; MARTINEZ-MALDONADO, 1991; NAVAR et al., 1998; VEERASINGHAM; RAIZADA, 2003). Além de seus efeitos vasoconstritores diretos, a ANG II atuando centralmente aumenta atividade nervosa simpática (ANS) e a secreção de vasopressina (DIBONA, 2000, 2001; FERRARIO; STRAWN, 2006). A ativação dos receptores AT1 promove uma série de eventos intracelulares culminando na sinalização celular que envolve a participação das EROs, especialmente do O₂^{•-}, via ativação da NADPH oxidase que são importantes para a ativação de mecanismos pressores (CAMPESE et al., 2007; CAMPESE; SHAOHUA; HUIQUIN, 2005; CAMPOS et al., 2008; PETERSON et al., 2009; PETERSON; SHARMA; DAVISSON, 2006; ZIMMERMAN et al., 2002). Por outro lado, o H₂O₂ que também pode resultar da ativação da NADPH e da dismutação de O₂^{•-}

parece ter um efeito oposto limitando ou reduzindo a ativação de mecanismos pressores pela ANG II (LAUAR et al., 2010). A Figura 4 é uma proposta para se explicar as possíveis ações opostas das diferentes EROs que poderiam resultar da ativação dos receptores AT1 pela ANG II e o que poderia ser uma razão para a redução da pressão arterial verificada nos SHR ou em ratos com hipertensão 2R1C tratados com H_2O_2 ou ATZ.

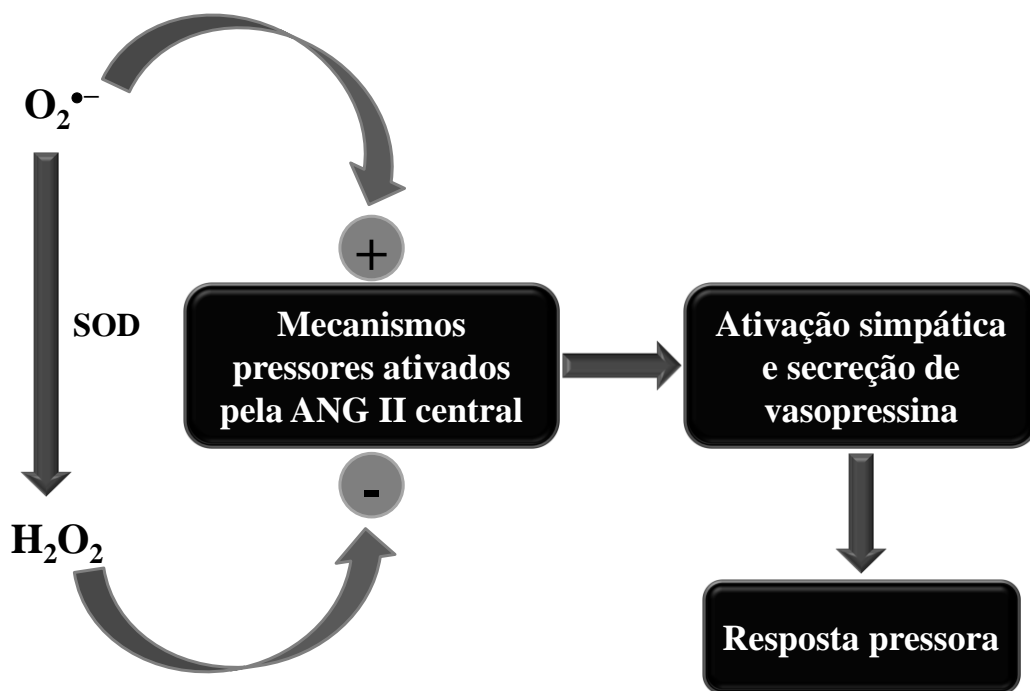


Figura 4: Proposta de modelo de ação das EROs no controle da resposta pressora da ANG II [baseado em (LAUAR et al., 2010; ZIMMERMAN et al., 2002)].

O H_2O_2 atuando centralmente também pode afetar a excitabilidade neural por meio de diferentes mecanismos que incluem mudanças na neurotransmissão ou ativação de canais de íons. O H_2O_2 pode bloquear a captação de glutamato pelas células da glia, que pode resultar em um aumento extracelular dos níveis de glutamato o que aumentaria a excitabilidade neural (SORG et al., 1997; VOLTERRA et al., 1994). Por outro lado, H_2O_2 pode também reduzir a excitabilidade neural como consequência da inibição da liberação de glutamato ou aumento da liberação de GABA ou ativação de canais de K^+_{ATP} (AVSHALUMOV et al., 2005; BAO; AVSHALUMOV; RICE, 2005; MELO et al., 2015; SAH et al., 2002; TAKAHASHI; MIKAMI; YANG, 2007; ZOCCARATO et al., 1999; ZOCCARATO; VALENTE; ALEXANDRE, 1995).

No modelo de hipertensão 2R1C, onde há maior atividade do SRA, foi demonstrado que em áreas pré-motoras simpáticas, como o PVN e o RVL, há maior expressão de receptores AT1 e também maior produção de EROs (DE OLIVEIRA-SALES et al., 2010; OLIVEIRA-SALES et al., 2009). Esses mesmos autores demonstraram também que a administração de antioxidante, ou do mimético da SOD (tempol) no RVL dos animais 2R1C é capaz de reduzir a pressão arterial e a atividade simpática do nervo renal (ANSr) nesses animais (CAMPOS et al., 2011; OLIVEIRA-SALES et al., 2008). De maneira semelhante, foi demonstrado que a atividade da NADPH oxidase no NTS de animais SHR predispostos a derrame cerebral está aumentada, enquanto que a expressão e a atividade da SOD estão diminuídas, favorecendo o aumento da produção do $O_2^{\bullet-}$ (NOZOE et al., 2007). Além disso, também foi demonstrado que a inibição da NADPH oxidase causa redução da PA e da FC nesses SHR (NOZOE et al., 2007). Outros trabalhos mostraram que a superexpressão da enzima SOD centralmente reduz o aumento da PA induzido pela infusão subcutânea (sc) crônica de ANG II (ZIMMERMAN et al., 2002). Todos esses trabalhos sugerem que o aumento da disponibilidade do $O_2^{\bullet-}$ produzido no SNC participa da manutenção da hipertensão, em diferentes modelos experimentais.

1.5. Envolvimento entre neuroinflamação, EROs e simpatoexcitação

Estudos recentes também sugerem um papel importante dos processos inflamatórios na gênese da hipertensão, com aumento de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas e outros marcadores inflamatórios como fator de necrose tumoral (TNF- α) e proteína C reativa à medida que a hipertensão progride (SHI et al., 2010; SHI; RAIZADA; SUMNERS, 2010; SRIRAMULA; CARDINALE; FRANCIS, 2013). A NADPH oxidase está presente tanto em neurônios, quanto em células da glia como micróglias e astrócitos (BALI; JAGGI, 2016; HASLUND-VINDING et al., 2016; VILHARDT et al., 2016), importantes fontes de citocinas pró-inflamatórias no SNC, como interleucina 1β (IL- 1β) e TNF- α (PETTIT et al., 2013). O aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo parece ser importante para o desenvolvimento da hipertensão dependente de ANG II (BRANDS et al., 2010; SHI; RAIZADA; SUMNERS, 2010; SRIRAMULA; CARDINALE; FRANCIS, 2013; WAKI et al., 2008). Estas citocinas poderiam modular a atividade neuronal via produção das EROs, uma vez que as citocinas ativam a NADPH oxidase neuronal e microglial liberando EROs capazes de agir de forma parácrina o que modularia a atividade neuronal (SHI; RAIZADA; SUMNERS, 2010). Recentemente também foi demonstrado que ativação da

microglia acarreta no aumento de citocinas pró-inflamatórias e diminuição de interleucina IL-10 (IL-10), uma interleucina anti-inflamatória, na região do PVN em animais com hipertensão induzida por ANG II infundida sc, sendo essas respostas bloqueadas pelo tratamento com minociclina, um antibiótico inibidor da ativação da microglia (SHI; RAIZADA; SUMNERS, 2010). Além disso, a superexpressão de IL-10 em neurônios do PVN foi capaz de inibir a hipertensão causada pela ANG II sc demonstrando-se, assim uma importante participação destes mecanismos na hipertensão dependente de ANG II (SHI; RAIZADA; SUMNERS, 2010). Outros estudos mostraram que na hipertensão induzida pela ANG II também ocorre a formação do TNF- α no PVN de ratos e a administração de um bloqueador de TNF- α (etanercepte) centralmente diminuiu a hipertensão e reduziu a atividade da NADPH oxidase como sugere a redução da expressão de RNAm para as isoformas NOX 2 e NOX 4 no PVN (SRIRAMULA; CARDINALE; FRANCIS, 2013).

O PVN, uma área hipotalâmica localizada bilateralmente ao terceiro ventrículo, é particularmente importante para os estudos da hipertensão por causa de seu potencial de causar hipertensão (BERGAMASCHI et al., 1995; GUYENET, 2006; MENANI et al., 2014). O PVN é composto por neurônios magnocelulares e parvocelulares (SWANSON; KUYPERS, 1980a, 1980b). Os neurônios magnocelulares projetam-se para a hipófise posterior e são responsáveis pela secreção de vasopressina e ocitocina, enquanto os neurônios parvocelulares se projetam para outras áreas do SNC, incluindo regiões importantes para o controle autonômico da pressão arterial como a região RVL e a coluna intermédio lateral da medula (CIL) (SWANSON; KUYPERS, 1980a, 1980b). Assim, o PVN, além das importantes conexões com áreas hipotalâmicas, pode influenciar diretamente a atividade simpática por meio de suas conexões com a CIL ou indiretamente através de suas projeções para a região RVL que também possui projeções para a CIL (BADOER, 2001).

Os efeitos de citocinas pró-inflamatórias no controle das funções autonômica e cardiovascular também foram evidenciados em estudo no qual se demonstrou que a injeção de TNF- α ou IL-1 β no OSF de ratos aumenta a PA e a ANSr, além de aumentar a expressão de RNAm para citocinas pró-inflamatórias e do SRA tanto no OSF quanto em áreas hipotalâmicas como o PVN (WEI et al., 2015). Além disso, a injeção bilateral de tempol no PVN de ratos com hipertensão induzida por ANG II reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a marcação para O₂^{•-} que culmina na diminuição da ANSr e na atenuação do desenvolvimento da hipertensão (SU et al., 2014). Em conjunto, estes trabalhos demonstram uma importante correlação entre o controle da PA por áreas hipotalâmicas bem

como mecanismos que envolvem ANG II, citocinas pró-inflamatórias, aumento da atividade da NADPH oxidase e da disponibilidade de $O_2^{\bullet-}$ e simpatoexcitação. Contudo, ainda não foi investigada a correlação entre estes mecanismos que originam e sustentam a hipertensão e o aumento da disponibilidade de H_2O_2 pela inibição da catalase.

Assim, considerando-se: 1) que o radical $O_2^{\bullet-}$ seria parte dos mecanismos ativados pela ANG II centralmente para produzir respostas pressoras, enquanto que o H_2O_2 teria uma ação contrária como proposto na Figura 4; 2) as evidências da importância das EROs no PVN para a hipertensão 2R1C (DE OLIVEIRA-SALES et al., 2010; OLIVEIRA-SALES et al., 2009); 3) que a injeção iv de ATZ agudamente reduziu a pressão arterial de ratos hipertensos (LAUAR et al., 2011; LAUAR et al., 2012), uma questão é qual seria o efeito do tratamento crônico com injeções sc de ATZ sobre a pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos. Com as evidências de uma possível participação das citocinas pró-inflamatórias e da micróglia na hipertensão (SHI; RAIZADA; SUMNERS, 2010; SRIRAMULA; CARDINALE; FRANCIS, 2013) pode-se questionar também qual seria o efeito do tratamento crônico com ATZ sc sobre a expressão de RNAm de citocinas pró-inflamatórias, componentes do SRA, do estresse oxidativo e sobre o gene CD11 que indica a ativação da micróglia no hipotálamo dos animais normotensos e hipertensos. Além disso, quais seriam as alterações produzidas pelo tratamento crônico com ATZ sc sobre as modificações do barorreflexo, da modulação e da atividade simpática em animais hipertensos. Por fim, considerando-se a importância do radical $O_2^{\bullet-}$ também para as respostas dipsogênicas da ANG II e os efeitos antidipsogênicos do H_2O_2 atuando centralmente (ZIMMERMAN et al., 2002; GIGLIOTI et al., 2006), seria importante também se estudar se ocorreria alguma alteração na ingestão diária de água, alimento, peso corporal e na excreção renal nos ratos normotensos ou hipertensos tratados cronicamente com ATZ sc, uma vez que modificações do equilíbrio hidroeletrolítico também podem afetar a pressão arterial (BLANCH et al., 2013; MCKINLEY et al., 2001a, 2001b; MENANI et al., 1990). Os testes de ingestão e excreção diárias e o acompanhamento de peso também são importantes para se verificar a tolerância dos animais tratados com as doses das drogas utilizadas. Efeitos agudos também foram testados para se verificar a evolução temporal da PAM e FC e as mudanças da atividade simpática renal e esplâncnica imediatamente após a injeção sc de ATZ ou se injeção sc de ATZ afetaria as respostas pressoras da noradrenalina ou ANG II injetadas iv, bem como a atividade do sistema nervoso simpático avaliada por meio do bloqueio ganglionar.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi investigar se e por quais mecanismos a inibição da catalase sistêmica poderia influenciar na hipertensão arterial em modelos animais.

Para isso investigamos se:

- 1) a administração sc aguda ou crônica de ATZ modificaria a pressão arterial basal de animais normotensos, SHR ou com hipertensão 2R1C;
- 2) o tratamento crônico com ATZ sc alteraria os níveis de citocinas inflamatórias, de componentes do SRA e da ativação da micróglia no hipotálamo de animais hipertensos;
- 3) o tratamento crônico com ATZ sc alteraria as respostas barorreflexas, a modulação da atividade simpática e parassimpática e a ingestão diária de água e ração, peso corporal e a excreção renal e suas correlações com alterações da pressão arterial em ratos hipertensos.
- 4) a injeção aguda sc de ATZ modificaria a atividade simpática renal e esplâncnica em animais com hipertensão 2R1C;
- 5) a injeção aguda sc de ATZ afetaria as respostas pressoras da noradrenalina e ANG II injetadas iv, bem como a atividade do sistema nervoso simpático avaliada por meio do bloqueio ganglionar em animais normotensos ou com hipertensão 2R1C.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman normotensos com peso entre 150 a 300 g e ratos SHRs com peso entre 280 a 300 g provenientes do Biotério do Campus de Araraquara da UNESP. Os animais foram mantidos em caixas coletivas ou individuais, com livre acesso a ração peletizada (Bio Base, Águas Frias, Brasil) e bebedouro contendo água e permaneceram em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de doze horas (luzes acesas às 7 h). Os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

3.2. Cirurgia para desenvolvimento da hipertensão 2 rins, 1 clipe

Os ratos Holtzman normotensos com peso entre 150 a 180 g foram utilizados para o desenvolvimento do modelo de hipertensão renovascular proposto por Goldblatt – 2 Rins, 1 Clipe (2R-1C) (GOLDBLATT et al., 1934). Estes animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg de peso corporal; Cristália, Itapira, Brasil) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal; Agener União, Embu-Guaçu, Brasil). Foi realizada então a laparotomia para exposição da artéria renal esquerda que foi cuidadosamente isolada para a colocação de um clipe de prata de 0,2 mm de abertura que permitiu a oclusão parcial do fluxo da artéria renal. A incisão foi suturada e os animais receberam tratamento com antibiótico (benzilpenicilina – 80.000 UIs e estreptomicina – 33 mg; Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, Brasil, 0,1 ml/rato, intramuscular) e analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%; Ketoflex, Mundo Animal, São Paulo, Brasil, 0,03 ml/rato subcutaneamente). Ratos submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém, sem oclusão parcial da artéria renal (cirurgia fictícia) foram considerados como animais controles ou ratos normotensos.

3.3. Registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)

Outra série de experimentos foi realizada para registro de PAM e FC. Animais normotensos, com hipertensão 2R1C e SHR foram transferidos das caixas coletivas para caixas individuais. Um dia antes de se iniciarem os registros basais, registros agudos e os registros diários sob os tratamentos com salina ou ATZ sc, os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal; Cristália, Itapira, Brasil) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal; Agener União, Embu-Guaçu, Brasil) para a canulação da artéria femoral com tubos de polietileno (PE-10 conectados a

PE-50) preenchidos com solução de heparina à 20% para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Os animais que receberam injeção intravenosa (iv), a veia femoral também foi canulada com tubos de polietileno preenchidos com solução heparinizada. Para os experimentos agudos, as cânulas foram exteriorizadas pelo dorso na região próxima a escápula, e suturadas na pele do animal. Para os experimentos crônicos, as cânulas também foram exteriorizadas pelo dorso na região próxima a escápula, e então fixadas a um conector feito com uma tela plástica onde foi introduzido um pedaço de agulha de 23g e fixada nesta tela com acrílico cirúrgico. Este conector foi então fixado na pele do dorso do animal, mantendo assim a cânula mais firme e possibilitando o registro da pressão arterial por mais dias comparado a canulação simples. Tanto para os registros agudos quanto crônicos, nos dias dos registros, as cânulas arteriais foram conectadas a um transdutor de pressão (Statham Gould, Cleveland, OH, USA) acoplado a um amplificador (ETH-200 CB Sciences Inc, Dover, NH, USA) e a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments, Sydney, AUS). Os registros crônicos se seguiram por nove dias sendo dois dias de registro dos parâmetros basais e sete dias de registro com os tratamentos diários com ATZ ou salina sc.

3.4. Fármacos utilizados

3-amino-1,2,4-triazol (ATZ) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) inibidor da catalase, dissolvido em salina isotônica estéril e administrada sc nas concentrações de 300 mg/kg ou 600 mg/kg de peso corporal;

Fenilefrina (Sigma-Aldrich) agonista adrenérgico dissolvido em salina isotônica estéril e administrada iv na concentração de 5 µg/kg de peso corporal;

Nitroprussiato de sódio (NPS) (Sigma-Aldrich) doador de óxido nítrico, dissolvido em salina isotônica estéril e administrada iv na concentração de 30 µg/kg de peso corporal;

Noradrenalina (Sigma-Aldrich) agonista adrenérgico dissolvido em salina isotônica estéril e administrada iv na concentração de 1 nmol/0,1 ml de peso corporal;

Angiotensina II (Sigma-Aldrich) foi dissolvida em salina isotônica estéril e administrada iv na concentração de 50 ng/0,1 ml;

Hexametônio (Sigma-Aldrich) bloqueador ganglionar dissolvido em salina isotônica estéril e administrada iv na concentração de 30 mg/kg de peso corporal;

Salina isotônica estéril (0,15 M)

3.5. Teste das respostas barorreflexas

Para a avaliação do barorreflexo, os animais normotensos, com hipertensão 2R1C e SHR ao final do protocolo realizados nas gaiolas metabólicas foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e a artéria e veia femorais foram canuladas com um tubo de polietileno como descrito acima. No dia seguinte à cirurgia de canulação, a função barorreflexa foi avaliada em animais acordados. A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (Statham Gould) acoplado a um amplificador (ETH-200 CB Sciences Inc) e a um sistema computadorizado de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments) para o monitoramento contínuo da pressão arterial. Após um período basal de registro dos parâmetros cardiovasculares, os animais receberam injeções iv de fenilefrina (fenil, 5 µg/kg de peso corporal) e nitroprussiato de sódio (NPS, 30 µg/kg de peso corporal) para testar as respectivas respostas reflexas da FC ao estímulo pressor e depressor. Foram analisados as alterações de FC a cada 10 mmHg de alteração da PAM em resposta as injeções de fenil e NPS. As alterações foram analisadas a cada 10 mmHg, considerando o intervalo de 5 a 35 mmHg de resposta pressora e hipotensora. Os valores foram tabelados e realizada a regressão linear para cada animal, e a inclinação de cada regressão linear foi utilizada para calcular as diferenças entre os grupos.

3.6. Análise de variabilidade cardiovascular

Os animais normotensos, com hipertensão 2R1C e SHR tiveram seus registros de PAP, PAM e FC basais monitorados por 1 hora antes de se iniciarem os testes de barorreflexo. Este período de registro foi utilizado para a análise da variabilidade cardiovascular. A variabilidade do intervalo de pulso (IP) e da pressão arterial sistólica (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 pressão arterial pulsátil (PAS) foram convertidos em pontos de dados a cada 100 ms usando a interpolação de spline cúbica (10Hz). As séries interpoladas foram divididas em conjuntos sequenciais semi-sobrepostos em 512 pontos de dados (51,2s). 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 alta frequência (HF; 0.75–3 Hz) e os resultados foram expressos em absolutos para a PAS (mmHg²) e unidades normalizadas (un) para o IP. Os valores normalizados foram alcançados por meio do cálculo do percentual da potência de LF e HF, sendo que a potência total foi considerada excluindo a potência da banda de muito baixa frequência (VLF; <0,2 Hz), (BILLMAN, 2011; VAN DE BORNE et al., 1997). Para avaliar o balanço simpátovagal, a relação LF/HF da variabilidade do IP foi calculada (MONTANO et al., 1994). LF da PAS é um índice do tônus vasoconstritor simpático, enquanto LF e HF do IP são os índices de modulação simpática e parassimpática do IP.

3.7. Real time RT-PCR para medida da expressão gênica das citocinas inflamatórias, da expressão gênica de componentes do sistema renina angiotensina, da expressão gênica de componentes do estresse oxidativo e da expressão gênica para um marcador de micróglia (CD11)

Ao final dos experimentos crônicos, os animais normotensos, com hipertensão 2R1C e SHR foram anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg, i.p.), decapitados e os encéfalos rapidamente retirados. Para tanto, o encéfalo foi colocado em uma matriz retirado o hipotálamo que foi extraído por microdissecção. O material colhido foi transferido para um tubo livre de RNase e homogeneizado com 500 µl de solução para a extração do RNA (trizol). Em seguida, o tecido foi homogeneizado com auxílio de um micromotor e mantido a 4°C. As amostras foram posteriormente centrifugadas por 3 min a 12.000 rpm, e o RNAm foi extraído utilizando-se o RNase kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). As amostras de RNAm foram submetidas a reação de transcriptase reversa em tempo real para transformação de RNAm em cDNA (iScriptit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As sequências de cDNA obtidas a partir da reação foram usadas para quantificação através de sondas comerciais para os genes do sistema renina-angiotensina (SRA), a saber: receptor AT1, enzima conversora de angiotensina (ECA) e as citocinas, a saber: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10). As razões para a escolha desses genes a princípio é a grande relação entre maior ativação do SRA central e hipertensão (VEERASINGHAM; RAIZADA, 2003) e de citocinas inflamatórias com hipertensão (DE KLOET et al., 2013). Além disso, foram utilizadas sondas comerciais para os genes do estresse oxidativo a saber: NOX2 e NOX4, e para o marcador da ativação de micróglia o gene CD11. As reações com 45 ciclos foram realizadas em um aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A amplificação da sequência alvo

foi detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre quando existe formação de dupla fita na região codificada pelo par de iniciadores. Os dados foram expressos utilizando o método ΔCT (descrito abaixo) e normalizado pela quantidade de cDNA da proteína GAPDH (RNA constitutivo – gene repórter). Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (CT), foi encontrado o ΔCT que é a diferença do valor médio para o gene de interesse e para o RNA GAPDH (gene repórter). A seguir, foram subtraídos os valores médios encontrados para os poços controles da média dos poços tratados, obtendo-se o $\Delta\Delta CT$. Esse valor foi colocado como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$), conforme descrito anteriormente (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), obtendo-se assim valores log que foram comparados entre os grupos.

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados no presente estudo.

Primer	Sequência
IL-6	Rn01410330_m1
TNF- α	Rn99999017
IL-1 β	Rn99999009_m1
IL-10	Rn00563409_m1
AT1r	Rn01435427_m1
ECA	Rn00561094_m1
NOX2	Rn00576710_m1
NOX4	Rn00585380_m1
CD11	Rn00709342_m1
GAPDH	Rn99999916_s1

IL-6, interleucina-6; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IL-1 β , interleucina-1 β ; IL-10, interleucina-10; AT1r, receptor angiotensinérgico AT1; ECA, enzima conversora de angiotensina; NOX2, isoforma 2 da NADPH oxidase; NOX4, isoforma 4 da NADPH oxidase; CD11, gene marcador para ativação de micróglia; GAPDH, gene repórter.

3.8. Procedimentos cirúrgicos e anestésicos para experimento em animais anestesiados

Os animais com hipertensão 2R1C foram inicialmente anestesiados com halotano a 5% em 100% de oxigênio (O₂). Em seguida, os animais foram traqueostomizados e colocados em ventilação artificial com 1,5 - 2% de halotano em 100% de O₂ para continuação dos seguintes procedimentos cirúrgicos:

- Canulação da artéria e veia femoral para registro da PAM e administração de drogas, respectivamente;
- Os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 1760, David Kopf Instruments, EUA);
- Foram localizados e expostos os nervos esplâncnico e renal via posição dorsolateral (DE OLIVEIRA-SALES et al., 2010; MOREIRA et al., 2006; TAKAKURA et al., 2011; TAKAKURA; MOREIRA, 2011)

Após a finalização dos procedimentos cirúrgicos, o anestésico halotano foi retirado e substituído pelo anestésico intravenoso (iv) uretana (1,2 g/kg).

Os animais foram então ventilados artificialmente (60-80 ciclos; 1,2 ml/kg) com 21% de O₂ durante todo o período experimental. Os animais receberam uma sonda retal para monitorização da temperatura corporal (37° C), utilizando uma manta com resistência interna aquecida. O índice de CO₂-expirado foi monitorado durante todo o experimento por meio de um capnômetro (Columbus Instruments, Ohio, EUA). O nível da anestesia foi continuamente monitorado testando-se a ausência de efeitos no reflexo de retirada e ausências de variações na pressão arterial após o pinçamento da pata do animal. Após estes procedimentos, foi administrado o relaxante muscular pancurônio injetado iv com dose inicial de 1 mg/kg.

3.9. Registro da atividade simpática

Para registro do nervo simpático renal foi realizado um acesso retroperitoneal direita foi realizada para expor o nervo simpático renal. O nervo foi cuidadosamente dissecado e separado da artéria e veia renal e demais tecidos adjacentes. Após dissecação o nervo renal foi posicionado sobre um eletrodo bipolar em forma de gancho e foram cobertos com uma pasta de moldagem dental (Kwik-CastTM) durante todo o experimento. O registro foi sempre realizado na junção entre as artérias renal e aorta. Para o registro do nervo simpático esplâncnico foi realizado acesso retroperitoneal na lateral do abdômen do ramo esplâncnico do plexo simpático e então, o nervo foi dissecado e o segmento distal do nervo esplâncnico foi

colocado sobre um eletrodo bipolar em forma de gancho, conforme descrito previamente (DE OLIVEIRA-SALES et al., 2010; FAVERO et al., 2011; TAKAKURA et al., 2011; TOTOLA et al., 2013). A atividade do nervo esplâncnico foi filtrada de 100 a 3000 Hz. O nervo e o eletrodo de registro foram cobertos com uma pasta de moldagem dental (Kwik-CastTM). O eletrodo bipolar em que o nervo foi colocado estava conectado a um conversor analógico-digital (modelo CED-1401) da Cambridge Electronics Design (CED, Cambridge, UK) de 8 canais. Este aparelho possui filtro passa-baixo, ligação AC-DC (corrente direta-alternada), filtro de corte, permite variação do ganho e possibilita correção da linha de base. A partir deste aparelho, o sinal foi copiado para um sistema de aquisição de dados versão 7.07 do Spike 2 software (CED).

3.10. Avaliação da PAM e FC as injeções intravenosas de noradrenalina, ANG II e hexametônio em animais normotensos e com hipertensão 2R1C

Os animais normotensos e com hipertensão 2R1C tiveram suas artérias e veias femorais canuladas um dia antes do protocolo experimental. No dia do experimento, a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (Statham Gould) acoplado a um amplificador (ETH-200 CB Sciences Inc) e a um sistema computadorizado de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments) para o monitoramento contínuo da pressão arterial. Após um período basal de registro dos parâmetros cardiovasculares, os animais receberam injeções iv de salina (1 ml/kg de peso corporal), noradrenalina (1 pmol/0,1 ml) e ANG II (50 ng/0,1 ml). Após o retorno da pressão ao níveis basais, os animais foram divididos em grupos onde recebera injeções sc de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal). Após 4 horas foi repetido as injeções iv de salina, noradrenalina e angiotensina e ao final do experimento foi realizada a injeção do bloqueador ganglionar, hexametônio.

3.11. Ingestão diária de água e ração, peso corporal e excreção urinária

Uma série de experimentos foi realizada em gaiolas metabólicas. Animais normotensos, com hipertensão 2R1C e SHR foram transferidos das caixas coletivas para as gaiolas metabólicas individuais com livre acesso a água e ração triturada (Bio Base, Águas Frias, Brasil) e, após 3 dias de ambientação e medidas basais de ingestão de água, ração, peso corporal e excreção urinária os animais receberam injeções subcutâneas (sc) crônica do inibidor da catalase (ATZ) ou salina. As medidas da ingestão de água e ração, do peso

corporal e do volume urinário e a coleta de urina para dosagem de Na⁺ e K⁺ foram feitas diariamente por 9 dias. Para a medida da ingestão diária de água foram utilizados tubos com divisão de 1 ml. A urina foi coletada por gravidade em tubos graduados em 0,1 ml e as amostras coletadas foram analisadas em um analisador de Na⁺ e K⁺ eletrodo sensitivo (Nova 1, Nova Biomedical). A excreção total de Na⁺ e K⁺ foi calculada como concentração de Na⁺ e K⁺ multiplicado pelo volume urinário.

3.12. Análise estatística

Os resultados foram tabelados. A média e o erro padrão da média (EPM) foram representados em gráficos ou tabelas. Foram utilizados a análise de variância (ANOVA) de 1 fator (tratamento) e o pós-teste de Student-Newman-Keuls e ANOVA de 2 fatores (tratamento e tempo) e o pós-teste de Student-Newman-Keuls. Diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

3.13. Protocolos experimentais testados

3.13.1. Estudo da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2R1C que receberam injeção aguda de ATZ sc.

Os animais normotensos, SHR ou com hipertensão 2R1C tiveram sua PAM e FC monitoradas por 30 min de registro basal. Após isso, receberam injeções sc de ATZ (na dose de 300 mg/kg de peso corporal). A pressão arterial dos animais foi monitorada pelo registro direto da PAM e FC por 4 horas.

3.13.2. Estudo da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos SHR e com hipertensão 2R1C que receberam injeções crônicas de ATZ ou salina sc.

Os animais SHR ou com hipertensão 2R1C foram divididos em grupos que receberam injeções diárias sc de salina ou ATZ (600 mg/kg de peso corporal dadas em duas doses diárias de 300 mg/kg). A pressão arterial dos animais foi monitorada pelo registro direto da PAM e FC a cada 2-3 dias iniciando-se 2 dias antes das injeções sc das drogas.

3.13.3. Estudo da modulação simpática e parassimpática em ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com injeções de salina ou ATZ sc.

Os animais normotensos, SHR ou com hipertensão 2R1C foram divididos em grupos que receberam injeções diárias sc de salina, ATZ (na dose de 600 mg/kg de peso

corporal dadas em duas doses diárias de 300 mg/kg) por 9 dias. Ao final do tratamento, os animais tiveram suas artérias canuladas. No dia seguinte, os animais tiveram seus registros de PAP monitorados por 1 hora para análise da variabilidade cardiovascular onde foi medida a modulação simpática e parassimpática.

3.13.4. Estudo da atividade simpática esplâncnica e renal em ratos com hipertensão 2R1C que receberam uma única injeção de ATZ sc.

Estes experimentos foram realizados em ratos com hipertensão 2R1C anestesiados com uretana (1,2 g/kg iv), traqueostomizados, ventilados artificialmente a 21% de O₂, tiveram a artéria e veia femorais canuladas para registro de PAM e infusão de drogas respectivamente, e o nervo esplâncnico ou renal foram dissecados para registro da atividade simpática eferente. Após um período de registro basal de 30 minutos das variáveis cardiovascular e simpática, foi realizado a injeção sc de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sendo que o registro perdurou por mais 1 hora.

3.13.5. Estudo da expressão gênica no hipotálamo em ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2R1C tratados com injeção de salina ou ATZ sc cronicamente.

Os animais normotensos, SHR, com hipertensão 2R1C que foram submetidos os experimentos crônicos com ATZ ou salina sc tiveram seus encéfalos removidos ao final dos experimentos. Estes animais foram então anestesiados e tiveram seus encéfalos removidos que foram imediatamente congelados em gelo seco e armazenados em freezer – 80 °C para a posterior quantificação do RNAm dos genes de interesse do hipotálamo como descrito nos métodos.

3.13.6. Estudo das respostas barorreflexas em ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2R1C tratados com injeção de salina ou ATZ sc.

Os animais normotensos, SHR ou com hipertensão 2R1C foram divididos em grupos que receberam injeções diárias sc de salina, ATZ (na dose de 600 mg/kg de peso corporal dadas em duas doses diárias de 300 mg/kg) por 9 dias. Ao final do tratamento, os animais tiveram suas artérias e veias canuladas. No dia seguinte, após um período basal de registro dos parâmetros cardiovasculares por 30 min, os animais foram submetidos ao teste de barorreflexo onde foram avaliadas as respostas reflexas da FC ao estímulo pressor e depressor.

3.13.7. Estudo das respostas pressoras da noradrenalina e ANG II injetada iv antes e depois da injeção sc de salina ou ATZ em ratos com hipertensão 2R1C

Os animais normotensos ou com hipertensão 2R1C foram divididos em grupos que receberam injeção iv de salina seguida de injeção iv de noradrenalina ou ANG II. Após 4 horas os animais receberam injeção sc de ATZ (na dose de 300 mg/kg de peso corporal) e foram repetidas novamente as injeções iv de noradrenalina ou ANG II. A PAM e FC dos animais foram monitoradas pelo registro direto da pressão arterial.

3.13.8. Estudo do bloqueio ganglionar em ratos normotensos e com hipertensão 2R1C após a injeção sc de salina ou ATZ

Ao final do protocolo descrito acima, foi realizada a injeção iv do bloqueador ganglionar, hexametônio (30 mg/kg de peso corporal), a fim de se avaliar a contribuição do sistema nervoso simpático após a injeção sc de salina ou ATZ nos animais normotensos e com hipertensão 2R1C.

3.13.9. Estudo da ingestão diária de água e ração, peso corporal, excreção urinária e excreção de Na⁺ e K⁺ de ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com injeções sc diárias de ATZ ou salina

Os animais normotensos foram divididos em grupos e mantidos em gaiolas metabólicas com livre acesso a água e ração. Por 3 dias antes do início dos tratamentos (período controle), diariamente foram feitas medidas da ingestão de água e ração, volume urinário e peso corporal, além da coleta de uma amostra de urina para análise de Na⁺ e K⁺. Logo em seguida, os animais passaram a receber injeções diárias sc de salina, ATZ (nas doses de 300 mg/kg ou 600 mg/kg de peso corporal) e continuando as medidas diárias da ingestão de água e ração, volume urinário e peso corporal, além da coleta de uma amostra de urina por mais 8 dias.

4. RESULTADOS

4.1. PAM e FC em ratos normotensos e hipertensos tratados com injeção aguda ou crônica subcutânea de ATZ

4.1.1. Efeitos da injeção sc aguda de ATZ na PAM e FC em ratos normotensos

A injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc em ratos normotensos não alterou a PAM nas 4 horas seguintes (105 ± 3 mmHg) em comparação aos valores pré-injeção de ATZ (109 ± 4 mmHg) [F (24, 225) = 0,39; $p > 0,05$] e também em comparação aos valores dos ratos que receberam injeção sc de salina (106 ± 4 mmHg) [F (1, 225) = 0,02; $p > 0,05$] (Figura 5A). Após a injeção aguda de ATZ também não houve modificação da FC durante as 4 horas de experimento (342 ± 17 bpm) em comparação aos valores pré-injeção de ATZ (338 ± 10 bpm) [F (24,225) = 1,18; $p > 0,05$], contudo a FC dos animais tratados com ATZ foi diferente daquela do grupo que recebeu injeção sc de salina nos tempos 10, 20 e 60 min após as injeções (ATZ: 318 ± 11 bpm, vs. salina: 378 ± 12 bpm 60 min após ATZ) [F (1, 225) = 6,42 ; $p < 0,05$] (Figura 5B).

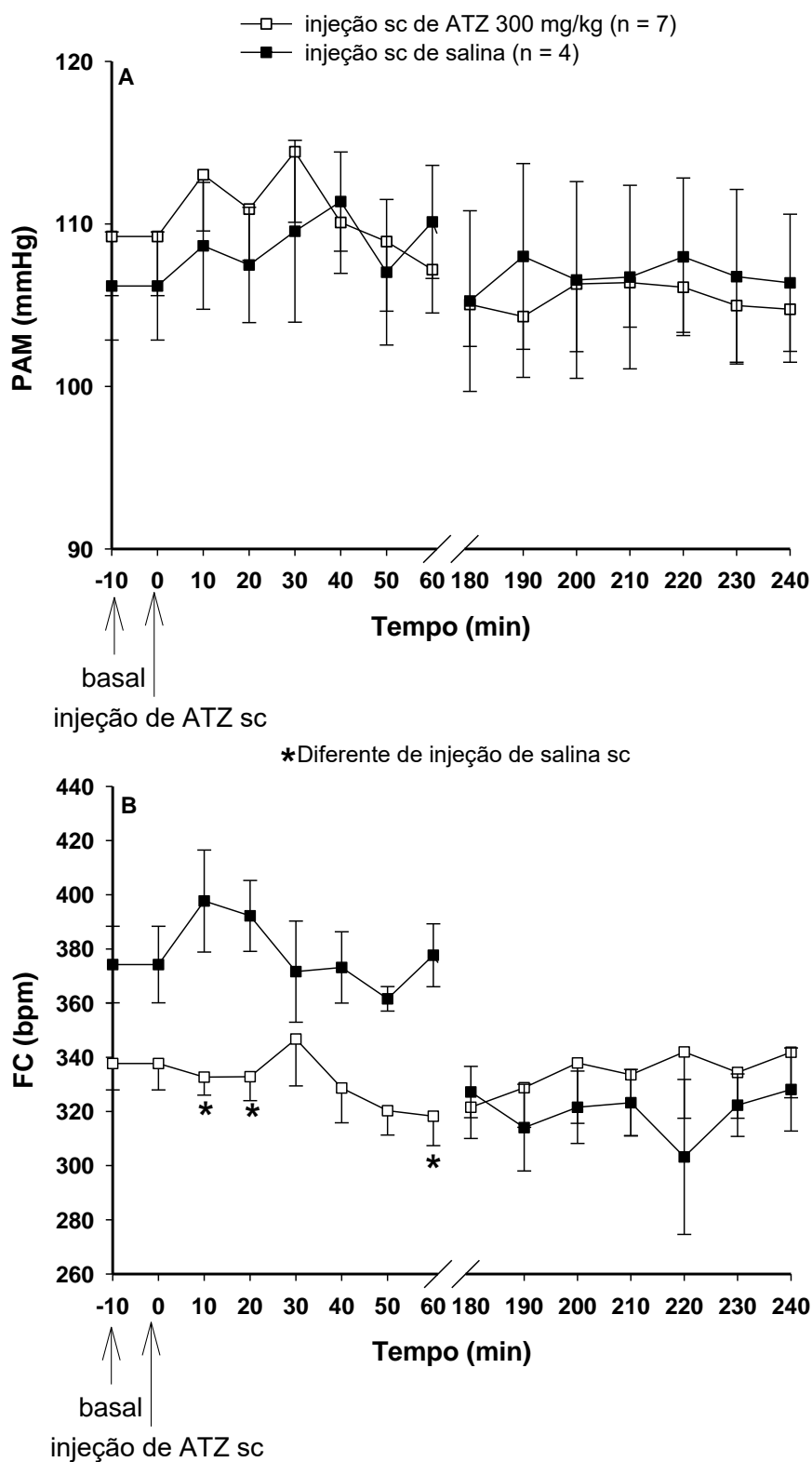


Figura 5: Modificações da (A) PAM e (B) FC imediatamente após a injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc em ratos normotensos. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.

4.1.2. Efeitos da injeção sc aguda de ATZ na PAM e FC em ratos SHR

A injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc em ratos SHR foi capaz de diminuir a PAM após 2 horas de experimento (192 ± 4 mmHg pré-injeção de ATZ, vs. 173 ± 6 mmHg 2 horas após ATZ) [F (23,161) = 6,38; $p < 0,05$] (Figura 6A). Conjuntamente, a injeção aguda de ATZ sc também diminuiu a FC dos ratos SHR após 2 horas (331 ± 11 bpm pré-injeção de ATZ, vs. 312 ± 15 bpm 2 horas após ATZ) [F (24,225) = 1,18 ; $p > 0,05$] (Figura 6B). Tais diminuições permaneceram até o final das 4 horas de experimento.

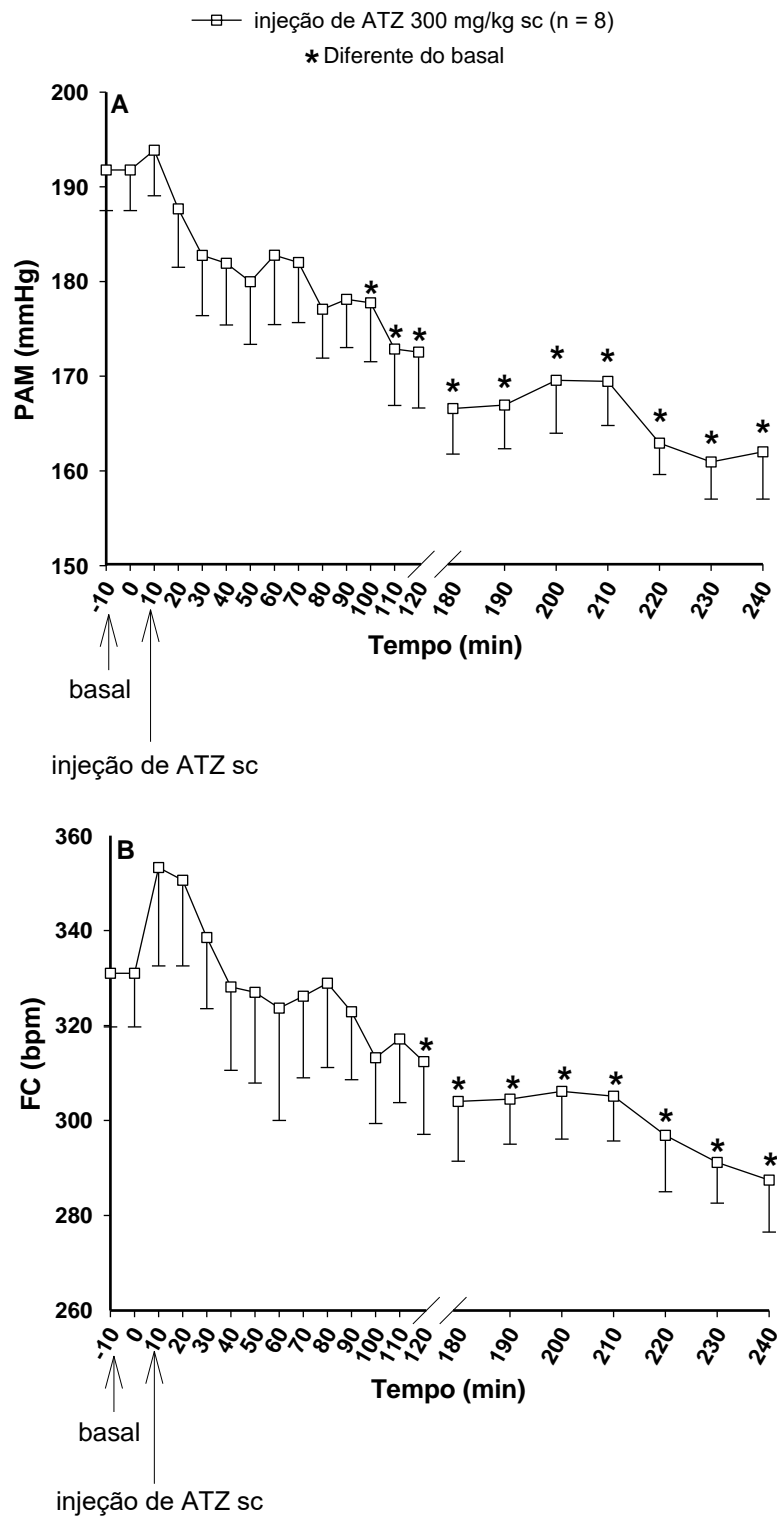


Figura 6: Modificações da (A) PAM e (B) FC imediatamente após a injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc em ratos SHR. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.1.3. Efeitos da injeção sc aguda de ATZ na PAM e FC em ratos com hipertensão 2R1C

A injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc em ratos com hipertensão 2R1C foi capaz de diminuir a PAM após 1 hora de experimento (170 ± 8 mmHg pré-injeção de ATZ, vs. 158 ± 13 mmHg 1 hora após ATZ) [F (14,98) = 9,10; $p < 0,05$] (Figura 7A). Adicionalmente, a injeção aguda de ATZ sc também diminuiu a FC dos ratos SHR após 3 horas (420 ± 14 bpm pré-injeção de ATZ, vs. 385 ± 19 bpm 3 horas após ATZ) [F (14,98) = 2,83; $p < 0,05$] (Figura 7B). Tais diminuições permaneceram até o final das 4 horas de experimento.

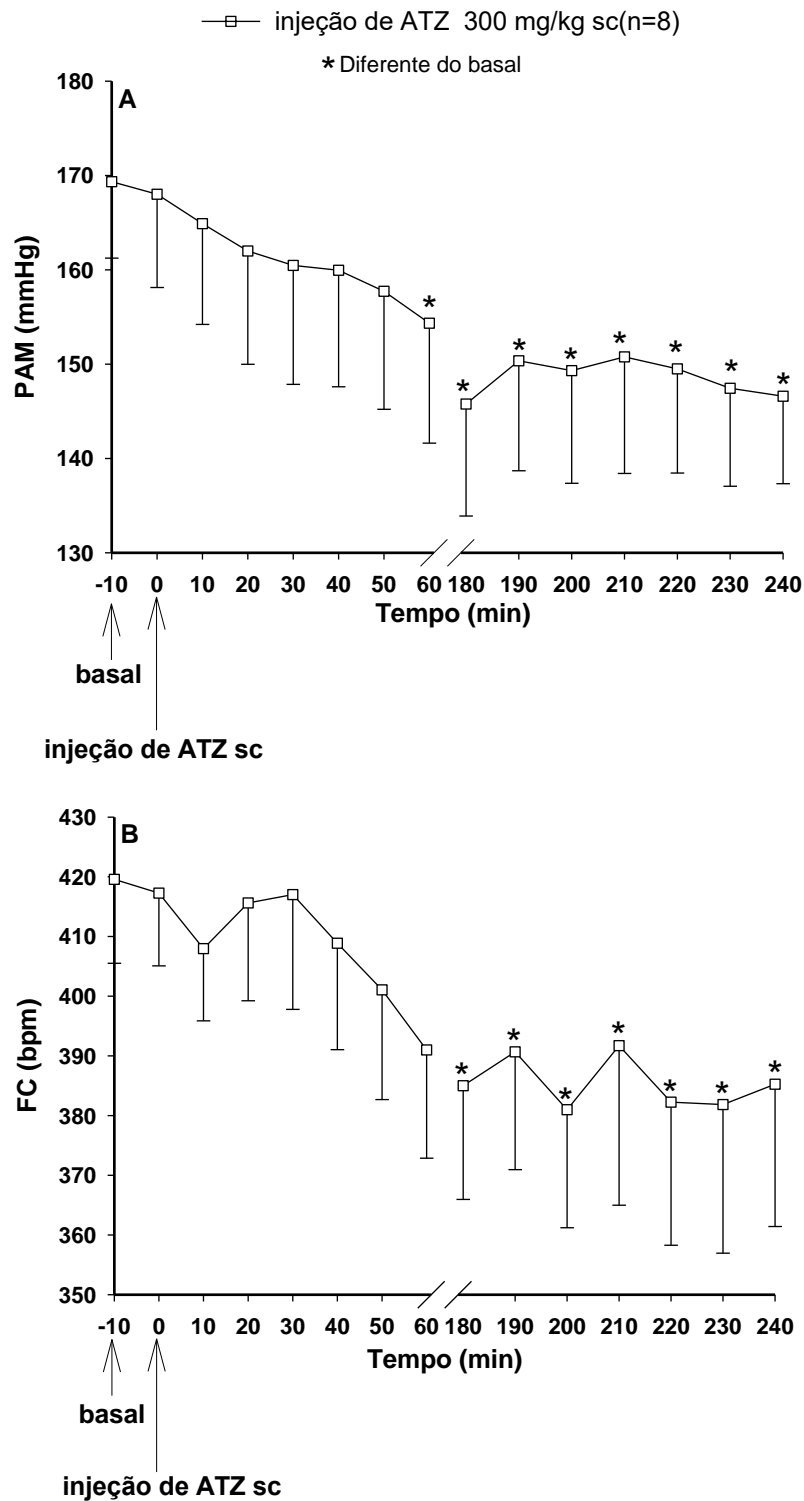


Figura 7: Modificações da (A) PAM e (B) FC imediatamente após a injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc em ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.1.4. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na PAM e FC em ratos SHR

O tratamento crônico com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) sc por 9 dias em ratos SHR reduziu significativamente a PAM (ATZ: 172 ± 8 mmHg, vs. saline: 198 ± 2 mmHg) [$F(1,49) = 17,3$; $p < 0,05$] (Figura 8A) sem alterar a FC (ATZ: 359 ± 26 bpm, vs. saline: 408 ± 19 bpm) [$F(1,49) = 1,141$; $p > 0,05$] (Figura 8B).

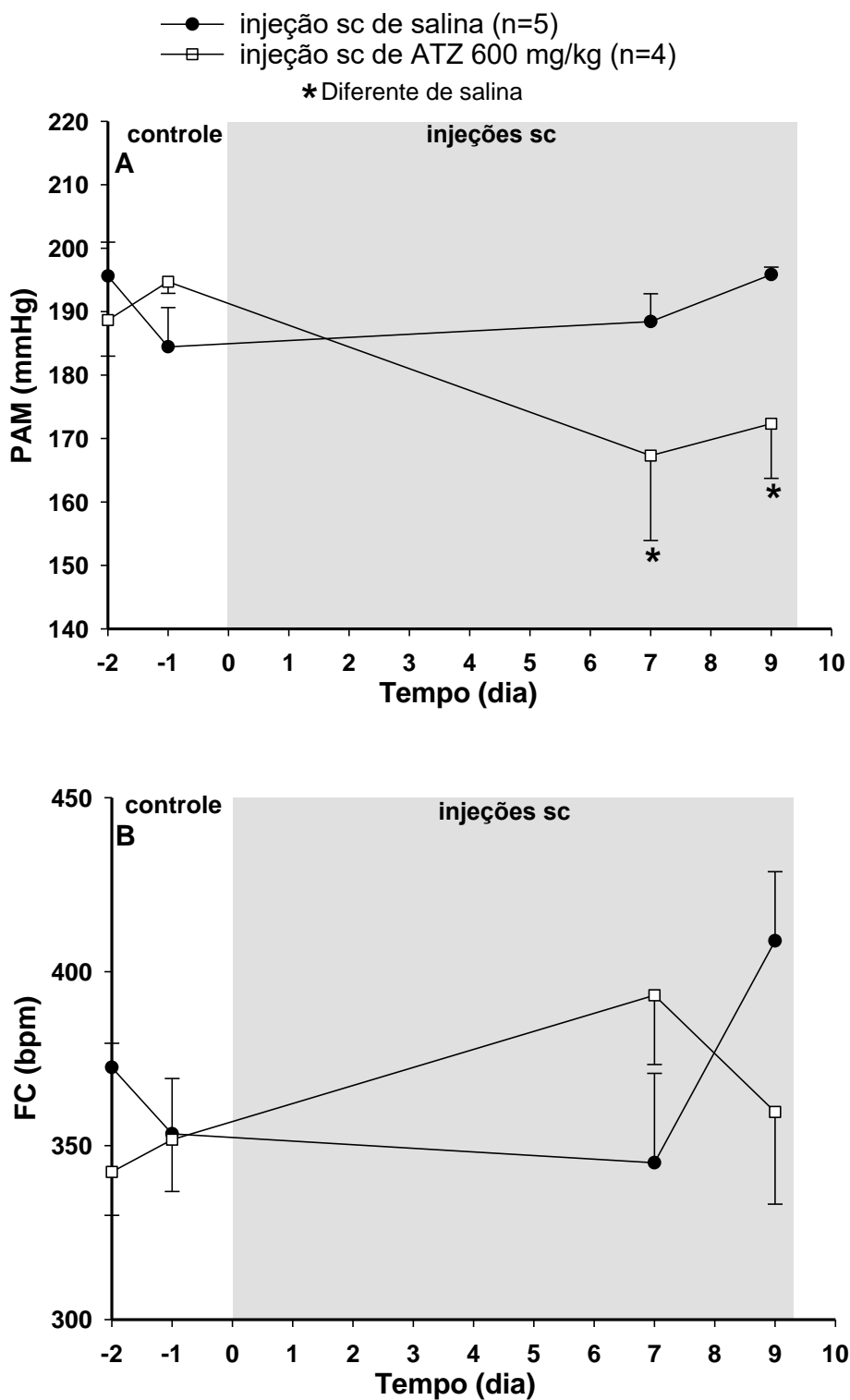


Figura 8: Modificações da (A) PAM e (B) FC após o tratamento crônico com (600 mg/kg de peso corporal) sc em ratos SHR. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.1.5. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na PAM e FC em ratos com hipertensão 2R1C

O tratamento crônico com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) sc por 9 dias em ratos com hipertensão 2R1C reduziu significativamente a PAM (ATZ: 137 ± 12 mmHg, vs. saline: 181 ± 9 mmHg) [$F(1,32) = 10,357$; $p < 0,05$] (Figura 9A) sem alterar a FC (ATZ: 429 ± 17 bpm, vs. saline: 430 ± 16 bpm) [$F(1,32) = 2,379$; $p > 0,05$] (Figura 9B).

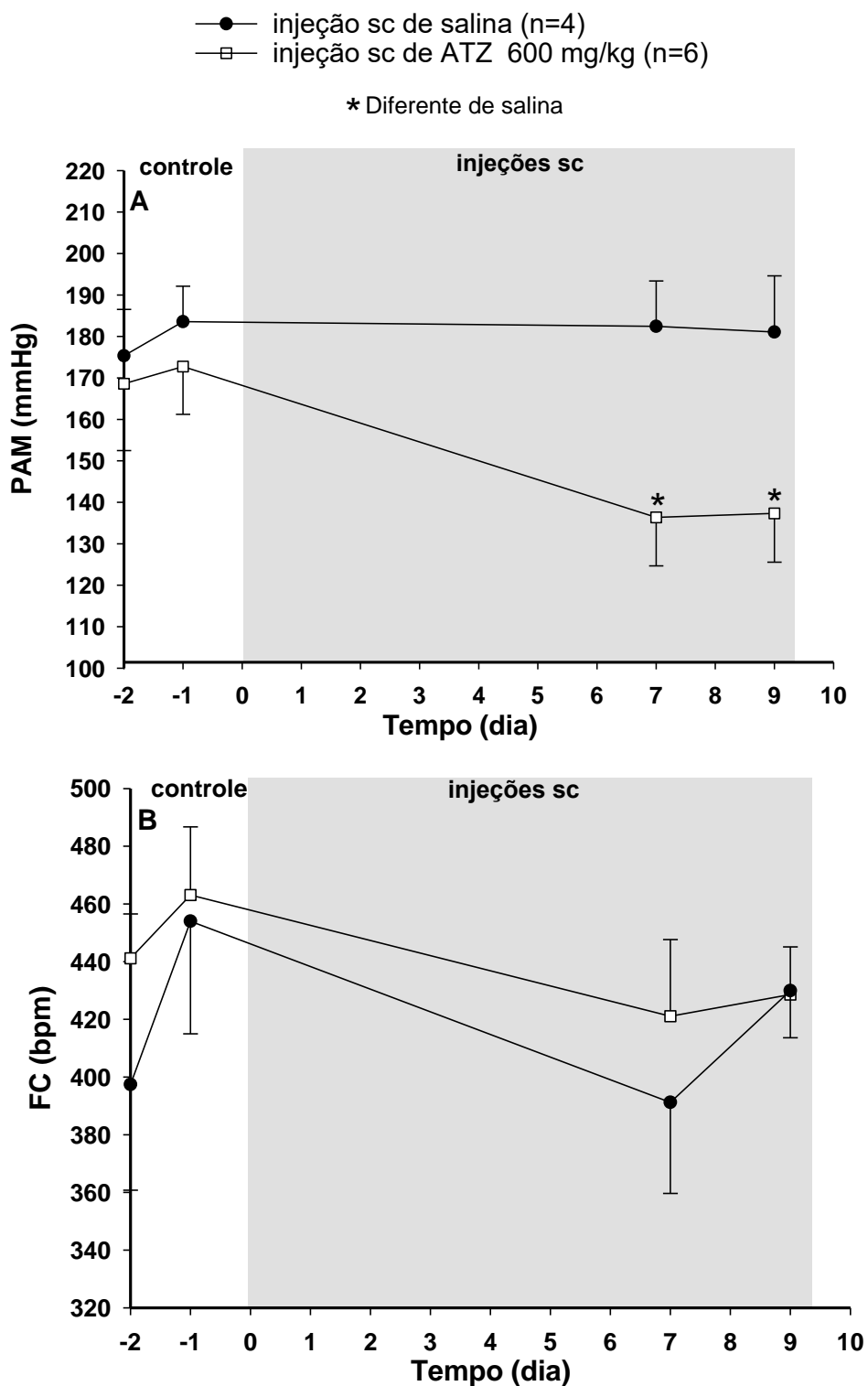


Figura 9: Modificações da (A) PAM e (B) FC após o tratamento crônico com (600 mg/kg de peso corporal) sc em ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.2. Modulação autonômica em ratos normotensos e hipertensos tratados com injeção crônica de ATZ

4.2.1. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na modulação autonômica de ratos normotensos e SHR

O tratamento crônico com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) sc por 9 dias em ratos SHR diminuiu a PAM (ATZ: 154 ± 6 mmHg, vs. saline: 181 ± 4 mmHg) [F(3,42) = 124,43; $p < 0,05$] e a FC (ATZ: 304 ± 6 bpm, vs. saline: 350 ± 12 bpm) [F(3,42) = 2,93; $p < 0,05$]. Nesta série de experimento, os animais normotensos também tiveram uma redução da PAM (ATZ: 88 ± 7 mmHg, vs. saline: 101 ± 3 mmHg) [F(3,42) = 124,43; $p < 0,05$] e da FC (ATZ: 298 ± 3 bpm, vs. saline: 340 ± 6 bpm) [F(3,42) = 2,93; $p < 0,05$] (Tabela 2).

Utilizando a análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP) foi verificada a modulação simpática, analisada pela modulação de baixa frequência (Low Frequency – LF) e a modulação parassimpática analisada pela modulação de alta frequência (High Frequency – HF) dos animais normotensos e SHR tratados cronicamente por 9 dias com ATZ ou salina sc. O tratamento com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) sc foi capaz reduzir a modulação simpática (LF) da PAS, que é um índice da modulação simpática vasomotora, dos ratos SHR comparados com os ratos tratados com salina (ATZ: $2,6 \pm 1,2$ mmHg², vs. salina: $6,3 \pm 3,4$ mmHg²) [F(3,30) = 5,25; $p < 0,05$], retornando a valores similares com os vistos em ratos NT (NT-salina: $3,7 \pm 2,2$ mmHg² e NT-ATZ: $2,5 \pm 1,4$ mmHg²) (Figura 10A). Além disso, o tratamento com ATZ sc também diminuiu a modulação simpática do IP, que se refere a modulação simpática cardíaca, (ATZ: $9,4 \pm 4,5$ un, vs. salina: $23,5 \pm 7,8$ unidades normalizadas (un)) [F(3,30) = 4,65; $p < 0,05$] (Figura 10B) além de aumentar a modulação parassimpática (HF) do IP quando comparados aos animais tratados com salina sc (ATZ: $90,5 \pm 4,5$ un, vs. salina: $76,5 \pm 7,8$ un) [F(3,30) = 4,65; $p < 0,05$] (Figura 10C). Ao analisarmos a razão entre LF/HF do IP, que se refere ao balanço simpatovagal, observamos que o tratamento crônico com ATZ sc promoveu uma redução na razão LF/HF dos animais SHR quando comparados ao grupo tratado com salina sc (ATZ: $0,11 \pm 0,05$, vs. salina: $0,35 \pm 0,17$) [F(3,31) = 4,17; $p < 0,05$] (Figura 10D), provavelmente resultado da combinação de uma redução da LF e um aumento na HF do IP no grupo tratado com ATZ sc.

Tabela 2: PAM e FC em ratos normotensos e SHR tratados cronicamente com ATZ sc ou salina por 9 dias

Tratamento		PAM (mmHg)	FC (bpm)
salina	NT	101 ± 3	340 ± 6
	SHR	181 ± 4* [#]	350 ± 6*
ATZ	NT	88 ± 2*	298 ± 3*
	SHR	154 ± 6* ^{#&}	304 ± 6 ^{&}

Resultados são expressos pela media ± EPM; * Diferente de NT tratado com salina; [#] Diferente de SHR tratado com salina; [&] Diferente de SHR tratado com salina; n = 11 – 12/grupo. ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. NT, ratos normotensos.

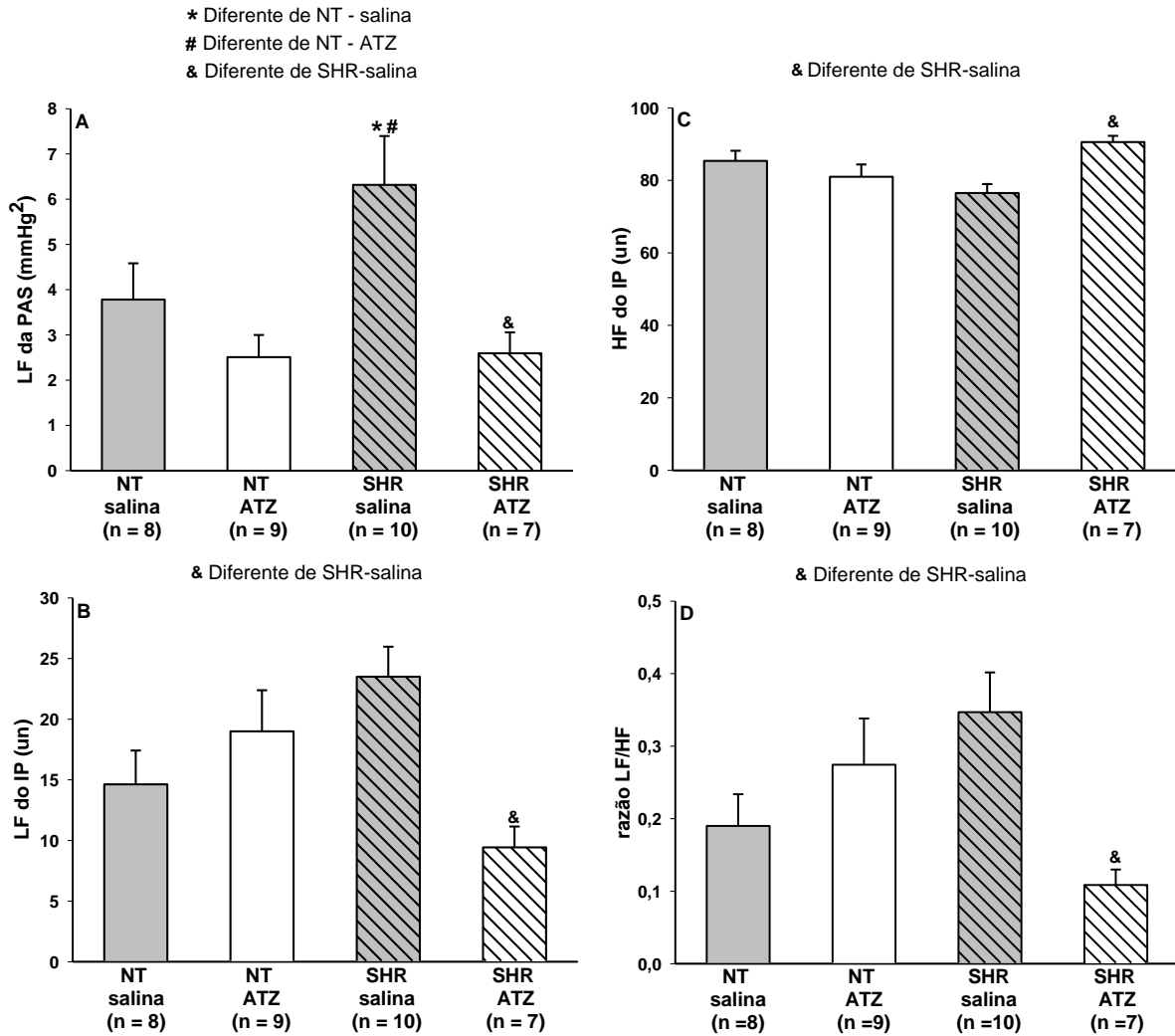


Figura 10: Análise espectral da (A) modulação simpática (LF) da PAS, da (B) modulação simpática (LF) do IP, da (C) modulação parassimpática (HF) do IP e da (D) razão LF/HF do IP dos animais normotensos (NT) e SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.2.2. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na modulação autonômica de ratos normotensos e com hipertensão 2R1C

O tratamento crônico com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) sc por 9 dias em ratos com hipertensão 2R1C diminuiu a PAM (ATZ: 162 ± 10 mmHg, vs. saline: 209 ± 4 mmHg) [$F(3,37) = 81,30$; $p < 0,05$] e a FC (ATZ: 371 ± 6 bpm, vs. saline: 430 ± 9 bpm) [$F(3,37) = 27,20$; $p < 0,05$] entretanto, o mesmo tratamento não alterou as variações de PAM e FC nos ratos normotensos (Tabela 3).

Utilizando a análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP) foi verificada a modulação simpática, analisada pela modulação de baixa frequência (Low Frequency – LF) e a modulação parassimpática analisada pela modulação de alta frequência (High Frequency – HF) dos animais normotensos e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente por 9 dias com ATZ ou salina sc. O tratamento com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) sc foi capaz reduzir a modulação simpática (LF) da PAS, que é um índice da modulação simpática vasomotora, dos ratos com hipertensão 2R1C comparados com os ratos tratados com salina (ATZ: $3,2 \pm 0,4$ mmHg², vs. salina: $7,6 \pm 1,5$ mmHg²) [$F(3,30) = 7,68$; $p < 0,05$], retornando a valores similares com os vistos em ratos NT (NT-salina: $2,9 \pm 0,5$ mmHg² e NT-ATZ: $2,1 \pm 0,4$ mmHg²) (Figura 11A). Além disso, o tratamento com ATZ sc também diminuiu a modulação simpática do IP, que se refere a modulação simpática cardíaca, (ATZ: $14,6 \pm 2,9$ un, vs. salina: $31,4 \pm 3$ unidades normalizadas (un)) [$F(3,30) = 5,54$; $p < 0,05$] (Figura 11B) além de aumentar a modulação parassimpática (HF) do IP quando comparados aos animais tratados com salina sc (ATZ: $85,3 \pm 2,9$ un vs. salina: $68,6 \pm 3$ un) [$F(3,30) = 5,52$; $p < 0,05$] (Figura 11C). Ao analisarmos a razão entre LF/HF do IP, que se refere ao balanço simpatovagal, observamos que o tratamento crônico com ATZ sc promoveu uma redução na razão LF/HF dos animais com hipertensão 2R1C quando comparados ao grupo tratado com salina sc (ATZ: $0,19 \pm 0,05$, vs. salina: $0,52 \pm 0,09$) [$F(3,31) = 4,21$; $p < 0,05$] (Figura 11D), provavelmente resultado da combinação de uma redução da LF e um aumento na HF do IP no grupo tratado com ATZ sc.

Tabela 3: PAM e FC em ratos normotensos e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ ou salina sc por 9 dias

Tratamento		PAM (mmHg)	FC (bpm)
salina	NT	99 ± 2	337 ± 10
	2R1C	209 ± 4*	430 ± 9*
ATZ	NT	92 ± 3	343 ± 7
	2R1C	162 ± 10* [#]	371 ± 6* [#]

Resultados são expressos pela média ± EPM; * Diferente de NT tratado com salina; [#] Diferente de SHR tratado com salina; n = 8 – 11/grupo. ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. NT, ratos normotensos.

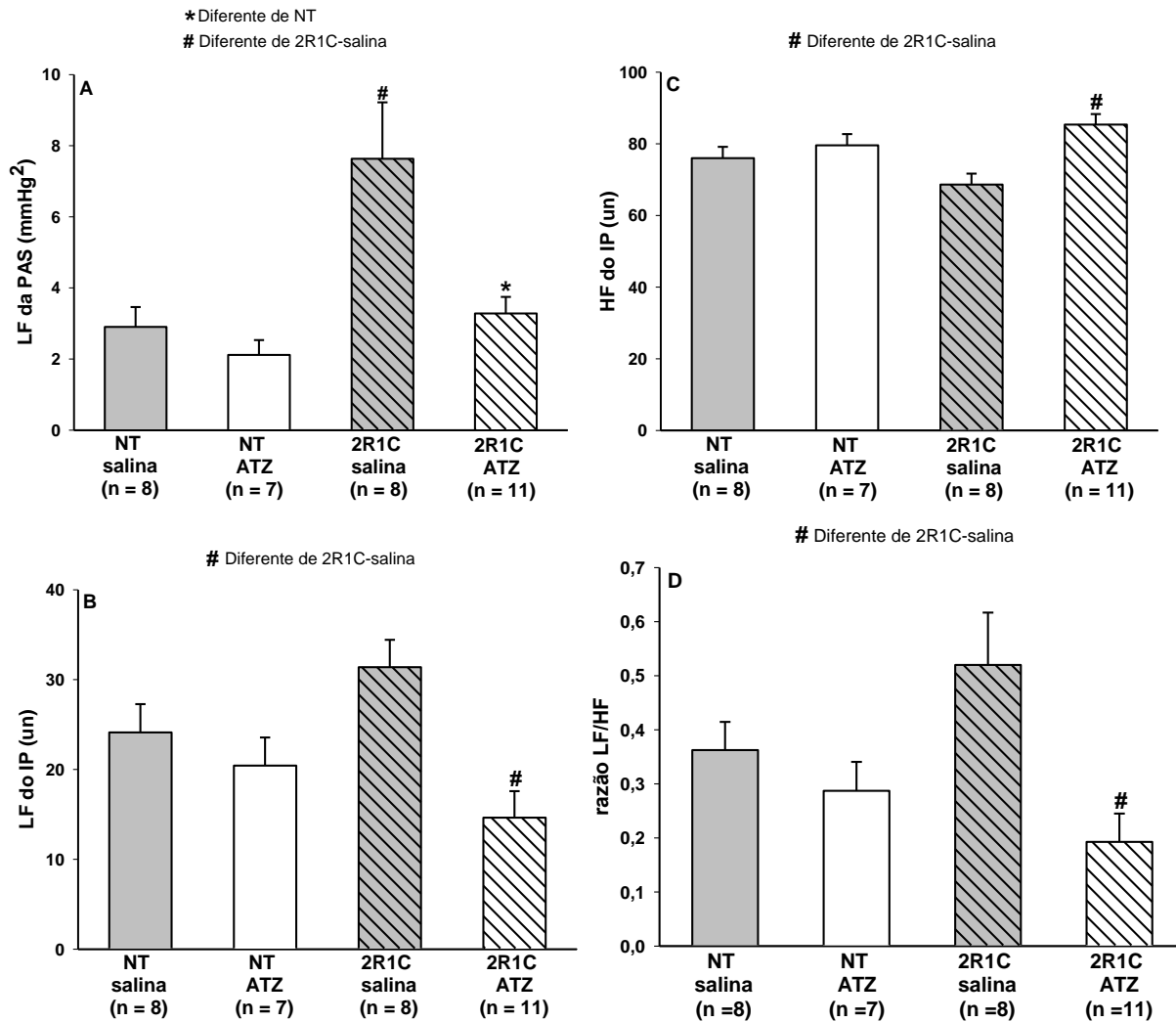


Figura 11: Análise espectral da (A) modulação simpática (LF) da PAS, da (B) modulação simpática (LF) do IP, da (C) modulação parassimpática (HF) do IP e da (D) razão LF/HF do IP dos animais normotensos (NT) e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.3. Efeitos da inibição da catalase pela injeção aguda de ATZ sobre a PAM e atividade simpática renal e esplâncnica em animais com hipertensão 2R1C anestesiados

Os resultados apresentados nos itens anteriores demonstraram que animais com hipertensão 2R1C tiveram uma diminuição da PAM e da modulação simpática pela inibição da catalase promovida pela injeção sc de ATZ. Para se confirmar a contribuição do sistema nervoso simpático neste modelo de hipertensão e se os efeitos anti-hipertensivos promovidos pelo ATZ sc são devidos a uma redução da atividade simpática, possivelmente por sua ação central do ATZ, propusemos estudar o que ocorre na atividade simpática nos leitos renal e esplâncnico em animais anestesiados.

A injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc promoveu uma redução da atividade nervosa simpática renal (ANSr) (0 ± 0 % de resposta pré-injeção de ATZ, vs. $-51,5 \pm 10$ % de resposta 1 hora após ATZ) [F (6,18) = 10,51; $p < 0,05$] (Figura 12A). Entretanto, a injeção de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc não promoveu diferença na atividade nervosa simpática esplâncnica (ANSs) (0 ± 0 % de resposta pré-injeção de ATZ, vs. $-8,4 \pm 16$ % de resposta 1 hora após ATZ) [F (6,30) = 1,98; $p > 0,05$] (Figura 12B). Semelhante ao que ocorreu nos animais não anestesiados, a PAM nos ratos com hipertensão 2R1C que foram utilizados para o registro do nervo renal foi reduzida pela injeção de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc (180 ± 13 mmHg pré-injeção de ATZ, vs. 160 ± 13 mmHg/1 hora) [F (6,18) = 11,55; $p < 0,05$] (Figura 12C), além de diminuir a PAM dos ratos utilizados para registro do nervo esplâncnico (206 ± 11 mmHg pré-injeção de ATZ, vs. 180 ± 10 mmHg 1 hora após ATZ) [F (6,30) = 2,71; $p < 0,05$] (Figura 12D). Tais respostas podem ser ilustradas pelo traçado representativo de um animal utilizado para registro da atividade simpática renal e outro animal utilizado para o registro da atividade simpática esplâncnica (Figura 13)

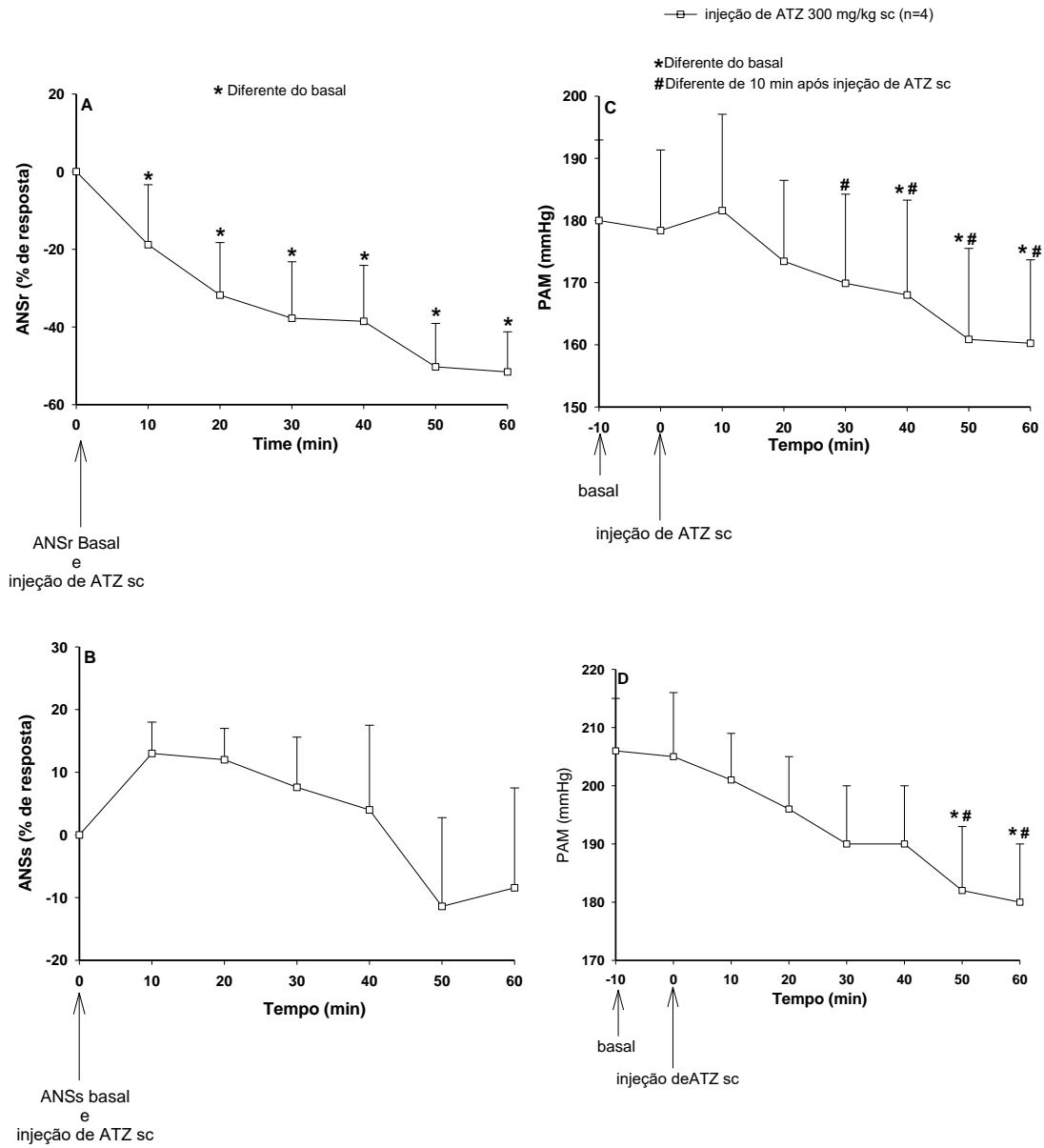


Figura 12: Modificações da (A) atividade nervosa simpática renal (ANSr), (B) atividade nervosa simpática esplâncica (ANSs) e (C, D) PAM dos animais testados em A e B, respectivamente, após a injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc em ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

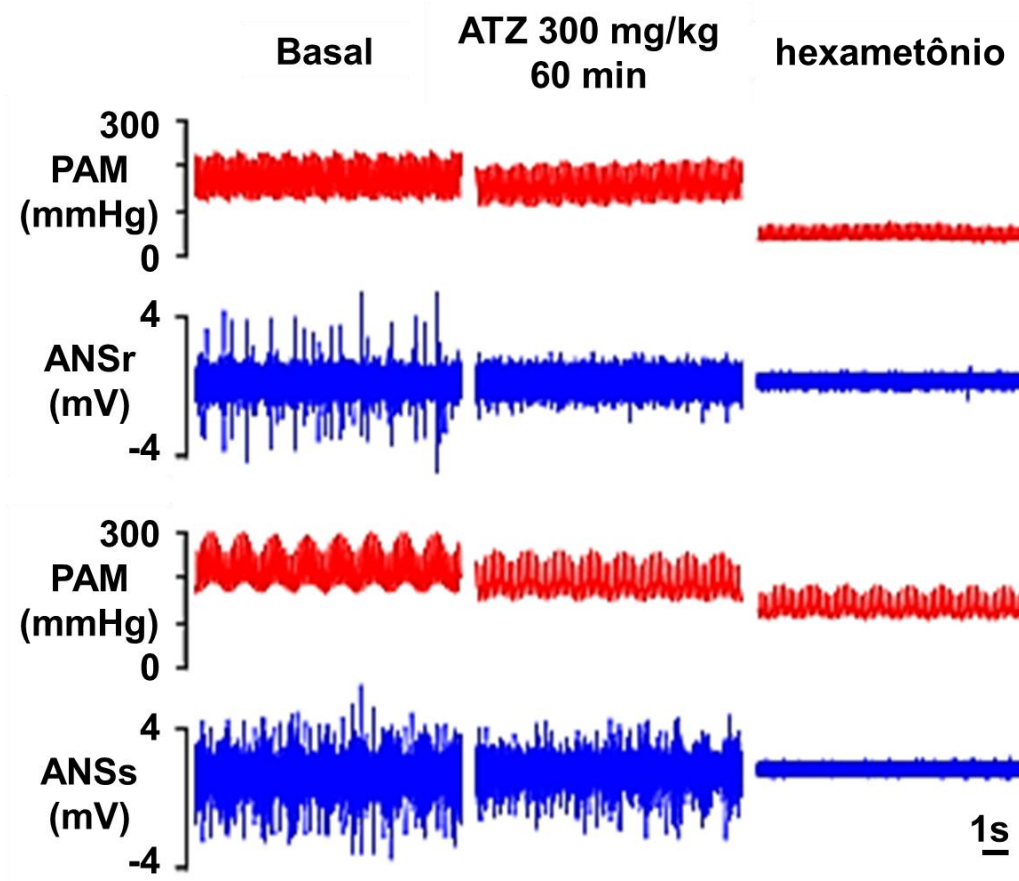


Figura 13: Traçado representativo demonstrando as modificações de PAM, atividade nervosa simpática renal (ANSr) e atividade nervosa simpática esplâncnica (ANSs) após a injeção aguda de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc em ratos com hipertensão 2R1C.

4.4. Expressão de RNAm de citocinas inflamatórias, de componentes do sistema renina angiotensina, do estresse oxidativo e da ativação de micróglia no hipotálamo de ratos normotensos e hipertensos tratados com injeção crônica de ATZ

4.4.1. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na expressão de RNAm de citocinas inflamatórias, de componentes do sistema renina angiotensina (SRA), do estresse oxidativo e da ativação de micróglia no hipotálamo de ratos normotensos e SHR

Ao final dos experimentos com os ratos normotensos e SHR que foram submetidos ao tratamento crônico com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) ou salina sc por 9 dias foram realizadas as quantificações da expressão de RNAm de citocinas inflamatórias, componentes do SRA, do estresse oxidativo e da ativação de micróglia representada pelo gene CD11 que é um indicador da ativação da micróglia no hipotálamo destes animais. Nos ratos SHR tratados com salina há um aumento da expressão de RNAm para citocina pró-inflamatória IL-6 no hipotálamo quando comparado aos animais normotensos tratados com salina (SHR salina: $1,53 \pm 0,106$ número de vezes, vs. NT salina: $1,00 \pm 0,104$ número de vezes). O tratamento crônico com ATZ sc foi capaz de diminuir a expressão de RNAm para citocina pró-inflamatórias IL-6 em ratos SHR (ATZ: $1,17 \pm 0,066$ número de vezes vs. salina: $1,53 \pm 0,106$ número de vezes) [$F(3,20) = 8,07$; $p < 0,05$] (Figura 14A) porém, não alterou de forma significativa da expressão de RNAm para TNF- α (ATZ: $1,123 \pm 0,062$ número de vezes vs. salina: $1,229 \pm 0,117$ número de vezes) [$F(3,20) = 1,25$; $p = 0,31$] (Figura 14B) e IL-1 β (ATZ: $1,167 \pm 0,119$ número de vezes vs. salina: $1,31 \pm 0,113$ número de vezes) [$F(3,20) = 1,59$; $p = 0,22$] (Figura 14C). Entretanto, o tratamento crônico com ATZ promoveu um aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 (ATZ: $2,336 \pm 0,445$ número de vezes vs. salina: $1,022 \pm 0,215$ número de vezes) [$F(3,16) = 5,36$; $p < 0,05$] (Figura 14D) no hipotálamo de ratos SHR. Com relação aos componentes do SRA, o tratamento crônico com ATZ sc não alterou a expressão de RNAm para a enzima conversora de angiotensina (ECA) (ATZ: $1,171 \pm 0,049$ número de vezes vs. salina: $1,174 \pm 0,038$ número de vezes) [$F(3,20) = 1,92$; $p = 0,15$] (Figura 15A) porém, ATZ foi capaz de reduzir a expressão do RNAm para o receptor AT1 quando comparado aos ratos SHR tratados com salina (ATZ: $0,814 \pm 0,029$ número de vezes vs. salina: $1,0 \pm 0,041$ número de vezes) [$F(3,20) = 3,88$; $p < 0,05$] (Figura 15B) no hipotálamo de ratos SHR. Já com relação a marcadores de estresse oxidativo observamos que nos ratos SHR há uma tendência de aumento da expressão da isoforma NOX2 da NADPH oxidase quando comparado aos ratos normotensos tratados com salina (SHR salina: $1,52 \pm 0,270$ número de vezes vs. salina: $1,00 \pm$

0,121 número de vezes) [$F(3,20) = 3,16$; $p = 0,038$] e este aumento na expressão da isoforma NOX2 da NADPH oxidase que foi reduzido pelo tratamento crônico com ATZ sc (ATZ: $0,854 \pm 0,063$ número de vezes vs. salina: $1,518 \pm 0,270$ número de vezes) [$F(3,20) = 3,16$; $p < 0,05$] (Figura 16A) no hipotálamo de ratos SHR. Porém, não houve diferença na quantificação do RNAm para expressão de outra isoforma da NADPH oxidase, a NOX4 (ATZ: $0,973 \pm 0,035$ número de vezes vs. salina: $0,854 \pm 0,056$ número de vezes) [$F(3,20) = 2,52$; $p > 0,05$] (Figura 16B) no hipotálamo de ratos SHR. Além disso, ao se quantificar o gene CD11 que é um gene indicador da ativação da micróglia, os ratos SHR apresentam aumento na ativação de micróglia no hipotálamo quando comparados aos ratos normotensos tratados com salina sc (SHR salina: $1,79 \pm 0,083$ número de vezes vs. NT salina: $1,00 \pm 0,1$ número de vezes) e este aumento foi reduzido pelo tratamento crônico com ATZ sc (ATZ: $1,474 \pm 0,061$ número de vezes vs. salina: $1,791 \pm 0,083$ número de vezes) [$F(3,16) = 33,37$; $p < 0,05$] (Figura 16C).

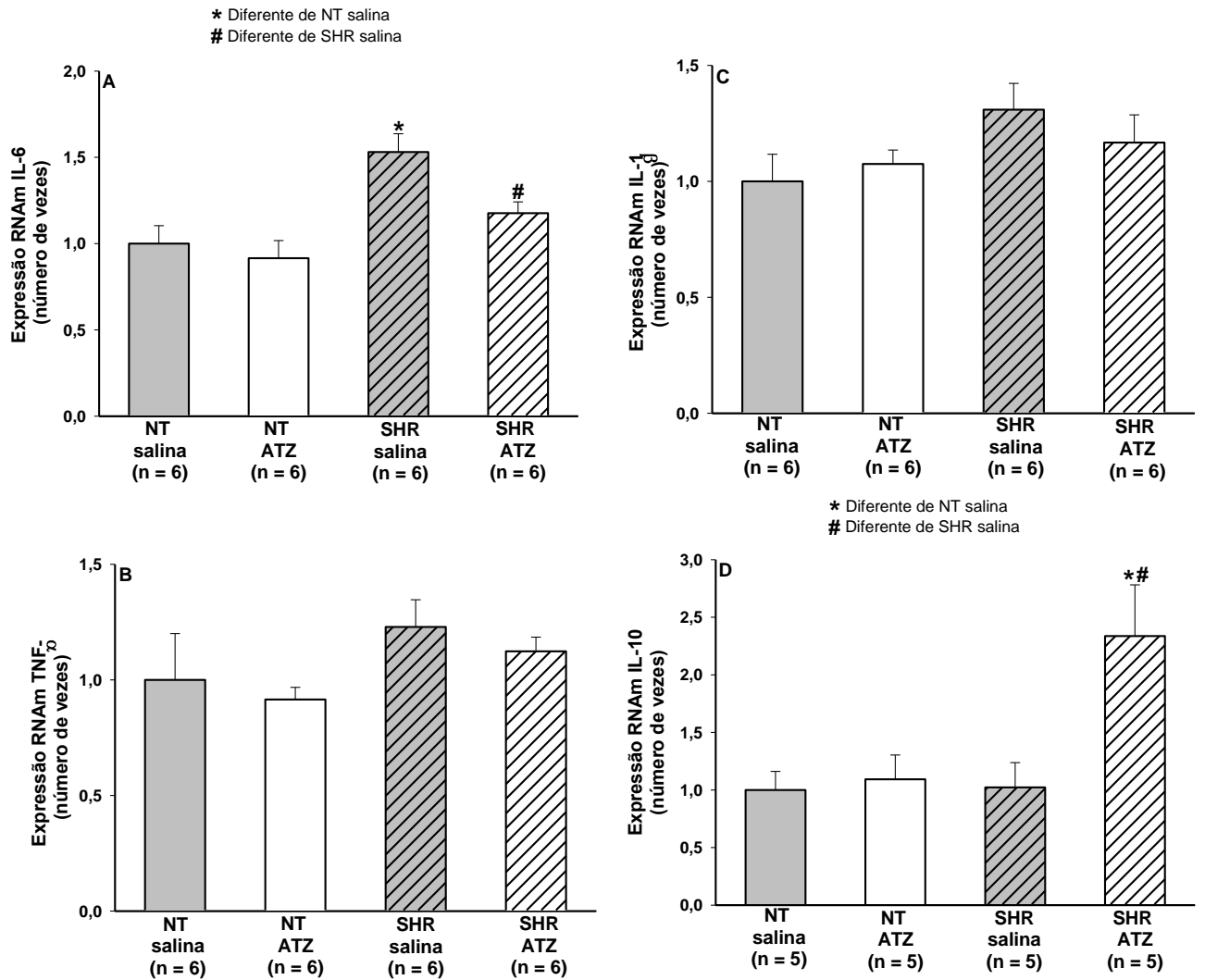


Figura 14: Expressão do RNAm no hipotálamo da (A) interleucina-6 (IL-6), do (B) fator de necrose tumoral- α (TNF- α), da (C) interleucina-1 β (IL-1 β) e da (D) interleucina-10 (IL-10) de animais normotensos (NT) e SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

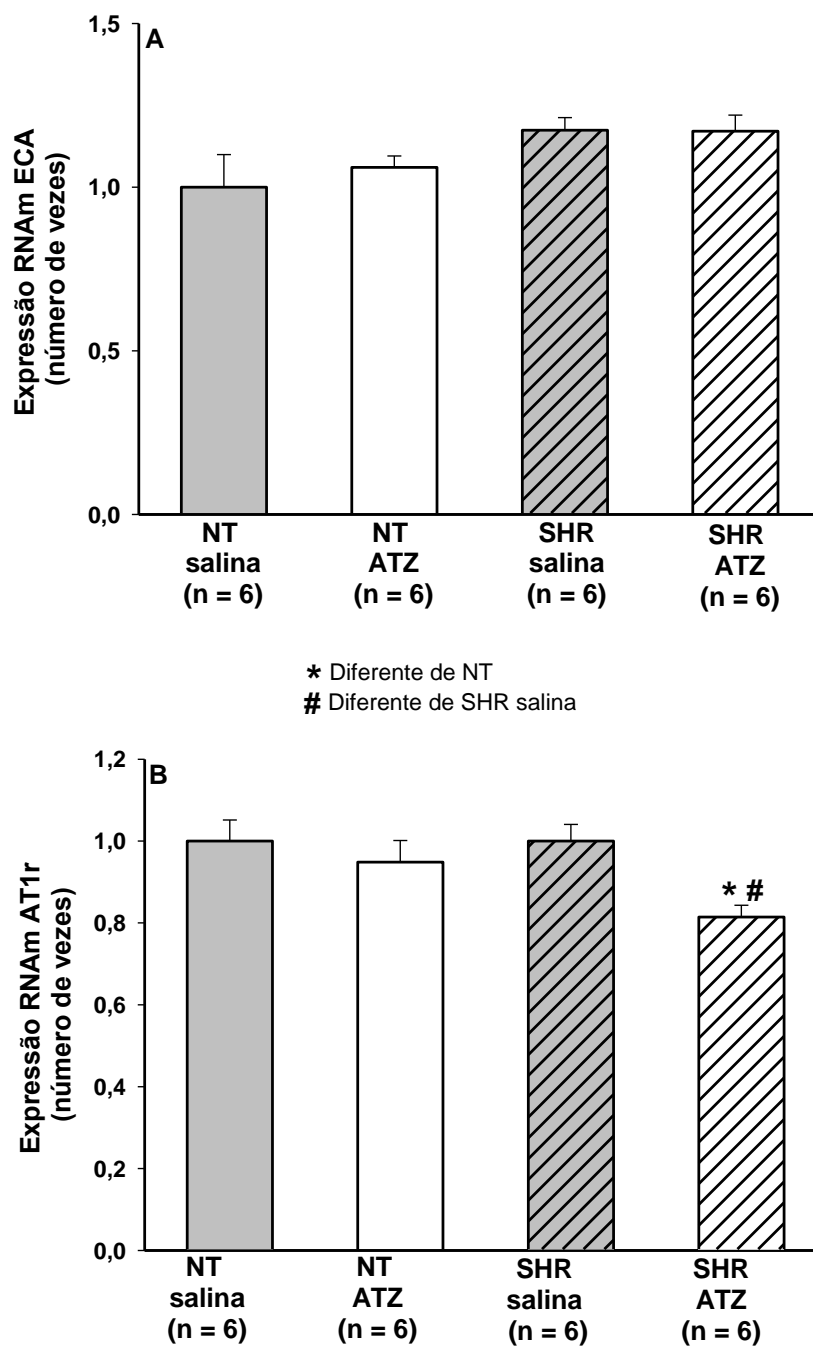


Figura 15: Expressão do RNAm no hipotálamo da (A) enzima conversora de angiotensina (ECA) e do (B) receptor AT1(AT1r) de animais normotensos (NT) e SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

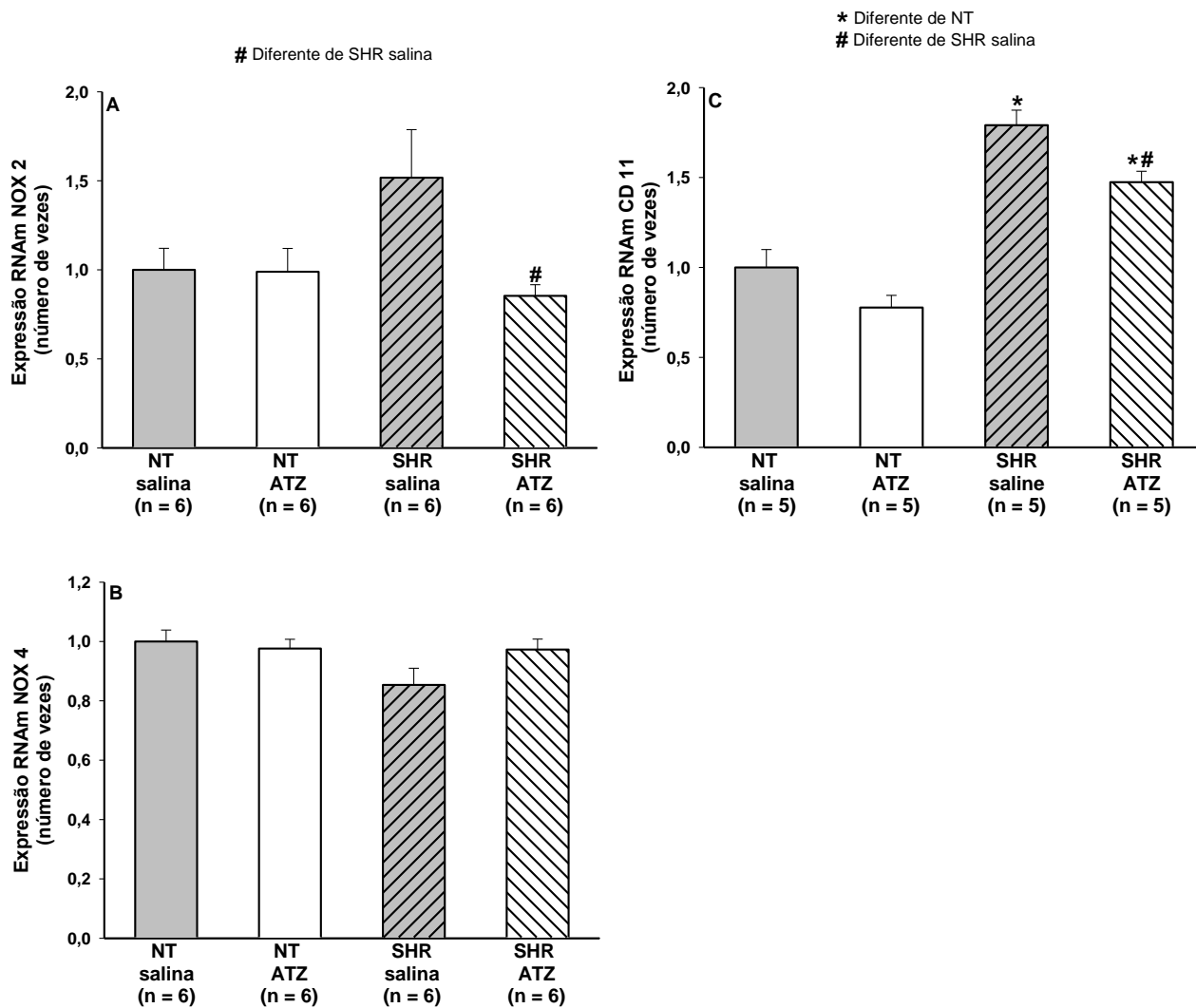


Figura 16: Expressão do RNAm no hipotálamo da (A) subunidade da NADPH oxidase NOX2 (NOX2), da (B) subunidade da NADPH oxidase NOX4 (NOX4) e do (C) marcador de ativação de micróglia (CD11) de animais normotensos (NT) e SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.4.2. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na expressão de RNAm de citocinas inflamatórias, de componentes do sistema renina angiotensina (SRA), do estresse oxidativo e da ativação de microglia no hipotálamo de ratos normotensos e com hipertensão 2R1C

Ao final dos experimentos com os ratos normotensos e com hipertensão 2R1C que foram submetidos ao tratamento crônico com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) ou salina sc por 9 dias foram realizadas as quantificações da expressão de RNAm de citocinas inflamatórias, componentes do SRA, do estresse oxidativo e da ativação de microglia representada pelo gene CD11 que é um indicador da ativação da micróglia no hipotálamo destes animais. Nos ratos com hipertensão 2R1C tratados com salina há um aumento da expressão de RNAm para citocina pró-inflamatória IL-6 no hipotálamo quando comparado aos animais normotensos tratados com salina (2R1C salina: $2,32 \pm 0,360$ número de vezes, vs. NT salina: $1,00 \pm 0,170$ número de vezes). O tratamento crônico com ATZ sc foi capaz de diminuir a expressão de RNAm para citocinas pró-inflamatórias IL-6 (ATZ: $0,803 \pm 0,057$ número de vezes vs. salina: $2,318 \pm 0,360$ número de vezes) [$F(3,18) = 9,31$; $p < 0,05$] (Figura 17A). Além disso, nos ratos com hipertensão 2R1C tratados com salina também há um aumento da expressão de RNAm para citocina pró-inflamatória TNF- α no hipotálamo quando comparado aos animais normotensos tratados com salina (2R1C salina: $8,03 \pm 1,95$ número de vezes, vs. NT salina: $1,00 \pm 0,06$ número de vezes). O tratamento crônico com ATZ sc foi capaz de diminuir a expressão de RNAm para TNF- α (ATZ: $0,876 \pm 0,108$ número de vezes vs. salina: $8,031 \pm 1,949$ número de vezes) [$F(3,18) = 13,34$; $p < 0,05$] (Figura 17B) porém, não alterou de forma significativa a expressão de RNAm para IL-1 β (ATZ: $0,818 \pm 0,117$ número de vezes vs. salina: $1,807 \pm 0,754$ número de vezes) [$F(3,24) = 1,190$; $p > 0,05$] (Figura 17C), bem como a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (ATZ: $1,190 \pm 0,485$ vs. salina: $0,927 \pm 0,335$ número de vezes) [$F(3,24) = 0,13$; $p > 0,05$] (Figura 17D) no hipotálamo de ratos com hipertensão 2R1C. Com relação aos componentes do SRA, o tratamento crônico com ATZ sc não alterou a expressão de RNAm para a enzima conversora de angiotensina (ECA) (ATZ: $0,945 \pm 0,064$ número de vezes vs. salina: $0,964 \pm 0,098$ número de vezes) [$F(3,18) = 0,56$; $p > 0,05$] (Figura 18A). Entretanto, nos ratos com hipertensão 2R1C há um aumento na expressão de RNAm para o receptor AT1 no hipotálamo quando comparado aos ratos normotensos tratados com ATZ (2R1C salina: $1,19 \pm 0,21$ número de vezes vs. salina: $0,58 \pm 0,04$ número de vezes), e este aumento foi reduzido pelo tratamento crônico com ATZ (ATZ: $0,743 \pm 0,045$

número de vezes vs. salina: $1,191 \pm 0,217$ número de vezes) [$F(3,24) = 5,10$; $p < 0,05$] (Figura 18B) no hipotálamo de ratos com hipertensão 2R1C. Já com relação a marcadores de estresse oxidativo observamos que nos ratos com hipertensão 2R1C não houve diferença significativa na expressão da isoforma NOX2 da NADPH oxidase pelo tratamento crônico com ATZ sc (ATZ: $0,851 \pm 0,134$ número de vezes vs. salina: $1,758 \pm 0,533$ número de vezes) [$F(3,21) = 0,92$; $p > 0,05$] (Figura 19A) e da isoforma da NADPH oxidase, a NOX4 (ATZ: $0,984 \pm 0,072$ número de vezes vs. salina: $0,987 \pm 0,089$ número de vezes) [$F(3,24) = 0,31$; $p > 0,05$] (Figura 19B) no hipotálamo de ratos com hipertensão 2R1C. Além disso, os ratos com hipertensão 2R1C não apresentaram alterações na ativação de micróglia representado pela quantificação do gene CD11 (indicador da ativação da micróglia) no hipotálamo deste animais pelo tratamento crônico com ATZ sc (ATZ: $0,454 \pm 0,066$ número de vezes vs. salina: $1,025 \pm 0,397$ número de vezes) [$F(3,24) = 0,314$; $p > 0,05$] (Figura 19C).

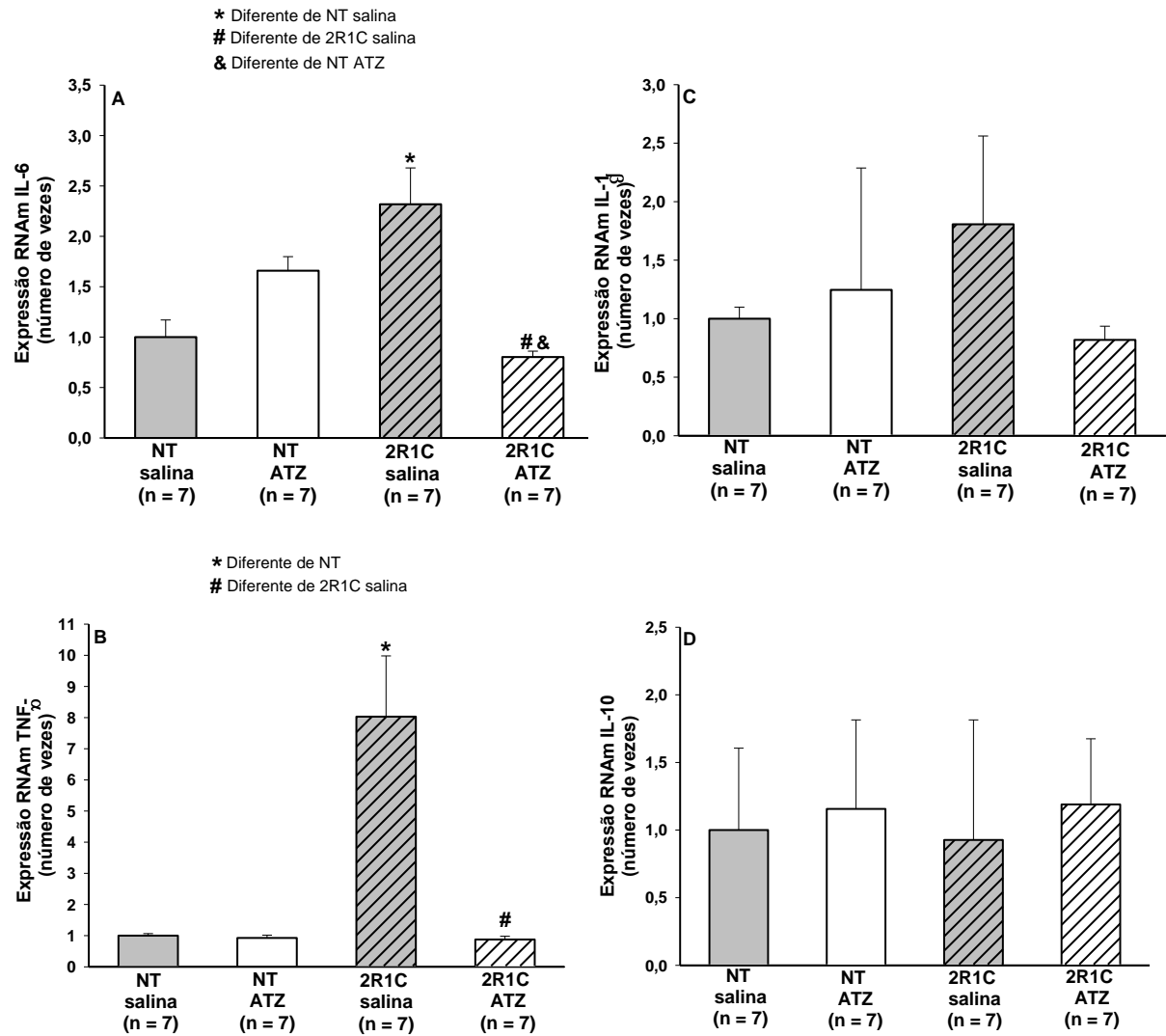


Figura 17: Expressão do RNAm no hipotálamo da (A) interleucina-6 (IL-6), do (B) fator de necrose tumoral- α (TNF- α), da (C) interleucina-1 β (IL-1 β) e da (D) interleucina-10 (IL-10) de animais normotensos (NT) e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

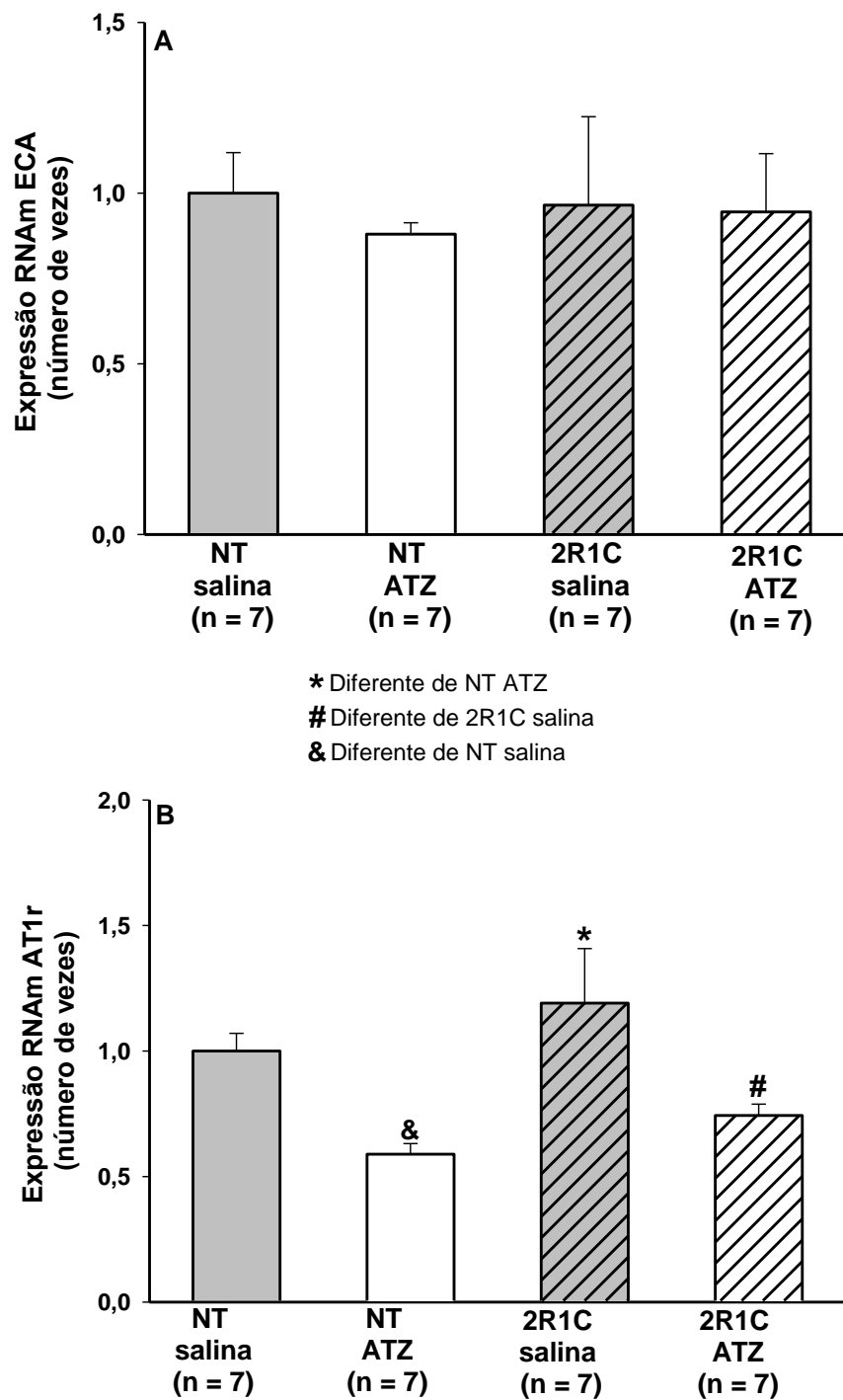


Figura 18: Expressão do RNAm no hipotálamo da (A) enzima conversora de angiotensina (ECA) e do (B) receptor AT1 (AT1r) de animais normotensos (NT) e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.

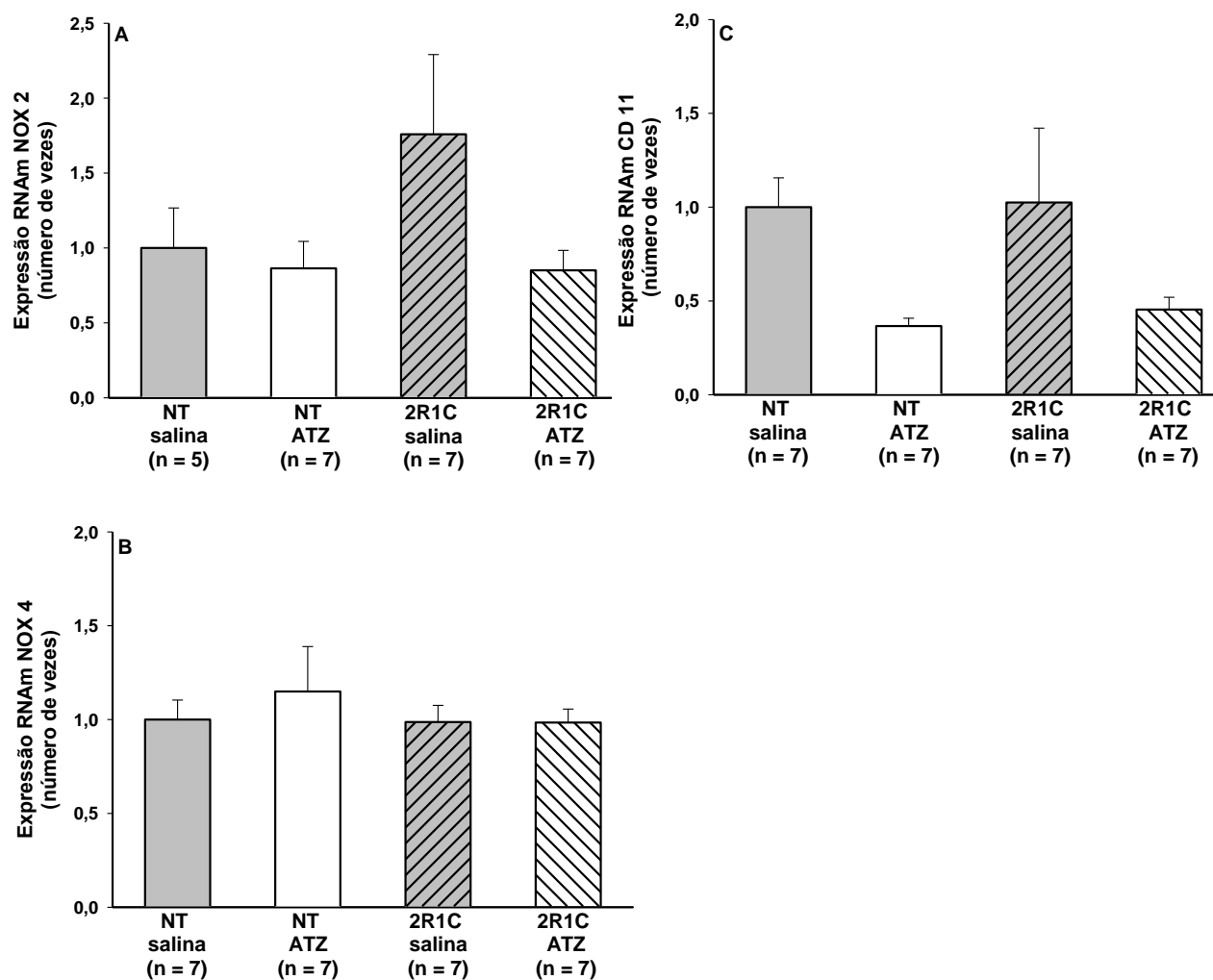


Figura 19: Expressão do RNAm no hipotálamo da (A) subunidade da NADPH oxidase NOX2 (NOX2), da (B) subunidade da NADPH oxidase NOX4 (NOX4) e do (C) marcador de ativação de micróglia (CD11) de animais normotensos (NT) e com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.5. Efeitos nas respostas barorreflexas em ratos normotensos e hipertensos tratados com injeções crônicas de ATZ

4.5.1. Efeitos do tratamento crônico de ATZ sc nas respostas barorreflexas em ratos normotensos e SHR

Em comparação com ratos normotensos tratados com salina sc, os SHR tratados com salina apresentaram um prejuízo da resposta taquicárdica (inclinação: SHR-salina: $-1,23 \pm 0,17$, vs. NT-salina: $-3,25 \pm 0,22$) [$F(3,20) = 13,13$; $p < 0,05$] em resposta a queda de PA promovida pelo NPS (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), sem modificações da resposta bradicárdica reflexa (inclinação: SHR-salina: $-0,74 \pm 0,044$, vs. NT-salina: $-0,63 \pm 0,05$) em resposta ao aumento de PA promovida pela fenilefrina (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Figura 20).

O tratamento com ATZ (600 mg/kg de peso corporal diariamente) sc por 9 dias em SHR não modificou as respostas reflexas taquicárdicas (inclinação SHR-ATZ: $-1,18 \pm 0,16$) ou bradicárdicas (inclinação SHR-ATZ: $-0,34 \pm 0,01$) em comparação com as mesmas respostas em SHR tratados com salina sc (Figura 20).

O tratamento com ATZ (600 mg/kg de peso corporal diariamente) sc por 9 dias em ratos normotensos produziu uma piora na resposta taquicárdica promovida pelo NPS (inclinação: NT-ATZ: $-1,89 \pm 0,31$), porém causou uma melhoria da resposta bradicárdica promovida pela fenilefrina (inclinação: NT-ATZ: $-1,15 \pm 0,08$) [$F(3,20) = 13,13$; $p < 0,05$] em comparação com as mesmas respostas em ratos normotensos tratados com salina (Figura 20).

* Diferente de NT-salina

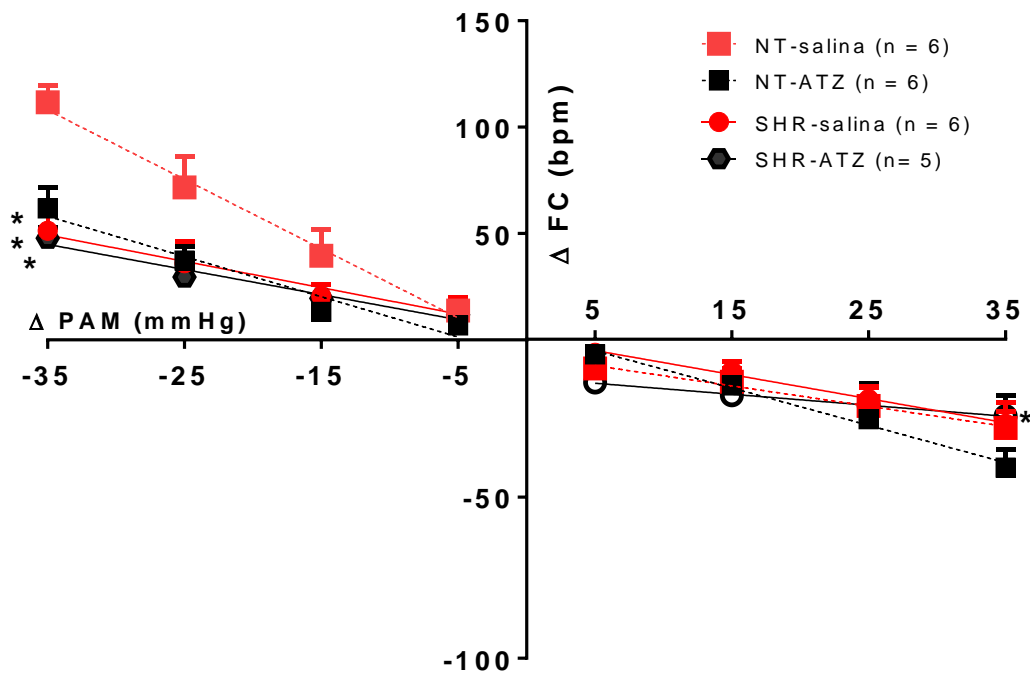


Figura 20: Função barorreflexa de ratos normotensos (NT) e SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc avaliada pelas injeções intravenosas de fenilefrina (5 µg/kg) e nitroprussiato de sódio (30 µg/kg). Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.

4.5.2. Efeitos do tratamento crônico de ATZ sc nas respostas barorreflexas em ratos normotensos e com hipertensão 2R1C

Em comparação com ratos normotensos tratados com salina sc, em ratos com hipertensão 2R1C tratados com salina sc não houve modificação das respostas reflexas taquicárdicas à ativação dos barorreceptores com NPS (30 µg/kg) (Figura 21). Porém, o tratamento com ATZ (600 mg/kg de peso corporal diariamente) sc por 9 dias em ratos com hipertensão 2R1C produziu uma piora na resposta taquicárdica promovida pelo NPS comparados aos ratos normotensos tratados com salina (inclinação: NT-salina: $-1,91 \pm 0,26$, vs. 2R1C-ATZ: $-0,66 \pm 0,09$) [$F(3,20) = 3,42$; $p < 0,05$].

Não houve diferença nas respostas bradicárdicas em resposta ao aumento de PA promovida pela fenilefrina (5 µg/kg) entre os grupos testados [$F(3,21) = 2,98$; $p > 0,05$] (Figura 21).

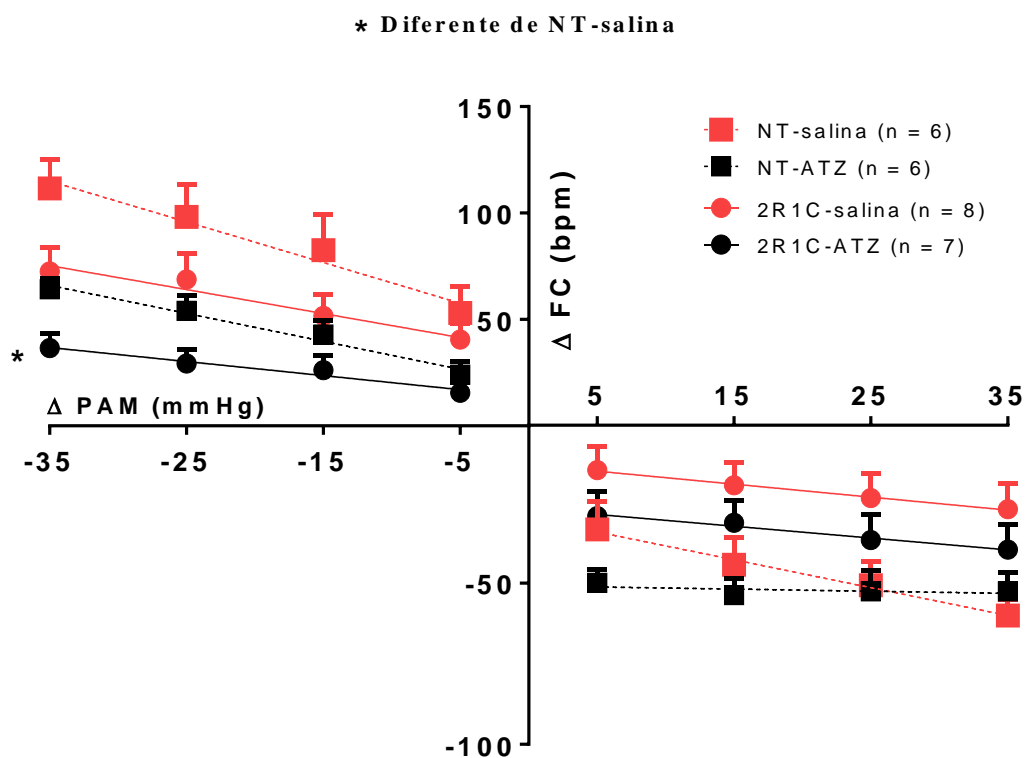


Figura 21: Função barorreflexa de ratos normotensos (NT) e 2R1C tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc avaliada pelas injeções intravenosas de fenilefrina (5 µg/kg) e nitroprussiato de sódio (30 µg/kg). Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.

4.6. Efeitos da injeção aguda de ATZ sc sobre as respostas pressoras da noradrenalina e angiotensina II injetada intravenosamente e sobre o bloqueio ganglionar em ratos normotensos e com hipertensão 2R1C

Este protocolo foi realizado para testar se a injeção aguda sc de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) modificaria as respostas pressoras da noradrenalina e da ANG II agindo diretamente em seus receptores nos vasos sanguíneos, ou seja, se o ATZ poderia prejudicar os mecanismos vasoconstritores por uma ação direta nos vasos sanguíneos, o que poderia excluir possíveis mecanismos centrais de atuação do ATZ para produzir efeitos anti-hipertensivos. O bloqueio ganglionar com hexametônio foi feito para se testar o nível de atividade do sistema nervoso simpático em ratos normotensos e com hipertensão 2R1C com e sem tratamento com ATZ.

A noradrenalina (1 nmol/0,1 ml) injetada iv age em receptores α_1 -adrenérgicos causando potente vasoconstrição e, conseqüentemente, aumento da PAM. Em ratos normotensos, a noradrenalina ocasionou um aumento de PAM (Δ nor: 51 ± 1 mmHg, vs. Δ salina: $-1,6 \pm 1$ mmHg) e conseqüente bradicardia (Δ nor: -94 ± 6 bpm, vs. Δ salina: $-9,6 \pm 8$ bpm), respostas estas que foram menores em ratos com hipertensão 2R1C: PAM (Δ nor: $28,5 \pm 2$ mmHg, vs. Δ salina: $-0,6 \pm 2$ mmHg) e conseqüente bradicardia (Δ nor: -19 ± 5 bpm, vs. Δ salina: 3 ± 6 bpm) [F(7,36)=3,162; $p < 0,05$]. A injeção aguda sc de ATZ não promoveu alterações nas respostas pressoras e bradicárdicas promovidas pela noradrenalina injetada iv antes da injeção de ATZ sc em ratos normotensos PAM (Δ nor: 43 ± 1 mmHg, vs. Δ salina: $0,2 \pm 1$ mmHg) e FC (Δ nor: -100 ± 8 bpm, vs. Δ salina: $3,4 \pm 4$ bpm) e com hipertensão 2R1C PAM (Δ nor: 31 ± 3 mmHg, vs. Δ salina: $2,5 \pm 1$ mmHg) e FC (Δ nor: -12 ± 4 bpm, vs. Δ salina: 3 ± 2 bpm) (Figura 22A e 22B).

A ANG II (50 ng/0,1 ml) injetada iv age em receptores AT1 causando potente vasoconstrição e, conseqüentemente, aumento da PAM. Em ratos normotensos, a ANG II ocasionou um aumento de PAM (Δ ANG II: 49 ± 1 mmHg, vs. Δ salina: $-1,6 \pm 1$ mmHg) e conseqüente bradicardia (Δ ANG II: -70 ± 4 bpm, vs. Δ salina: $9,6 \pm 7$ bpm), respostas estas que foram menores em ratos com hipertensão 2R1C: PAM (Δ ANG II: 35 ± 3 mmHg, vs. Δ salina: $-0,6 \pm 2$ mmHg) e conseqüente bradicardia (Δ ANG II: -17 ± 5 bpm, vs. Δ salina: 3 ± 6 bpm) [F(7,36)=3,945; $p < 0,05$]. A injeção aguda sc de ATZ não promoveu alterações nas respostas pressoras e bradicárdicas promovidas pela ANG II injetada iv antes da injeção de ATZ sc em ratos normotensos PAM (Δ ANG II: 42 ± 1 mmHg, vs. Δ salina: $0,2 \pm 1$ mmHg) e FC (Δ ANG II: -72 ± 4 bpm, vs. Δ salina: $3,4 \pm 4$ bpm) e com hipertensão 2R1C PAM (Δ

ANG II: 27 ± 3 mmHg, vs. Δ salina: $2,5 \pm 1$ mmHg) e FC (Δ ANG II: -25 ± 5 bpm, vs. Δ salina: 3 ± 2 bpm) (Figura 23A e 23B).

O hexametônio (30 mg/kg de peso corporal) injetado iv promove um bloqueio ganglionar utilizado então para analisar a contribuição do sistema nervoso simpático. Em ratos normotensos, a injeção iv de hexametônio promoveu uma queda da PAM (Δ Hexa: -49 ± 1 mmHg, vs. Δ salina: $2,6 \pm 1$ mmHg) e bradicardia (Δ Hexa: -27 ± 2 bpm, vs. Δ salina: 1 ± 3 bpm), respostas estas que foram maiores em ratos com hipertensão 2R1C PAM: (Δ Hexa: -106 ± 7 mmHg, vs. Δ salina: $-1,8 \pm 1$ mmHg) e bradicardia (Δ Hexa: -55 ± 2 bpm, vs. Δ salina: $-3,5 \pm 3$ bpm). A injeção sc de ATZ não alterou estas respostas em animais normotensos PAM (Δ Hexa: -45 ± 1 mmHg, vs. Δ salina: $0,2 \pm 1$ mmHg) e bradicardia (Δ Hexa: -28 ± 4 bpm, vs. Δ salina: $3,4 \pm 4$ bpm), contudo em ratos com hipertensão 2R1C houve uma diminuição na resposta depressora e bradicardica após a injeção sc de ATZ PAM: (Δ Hexa: -58 ± 5 mmHg, vs. Δ salina: $2,5 \pm 1$ mmHg) [$F(3,18) = 6,614$; $p < 0,05$] e bradicardia (Δ Hexa: -25 ± 5 bpm, vs. Δ salina: 3 ± 3 bpm) [$F(3,18) = 3,716$; $p < 0,05$] (Figura 24A e 24B).

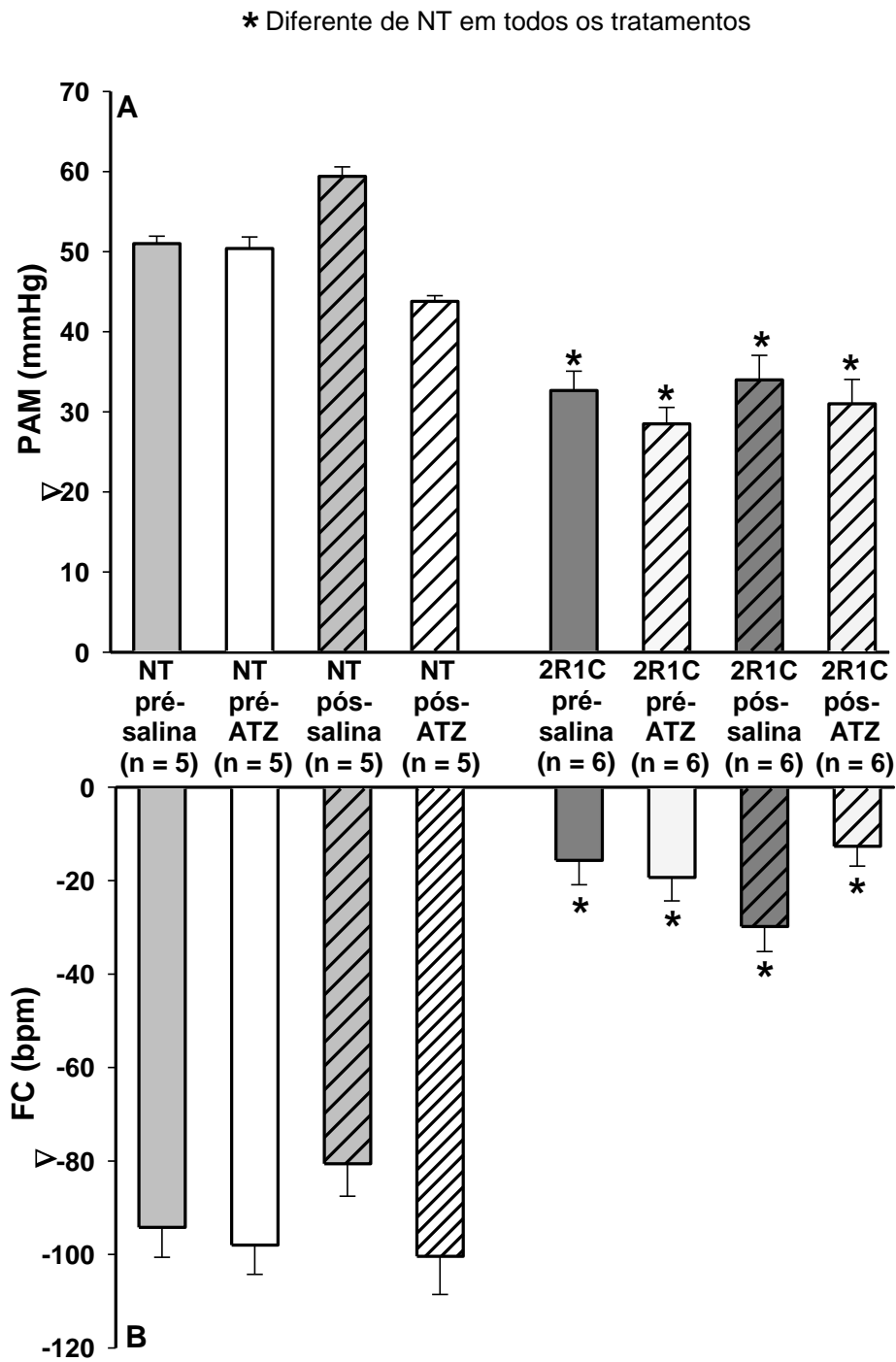


Figura 22: Modificações da (A) PAM e (B) FC induzidas por injeções intravenosas (iv) de noradrenalina (1 nmol/0,1 ml) pré e pós-injeção de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc em ratos normotensos (NT) e ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

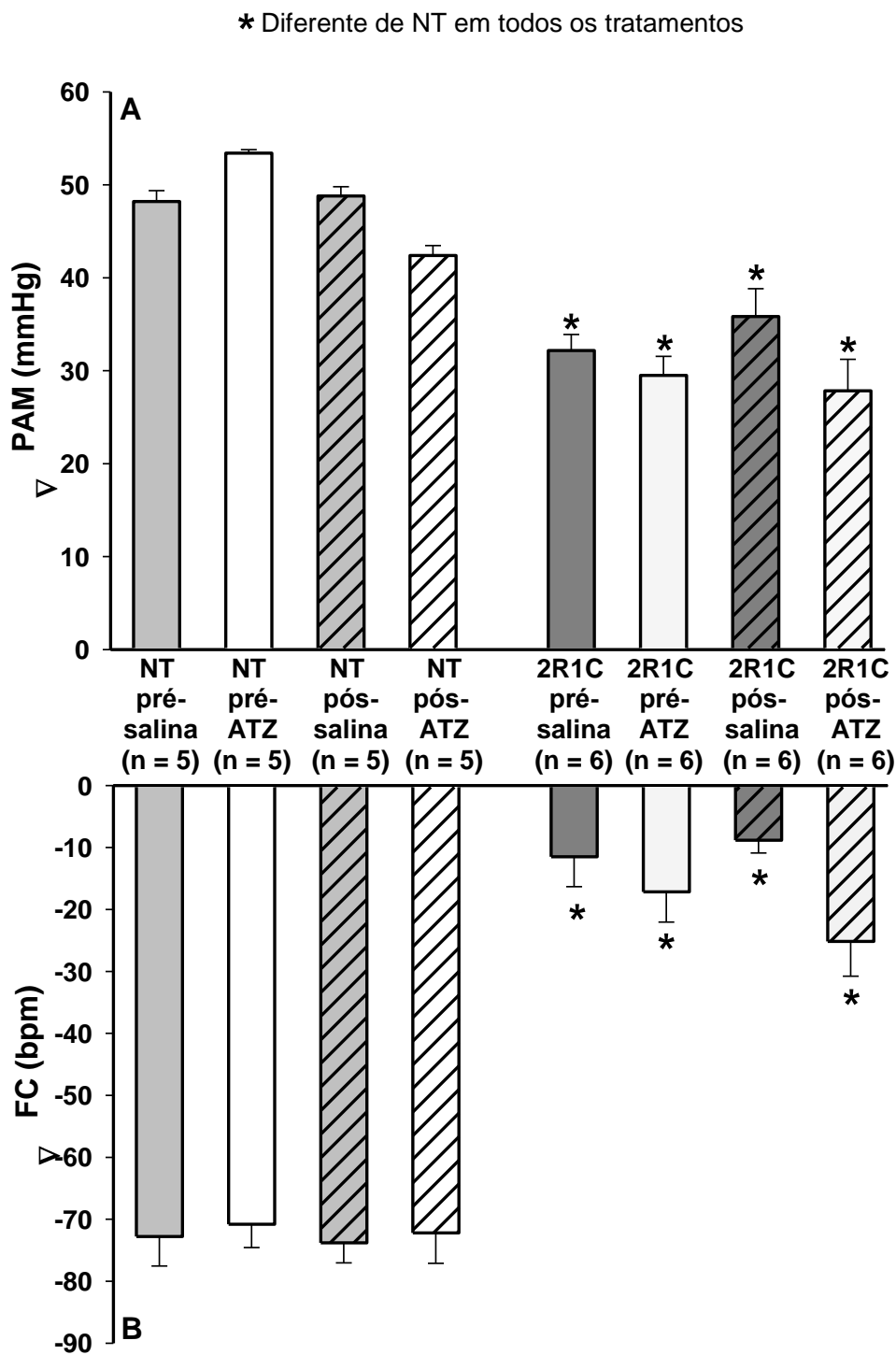


Figura 23: Modificações da (A) PAM e (B) FC induzidas por injeções intravenosas (iv) de angiotensina II (50 ng/0,1 ml) pré e pós-injeção de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc em ratos normotensos (NT) e ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

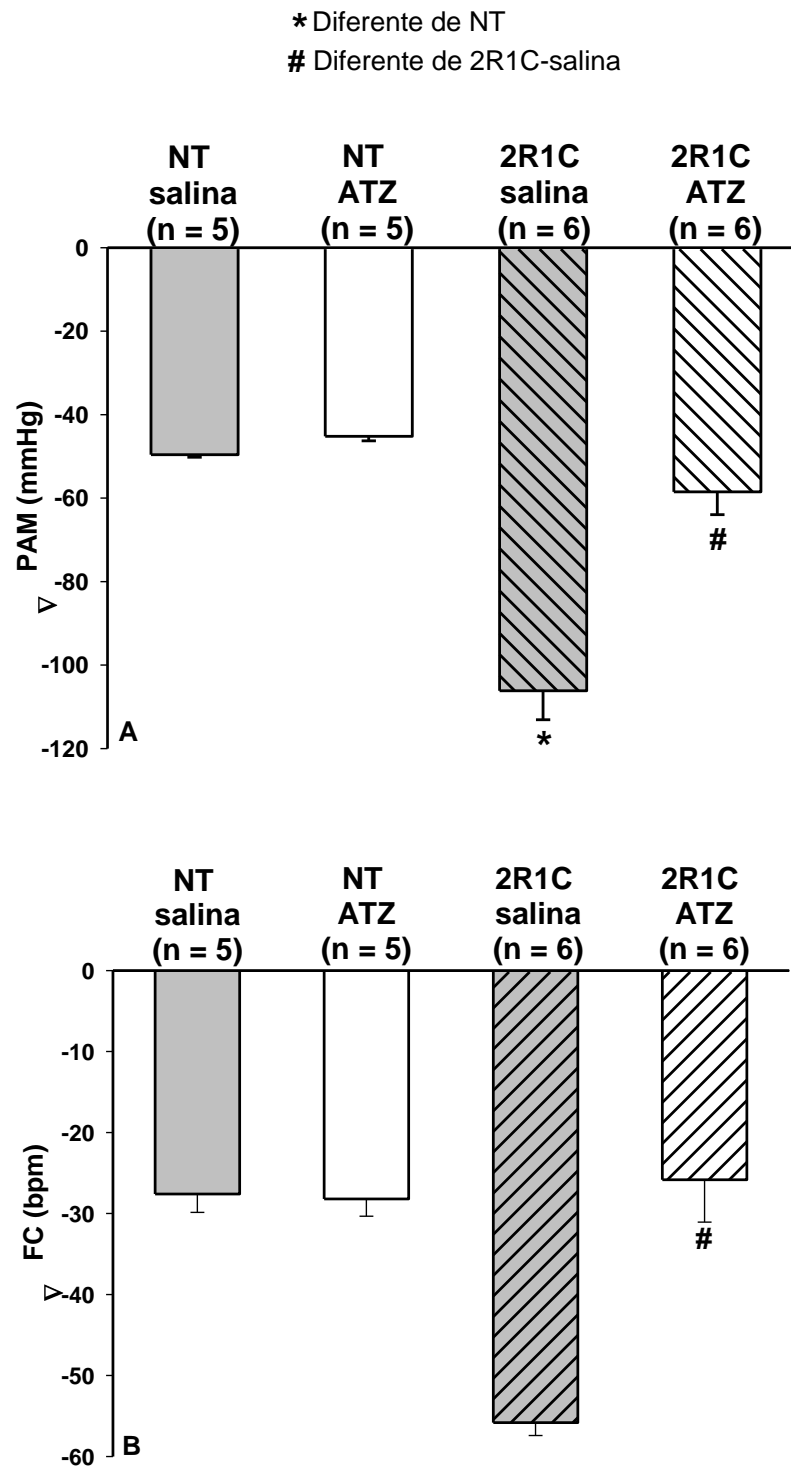


Figura 24: Modificações da (A) PAM e (B) FC após o bloqueio ganglionar com injeção intravenosa (iv) de hexametônio (30 mg/kg de peso corporal) pós-injeção de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc em ratos normotensos (NT) e com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.7. Efeitos do tratamento com injeção crônica de ATZ sc na ingestão de água e alimento e peso corporal de ratos normotensos e hipertensos

4.7.1. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na ingestão de água, de alimento e peso corporal em ratos normotensos

O tratamento com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc por 8 dias em ratos normotensos não induziu alterações significativas na ingestão diária de água [$F(1,13) = 2,89$; $p > 0,05$] (Figura 25A). Já a ingestão de alimento aumentou significativamente no decorrer do protocolo experimental conforme os animais foram se habituando as gaiolas metabólicas e a mudança da ração de pellets para ração em pó, no entanto não houve diferença entre os grupos experimentais [$F(1,112) = 0,12$; $p > 0,05$] (Figura 25B). Com relação ao peso corporal, também não houve diferença significativa entre os grupos experimentais [$F(1,112) = 6,42$; $p > 0,05$] embora o peso corporal de cada grupo tenha aumentado significativamente ao final do protocolo experimental (Figura 25C).

O tratamento com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) sc por 8 dias em ratos normotensos também não produziu modificações significativas na ingestão diária de água em comparação com os ratos tratados com salina [$F(1,104) = 0,55$; $p > 0,05$] (Figura 25D). Já o grupo tratado com ATZ sc apresentou uma diminuição na ingestão de alimento nos dias 6 e 7 de tratamento [$F(12,1) = 10,04$; $p < 0,001$] (Figura 25E). Com relação ao peso corporal, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais [$F(1,104) = 2,65$; $p > 0,05$], contudo o peso corporal de cada grupo aumentou significativamente ao final do protocolo experimental (Figura 25F).

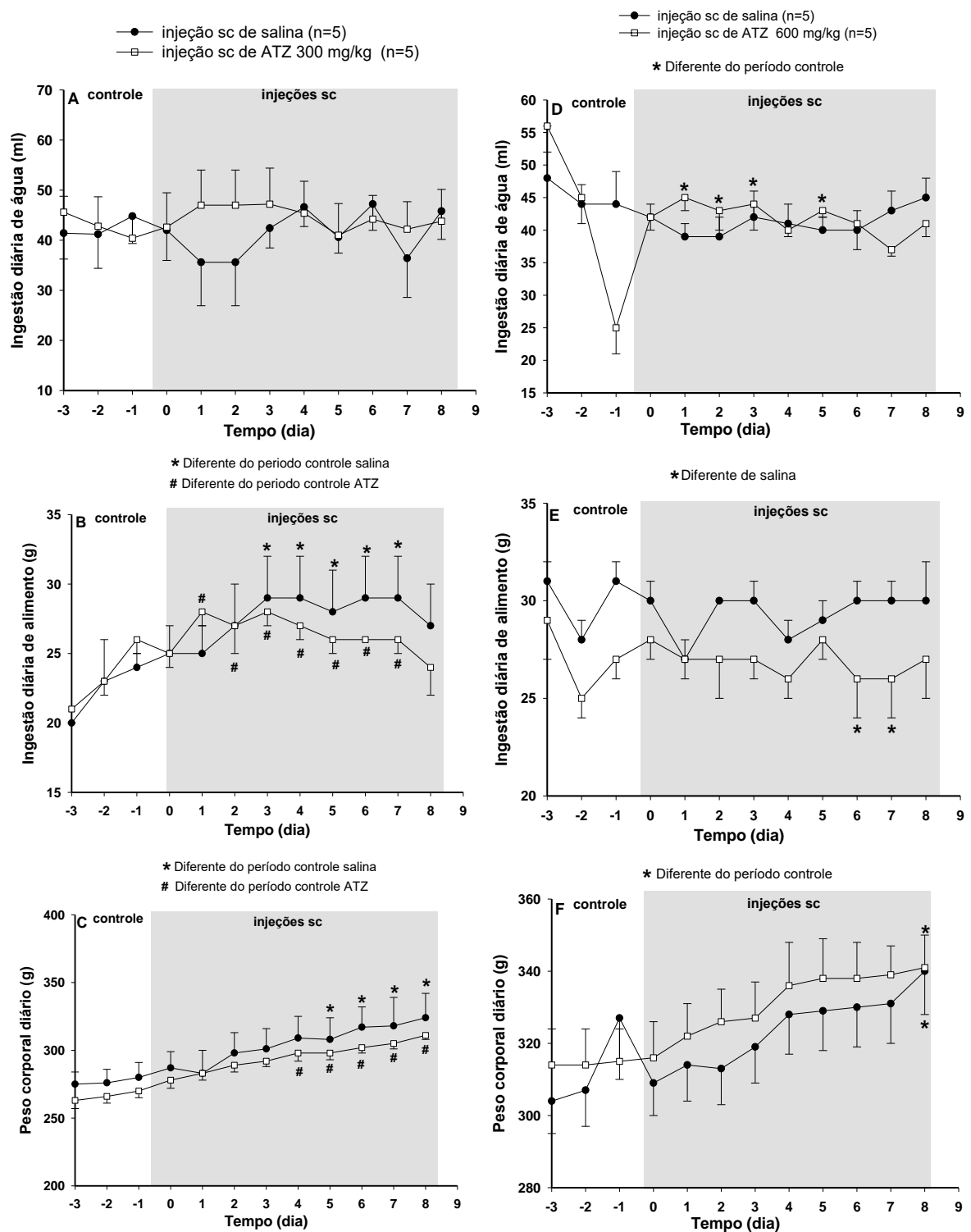


Figura 25: (A) ingestão diária de água, (B) ingestão diária de alimento, (C) peso corporal de ratos normotensos tratados cronicamente com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc e (D) ingestão diária de água, (E) ingestão diária de alimento, (F) peso corporal de ratos normotensos tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.

4.7.2. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ no volume urinário e excreção de Na^+ e K^+ em ratos normotensos

Os ratos normotensos tratados com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc apresentaram um volume urinário maior durante todo protocolo experimental com relação ao grupo tratado com salina sc no mesmo período [$F(1,13) = 14,45$; $p < 0,05$] (Figura 26A). Com relação excreção diária de Na^+ , houve um aumento da excreção de Na^+ em ambos os grupos tratados (ATZ e salina) sc nos dias 4, 5 e 7 com relação ao período controle [$F(1, 13) = 3,12$; $p < 0,001$], sem haver diferença entre os grupos tratados com ATZ ou salina (Figura 26B). Houve um aumento na excreção diária de K^+ nos animais tratados com salina sc nos dias 3, 4, 5, 6 e 7 com relação ao período controle [$F(13,1) = 4,65$; $p < 0,001$], sem haver também diferença entre os grupos tratados (Figura 26C).

O tratamento com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) sc por 8 dias em ratos normotensos apresentou uma redução do volume urinário no dia 7 com relação 1º dia de tratamento com injeções sc tanto no grupo salina quanto no grupo tratado com ATZ [$F(12,1) = 2,84$; $p < 0,05$] (Figura 26D). Porém, com relação à excreção diária de Na^+ e K^+ , estas não foram alteradas pelos tratamentos com ATZ sc [$F(1,12) = 0,69$; $p > 0,05$], [$F(1,12) = 0,38$; $p > 0,05$] (figuras 26E e 26F).

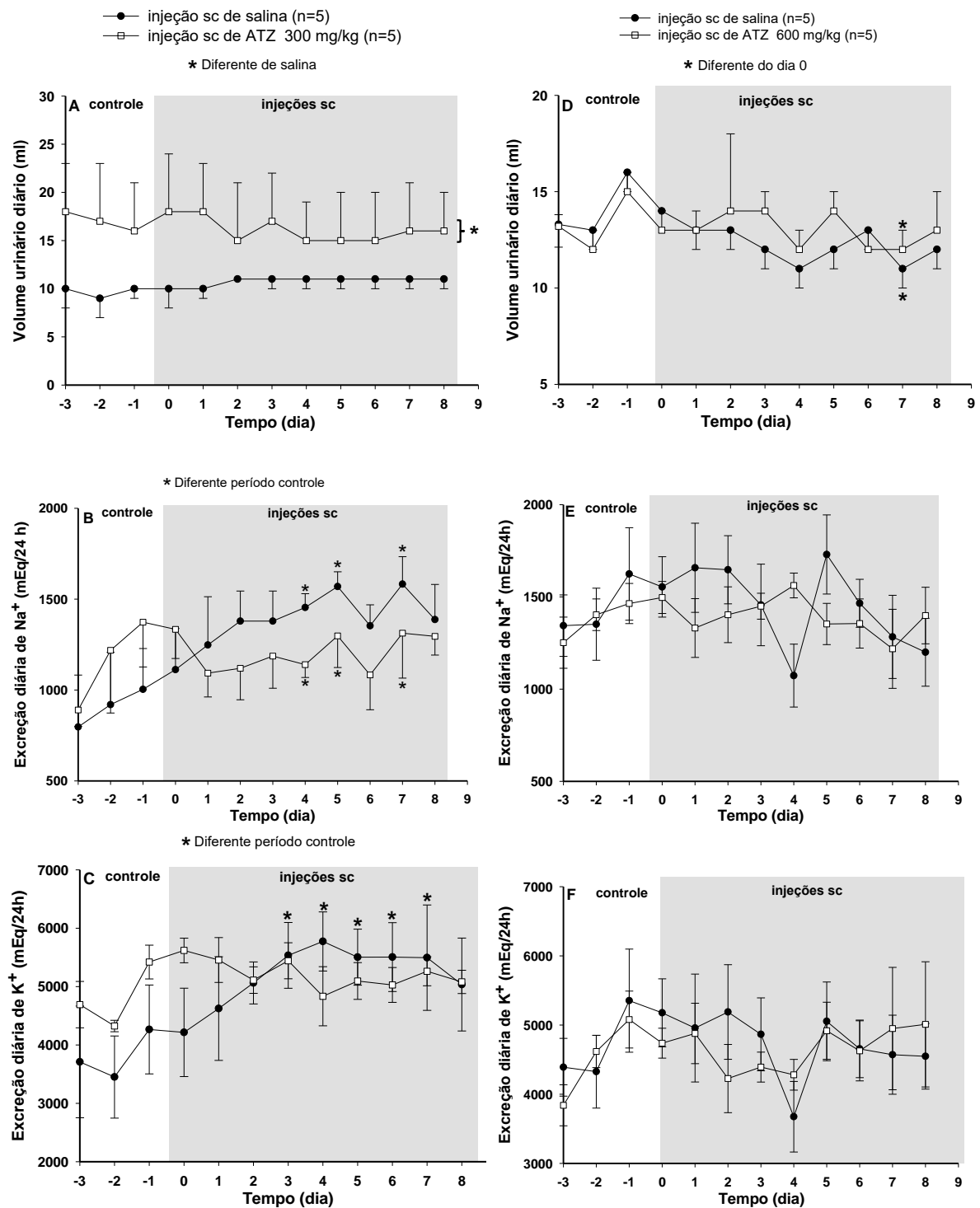


Figura 26: (A) volume urinário diário, (B) excreção diária de Na⁺, (C) excreção diária de K⁺ de ratos normotensos tratados cronicamente com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc e (D) volume urinário diário, (E) excreção diária de Na⁺, (F) excreção diária de K⁺ de ratos normotensos tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.

4.7.3. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na ingestão de água, de alimento e peso corporal em ratos SHR

O tratamento com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc por 8 dias em ratos SHR não induziu alterações significativas na ingestão diária de água [$F(1,96) = 0,18; p > 0,05$] (Figura 27A), bem como na ingestão de alimento [$F(1,96) = 0,28; p > 0,05$] (Figura 27B). Com relação ao peso corporal, o grupo tratado com ATZ sc apresentou peso corporal maior que o grupo tratado com salina durante todo o protocolo experimental [$F(11,96) = 0,013; p > 0,05$] (Figura 27C).

O tratamento com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) ou salina sc por 8 dias em ratos SHR apresentou uma diminuição da ingestão de água com relação ao período controle [$F(11,120) = 2,33, p < 0,05$] (Figura 27D). Já com relação à ingestão de alimento, não houve diferença significativa entre os grupos tratados [$F(11,120) = 1,36; p > 0,05$] (Figura 27E). Com relação ao peso corporal, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais [$F(1,120) = 0,56; p > 0,05$] (Figura 27F).

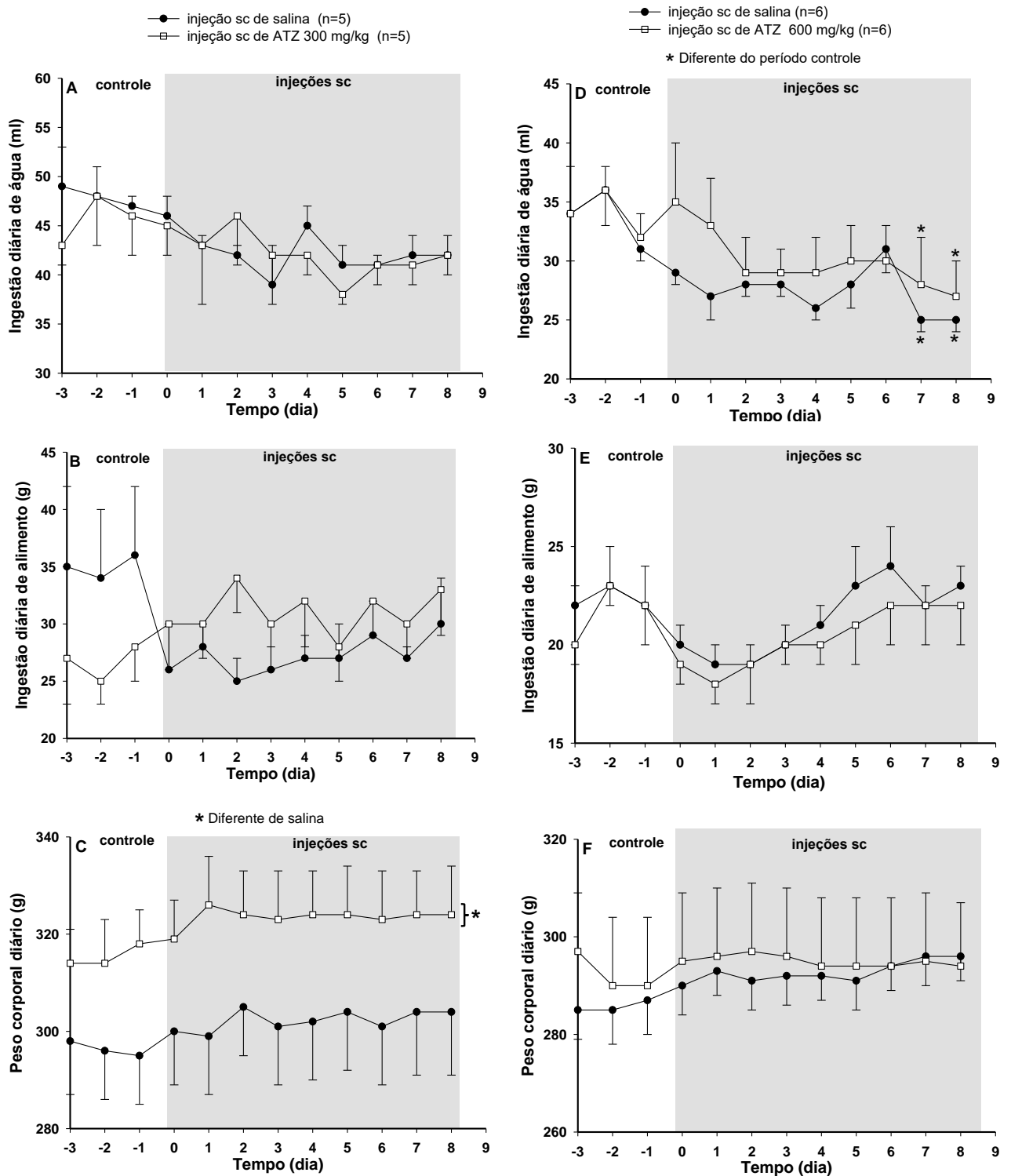


Figura 27: (A) ingestão diária de água, (B) ingestão diária de alimento, (C) peso corporal de ratos SHR tratados cronicamente com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc e (D) ingestão diária de água, (E) ingestão diária de alimento, (F) peso corporal de ratos SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.

4.7.4. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ no volume urinário e excreção de Na^+ e K^+ em ratos SHR

Os ratos SHR tratados com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc apresentaram um volume urinário maior durante os dias 0, 2, 6 e 8 com relação ao grupo tratado com salina sc [$F(11,96) = 46,79$; $p < 0,05$] (Figura 28A). Com relação à excreção diária de Na^+ não houve alterações significativas entre ambos os grupos tratados (ATZ e salina) [$F(1, 96) = 3,25$; $p > 0,05$] (Figura 28B). Já com relação à excreção diária de K^+ também não houve alterações significativas nos ratos tratados com ATZ sc quando comparados com os animais tratados com salina sc [$F(1,96) = 0,09$; $p > 0,05$] (Figura 28C).

O tratamento com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) sc por 8 dias em ratos SHR apresentou um aumento no volume urinário nos dias 1, 2, 4, 6 com relação ao grupo salina [$F(11,112) = 56,11$; $p < 0,001$] (Figura 28D). Com relação à excreção diária de Na^+ foi observado um aumento da excreção de Na^+ com o tratamento de ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) no dia 4 com relação ao início do tratamento com ATZ e um aumento da excreção Na^+ nos dias 5 com relação ao dia 2 com o tratamento de salina [$F(11,120) = 4,39$; $p < 0,05$] (figura 28E). Já com relação à excreção diária de K^+ , foram observadas diferenças significativas nos dias 0, 1, e 2 com relação ao 4º dia no grupo tratado com salina [$F(11,120) = 3,57$; $p < 0,05$] (figura 28F).

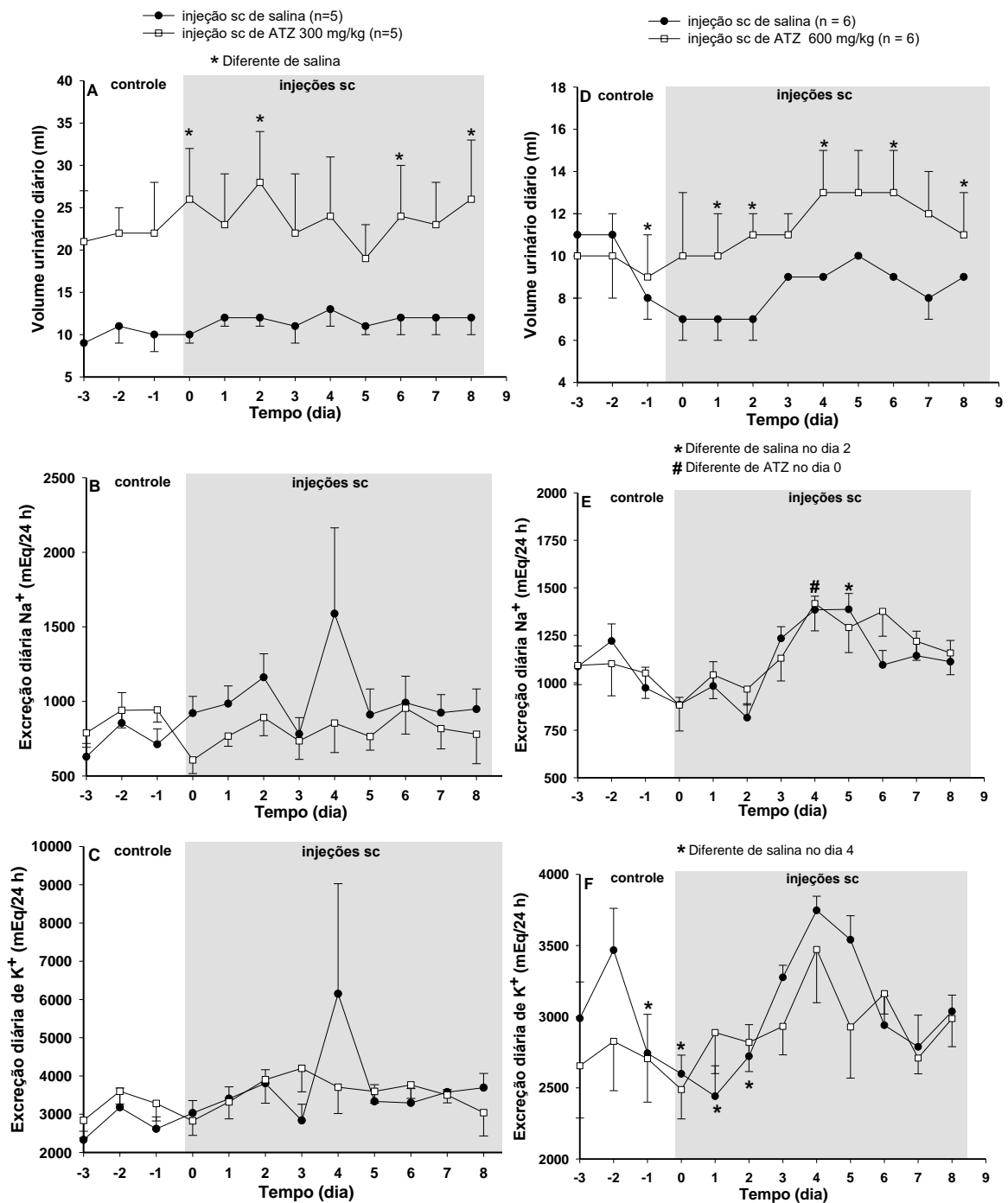


Figura 28: (A) volume urinário diário, (B) excreção diária de Na⁺, (C) excreção diária de K⁺ de ratos SHR tratados cronicamente com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc e (D) volume urinário diário, (E) excreção diária de Na⁺, (F) excreção diária de K⁺ de ratos SHR tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.

4.7.5. Efeitos do tratamento crônico com injeções sc de ATZ na ingestão de água, de alimento e peso corporal em ratos com hipertensão 2R1C

O tratamento com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc por 8 dias em ratos com hipertensão 2R1C não induziu alterações significativas na ingestão diária de água [F(1,130) = 0,01; $p = 0,91 > 0,05$] (Figura 29A), bem como na ingestão de alimento [F(1,132) = 0,003; $p > 0,05$] (Figura 29B). Com relação ao peso corporal, os animais do grupo tratado com ATZ apresentaram um menor peso corporal com relação ao grupo tratado com salina nos dias -2, -1, 0 e 1 [F(1,132) = 30,45; $p < 0,05$] (Figura 29C).

O tratamento com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) sc por 8 dias em ratos com hipertensão 2R1C apresentou uma diminuição da ingestão de água com relação ao grupo salina no dia 8, enquanto que o grupo tratado com salina sc apresentou uma tendência a aumentar sua ingestão de água após o dia 3 [F(1,228) = 5,56, $p = 0,019$] (Figura 29D). Já com relação à ingestão de alimento, houve uma redução da ingestão de alimento no grupo tratado com ATZ no primeiro dia de tratamento com relação ao grupo tratado com salina [F(1,228) = 5,10; $p < 0,05$] (Figura 29E). Com relação ao peso corporal, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais [F(1,228) = 2,60; $p > 0,05$] (Figura 29F).

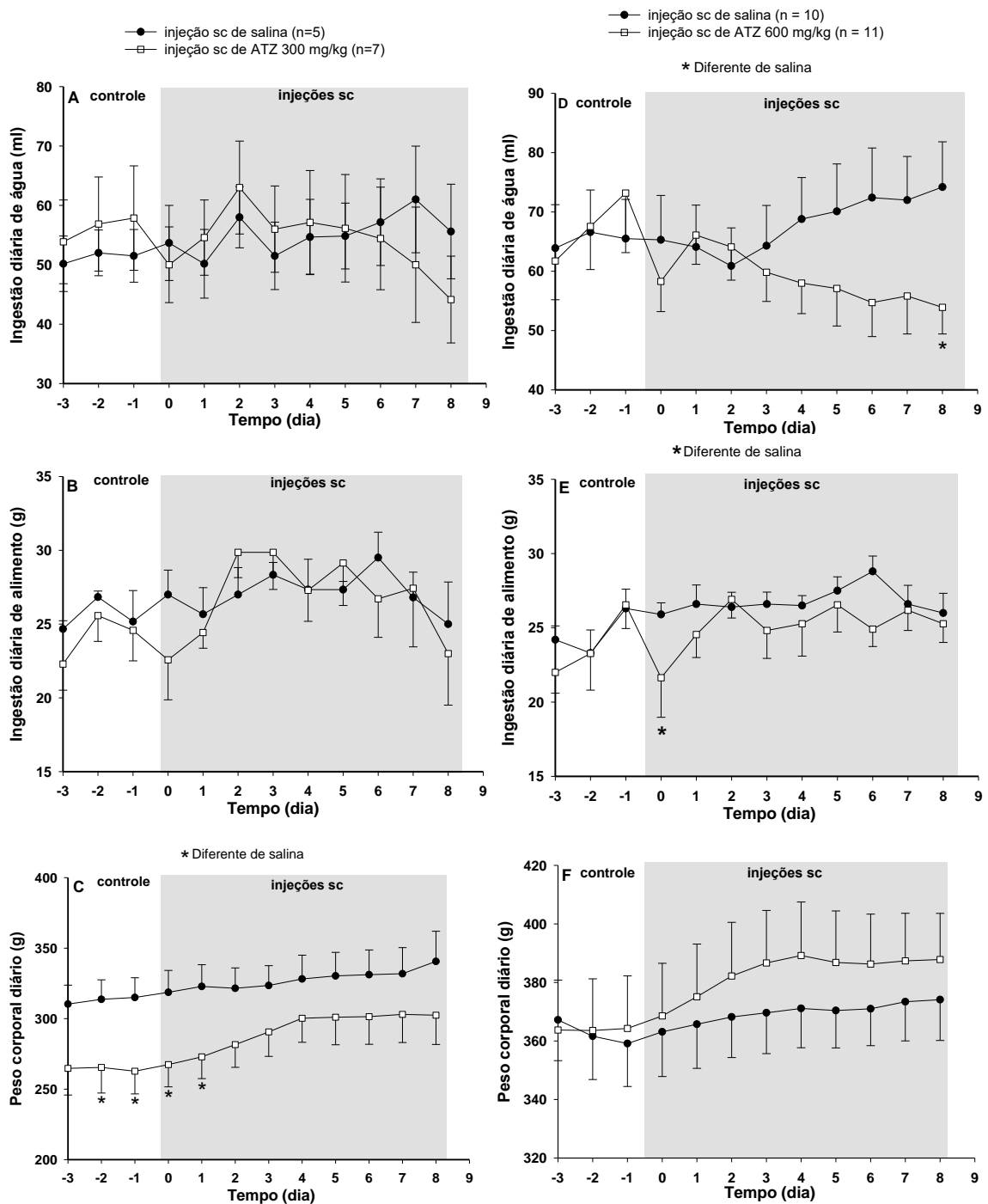


Figura 29: (A) ingestão diária de água, (B) ingestão diária de alimento, (C) peso corporal de ratos com hipertensão 2RIC tratados cronicamente com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc e (D) ingestão diária de água, (E) ingestão diária de alimento, (F) peso corporal de ratos com hipertensão 2RIC tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.7.6. Efeito do tratamento crônico com injeções sc de ATZ no volume urinário e excreção de Na^+ e K^+ em ratos com hipertensão 2R1C

Os ratos 2R1C tratados com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) sc não apresentaram diferença significativa no volume urinário com relação ao grupo tratado com salina [$F(1,132) = 0,40$; $p > 0,05$] (Figura 30A). Com relação à excreção diária de Na^+ , houve uma diminuição da excreção de Na^+ no grupo tratado com ATZ no primeiro dia de tratamento com ATZ sc quando comparado ao grupo tratado com salina sc [$F(1, 60) = 8,42$; $p > 0,05$] (Figura 30B). Já com relação à excreção diária de K^+ não houve alterações significativas na excreção de K^+ nos animais tratados com ATZ quando comparados com os animais tratados com salina [$F(1,60) = 1,98$; $p > 0,05$] (Figura 30C).

O tratamento com ATZ (600 mg/kg dadas em duas doses de 300 mg/kg de peso corporal diárias) sc por 8 dias em ratos com hipertensão 2R1C não apresentou alterações significativas no volume urinário com relação ao grupo salina [$F(1,228) = 0,87$; $p > 0,05$] (Figura 30D). Com relação à excreção diária de Na^+ não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados com ATZ e salina sc [$F(11,203) = 3,63$; $p > 0,05$] (figura 30E). Já com relação à excreção diária de K^+ , o tratamento com ATZ sc promoveu um aumento na excreção diária de K^+ nos dia 3 com relação ao grupo tratado com salina [$F(1,240) = 0,033$; $p < 0,05$] (Figura 30F).

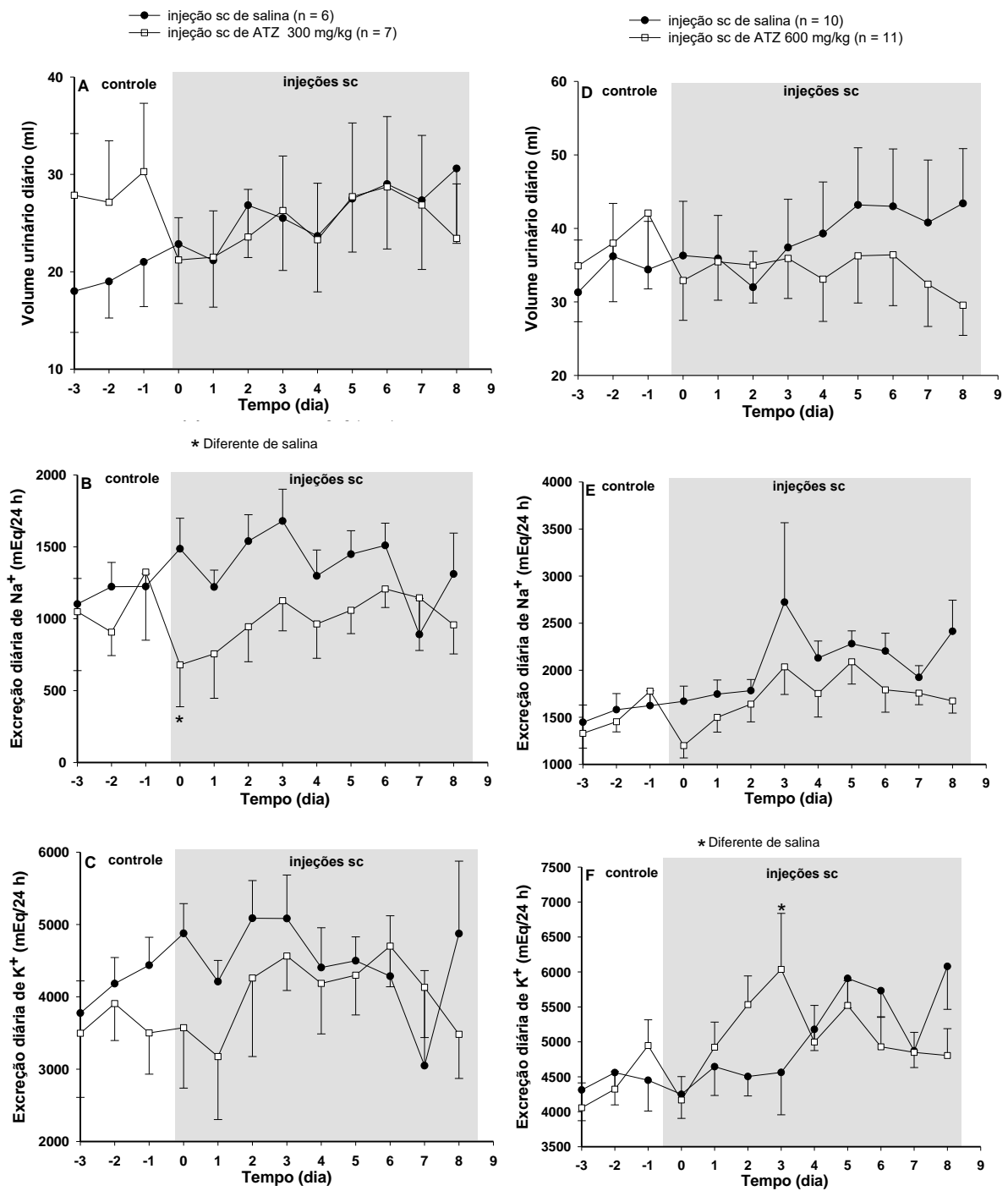


Figura 30: (A) volume urinário diário, (B) excreção diária de Na⁺, (C) excreção diária de K⁺ de ratos com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (300 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc e (D) volume urinário diário, (E) excreção diária de Na⁺, (F) excreção diária de K⁺ de ratos com hipertensão 2R1C tratados cronicamente com ATZ (600 mg/kg de peso corporal) ou salina (1 ml/kg de peso corporal) sc. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.

5. DISCUSSÃO

Os principais achados desta tese encontram-se resumidos na tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Resumo das principais respostas obtidas após injeções agudas ou crônicas de ATZ em ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2R1C

Respostas	Normotensos	SHR	2R1C
PAM (aguda)	Não altera	↓	↓
FC (aguda)	Não altera	↓	↓
PAM (crônica)	-	↓	↓
FC (crônica)	-	Não altera	Não altera
LF (PAS)	Não altera	↓	↓
LF (IP)	Não altera	↓	↓
HF (IP)	Não altera	↑	↑
LF/HF	Não altera	↓	↓
ANSr	-	-	↓
RNA _m IL-6	Não altera	↓	↓
RNA _m TNF- α	Não altera	Não altera	↓
RNA _m AT1r	Não altera	↓	↓
RNA _m NOX2	Não altera	↓	Não altera
RNA _m CD11	Não altera	↓	Não altera
Barorreflexo	↓	Não altera	↓
Δ PA noradrenalina iv	Não altera	-	Não altera
Δ PA angiotensina II iv	Não altera	-	Não altera
Δ PA hexametônio iv	Não altera	-	↓
Ingestão de água	Não altera	Não altera	↓
Ingestão de alimento	Não altera	Não altera	Não altera
Peso corporal	Não altera	Não altera	Não altera
Volume urinário	Não altera	Não altera	Não altera
Excreção Na ⁺	Não altera	Não altera	Não altera
Excreção K ⁺	Não altera	Não altera	Não altera

ATZ (300 mg/kg de peso corporal em injeção única ou 600 mg/kg de peso corporal/dia por 9 dias). LF (PAS) - índice da modulação simpática vasomotora; LF (IP) - índice da modulação simpática cardíaca; HF (IP) – modulação parassimpática; LF/HF – balanço simpato-vagal.

Os resultados apresentados demonstraram que a inibição da catalase pela injeção de ATZ sc (300 mg/kg de peso corporal) agudamente foi capaz de diminuir a PAM de SHR e com hipertensão renovascular do tipo 2R1C, enquanto que nos ratos normotensos, a injeção sc de ATZ não promoveu nenhuma alteração consistente na PAM. Um efeito hipotensor significativo inicia-se 1 hora e meia após a injeção sc da dose de 300 mg/kg de ATZ nos SHR e 1 hora após a injeção nos animais com hipertensão 2R1C, perdurando estes efeitos em ambos os tipos de hipertensão por pelo menos 4 horas. Juntamente com a queda da PAM também foi verificada queda da FC nos SHR e ratos 2R1C. A partir destes resultados concluiu-se que seria mais adequado utilizar duas injeções sc de ATZ, totalizando uma dose diária de 600 mg/kg de peso corporal (ou seja, duas injeções de 300 mg/kg de peso corporal com um intervalo de aproximadamente 12 horas entre elas) injetadas sc, pois assim haveria maior segurança de que a pressão arterial seria mantida baixa pelo maior tempo possível nos experimentos crônicos.

A dose de ATZ de 600 mg/kg de peso corporal cronicamente produziu uma queda da PAM nos animais 2R1C e SHR ao longo dos dias de tratamento, sendo esta queda mais pronunciada ao final dos 9 dias de tratamento. Entretanto, neste tratamento, não observamos variações consistentes na FC como observadas com a injeção aguda nos animais 2R1C e SHR. Visto que tanto a injeção aguda quanto o tratamento crônico com ATZ sc foram capazes de diminuir a PAM dos animais hipertensos, sem alterar a PAM dos animais normotensos, os estudos foram direcionados na tentativa de desvendar os possíveis mecanismos pelos quais a inibição da catalase pelas injeções de ATZ sc agudamente ou cronicamente produziam redução da PAM nos animais 2R1C e SHR.

Uma das primeiras abordagens foi realizar uma análise indireta da atividade simpática, um dos importantes sistemas que controlam e influenciam a pressão arterial. Utilizando-se da análise espectral da pressão arterial pulsátil, verificamos o que ocorria na variabilidade cardiovascular como consequência das alterações nas modulações simpática e parassimpática em ratos normotensos, SHR e com hipertensão 2R1C. Em comparação com os ratos normotensos, animais 2R1C e SHR apresentaram aumento da modulação simpática da PAS (um índice da atividade simpática vasomotora) (DEBOER; KAREMAKER; STRACKEE, 1987), da modulação simpática do IP (um índice da atividade simpática cardíaca), diminuição da modulação parassimpática do IP e um aumento do balanço simpato-vagal (CERUTTI et al., 1991; PAGANI et al., 1986). O tratamento crônico com ATZ sc (600 mg/kg de peso corporal) reverteu estas alterações, reduzindo a modulação simpática tanto vasomotora quanto

cardíaca, aumentando a modulação parassimpática e melhorando o balanço simpato-vagal dos SHR e dos ratos com hipertensão 2R1C. Porém, o tratamento crônico com ATZ sc não afeta estes parâmetros nos animais normotensos, demonstrando que o aumento dos níveis de H_2O_2 pela inibição da catalase interfere em mecanismos específicos envolvidos na hipertensão. Este reestabelecimento da modulação simpática/parassimpática pode explicar em parte a diminuição da PAM dos animais hipertensos tratados cronicamente com ATZ.

Para se confirmar os resultados da análise da variabilidade cardiovascular e buscar quais porções do simpático estariam sendo mais atingidas pelas ações simpatolíticas do ATZ foi feito o registro da atividade simpática dos nervos renal e esplâncnico em animais com hipertensão 2R1C anestesiados. De forma interessante, a injeção aguda sc de ATZ (300 mg/kg de peso corporal) nos ratos com hipertensão 2R1C anestesiados diminuiu a PAM (corroborando com o achado em animais não anestesiados) e também diminuiu substancialmente a atividade nervosa simpática do nervo renal. Porém, a atividade nervosa simpática do nervo esplâncnico não foi alterada de forma consistente pelo tratamento com ATZ sc agudamente. Estes resultados sugerem que a queda de PAM observada se deve principalmente a redução de atividade nervosa simpática renal com poucas modificações da atividade simpática esplâncnica. Porém, estes resultados não permitem que se exclua a redução da atividade simpática do nervo esplâncnico como um dos possíveis mecanismos envolvidos na redução da PAM em ratos hipertensos tratados cronicamente com ATZ.

Um aumento da modulação simpática e do balanço simpato-vagal em contrapartida a uma diminuição da modulação parassimpática que se inicia após colocação do clipe de prata na artéria renal dos ratos e se estabelece após 3 a 4 semanas após a clipagem já foi demonstrado em estudos anteriores (OLIVEIRA-SALES et al., 2014). Estas alterações da modulação simpática/parassimpática coincidem com o aumento gradual da PAM que culminam no estado hipertensivo dos ratos 2R1C. Assim como no modelo de hipertensão 2R1C também nos SHRs há uma ativação do sistema renina-angiotensina, com uma maior produção de ANG II. ANG II atuando em áreas centrais importantes para o controle cardiovascular promove simpatoexcitação, comprometimento do barorreflexo e vasoconstrição periférica. Os presentes resultados demonstraram que o tratamento crônico com ATZ sc promove uma melhora na modulação simpática/parassimpática e uma redução da atividade nervosa renal que pode ser devido a um prejuízo das ações da ANG II em áreas centrais como, por exemplo, no PVN ou RVL dos ratos 2R1C e SHR. Os resultados mostrando queda simultânea da PAM e da atividade simpática também reforçam uma ação

central do ATZ para reduzir a atividade simpática, possivelmente por interferir nos mecanismos ativados pela ANG II agindo centralmente. Como descrito por Guyenet em 2006, o PVN é um importante centro integrativo localizado no hipotálamo para onde convergem sinais de outras áreas hipotalâmicas, bulbares e prosencefálicas envolvidas na regulação de fluidos e metabolismo corporais, respostas imunes, termorregulação e controle da atividade simpática. Na porção parvocelular do PVN estão localizados neurônios autonômicos pré-simpáticos que utilizam uma combinação de glutamato e peptídeos como neurotransmissores (por exemplo, vasopressina, ocitocina e CRF) intervindo áreas bulbares como o NTS e o RVL além da medula espinhal controlando preferencialmente os eferentes simpáticos renais [revisado em (GUYENET, 2006)].

Há vários trabalhos na literatura descrevendo que tanto nos SHRs quanto nos ratos com hipertensão 2R1C ocorre um prejuízo da função barorreflexa (BLANCH et al., 2014; BRODY; O'NEILL; PORTER, 1984; HAEUSLER; FINCH; THOENEN, 1972; JUDY et al., 1976; MOREIRA et al., 2009; MORI, 1973) como resposta ao aumento e sustentação da PAM elevada. Trabalhos anteriores demonstraram que em SHR ou com hipertensão 2R1C que tiveram a superexpressão do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) no NTS houve melhora da função barorreflexa (BARBOSA et al., 2017; FREIRIA-OLIVEIRA et al., 2013). Ratos como em ratos com hipertensão 2R1C também apresentaram uma melhora na função barorreflexa após a superexpressão de receptores AT2 (que resulta no aumento do sistema protetor do sistema renina-angiotensina) no NTS (BLANCH et al., 2014). Contudo, os presentes resultados mostraram que o tratamento crônico com ATZ sc não foi capaz de melhorar o comprometimento do barorreflexo nos animais hipertensos. Além disso, de forma inesperada, o tratamento crônico com ATZ promoveu uma piora na resposta taquicárdica induzida pela injeção iv de NPS tanto nos animais normotensos, quanto nos animais com hipertensão 2R1C. Uma possível explicação para tal resultado pode ser o fato do aumento do H₂O₂ endógeno produzido pela inibição da catalase agir em regiões bulbares que controlam a FC. Trabalhos de Cardoso e cols demonstraram que a injeção de H₂O₂ no 4° ventrículo produz uma resposta pressora e bradicárdica muito provavelmente por ativar neurônios de outras áreas como núcleo ambiguous (NA) e/ou região RVL (MÁXIMO CARDOSO et al., 2006). Além disso, injeção de H₂O₂ no NTS produziu uma bradicardia intensa acompanhada de um efeito bifásico sobre a PA, que foi uma hipotensão intensa inicialmente seguida por uma resposta pressora moderada (CARDOSO et al., 2009). Esses resultados sugerem que o H₂O₂ no 4° ventrículo ou no NTS é capaz de evocar uma resposta semelhante ao aumento de

atividade do barorreflexo podendo inclusive envolver a ativação das mesmas vias. No caso da taquicardia em resposta ao NPS, é possível que a atenuação produzida pelo tratamento com ATZ esteja relacionada ao efeito oposto do H₂O₂ que atuando em áreas bulbares causa bradicardia, portanto, se opondo à resposta taquicárdica reflexa do NPS.

Estudos já demonstraram a relação entre o aumento de citocinas pró-inflamatórias em importantes áreas centrais que controlam a função cardiovascular e a hipertensão dependente de ANG II (DE KLOET et al., 2013, 2015; FERRARIO; STRAWN, 2006; SHI et al., 2010; SRIRAMULA; CARDINALE; FRANCIS, 2013). Ao analisarmos, utilizando PCR em tempo real, a expressão de RNAm para citocinas inflamatórias, componentes do SRA e de estresse oxidativo no hipotálamo, observamos que em SHR houve um aumento da expressão de RNAm para citocina pró-inflamatória IL-6 que foi reduzido após o tratamento crônico com injeções de ATZ sc. Em SHR também houve redução da expressão de uma importante citocina anti-inflamatória, a IL-10, que aumentou após o tratamento com o inibidor da catalase, o que representa um benefício para o sistema protetor anti-inflamatório. Além disso, em SHR o tratamento com ATZ sc diminuiu a expressão de RNAm de receptores AT1, o que representa uma possível redução das ações da ANG II no hipotálamo. De forma interessante, a expressão de RNAm para isoforma da NADPH oxidase NOX2 elevado nos SHR foi reduzida pelo tratamento crônico com ATZ sc. Em animais hipertensos também há um aumento da ativação da micróglia (DE KLOET et al., 2015; SHI et al., 2010) e o tratamento crônico com ATZ sc levou a uma redução da expressão de RNAm para o gene CD11, que é um marcador da ativação da micróglia. Com estes resultados pode-se sugerir que o estresse oxidativo mais ativo nos SHR foi reduzido pela inibição da catalase com injeções crônicas de ATZ sc reestabelecendo a normalidade deste sistema que ajuda a sustentar a hipertensão.

Nos ratos com hipertensão 2R1C houve um aumento na expressão de RNAm de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α), sem modificar a expressão de RNAm para citocina anti-inflamatória IL-10 como observado nos SHR e um aumento na expressão do RNAm para receptores AT1 no hipotálamo. O tratamento crônico com ATZ sc promoveu uma redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e da expressão de receptores AT1 no hipotálamo. Entretanto, diferentemente dos SHR, os ratos com hipertensão 2R1C não apresentaram modificações consistentes nas isoformas NOX2 e NOX4 da NADPH oxidase, bem como no gene marcador da ativação de micróglia no hipotálamo destes animais. Com estes resultados podemos inferir que o processo inflamatório está mais ativo no hipotálamo dos animais 2R1C e que o tratamento crônico com ATZ melhora este processo,

trazendo benefícios para este tipo de hipertensão. Como demonstrado em estudos anteriores há uma correlação entre processos inflamatórios e a gênese da hipertensão, com aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β) e outro marcador inflamatório como TNF- α à medida que a hipertensão progride (SHI et al., 2010; SHI; RAIZADA; SUMNERS, 2010; SRIRAMULA; CARDINALE; FRANCIS, 2013). Tal situação ocorre porque estas citocinas poderiam modular a atividade neuronal via produção das EROs, uma vez que citocinas aumentam a geração de EROs pela ativação da NADPH oxidase na micróglia, enquanto a liberação de EROs é capaz agir de forma parácrina o que modularia a atividade neuronal (SHI et al., 2010). Recentemente também foi demonstrado que ocorre ativação da micróglia aumento de citocinas pró-inflamatórias e diminuição de IL-10 (interleucina anti-inflamatória) na região do PVN em animais com hipertensão induzida por ANG II infundida sc (SHI; RAIZADA; SUMNERS, 2010; SRIRAMULA; CARDINALE; FRANCIS, 2013), sendo essas respostas bloqueadas pelo tratamento com minociclina, um antibiótico inibidor da ativação da microglia (SHI; RAIZADA; SUMNERS, 2010) e pela infusão icv de etanercepte, proteína de fusão que inibe a ação do TNF- α , atenuando o desenvolvimento da hipertensão dependente de ANG II em ratos (SRIRAMULA; CARDINALE; FRANCIS, 2013). Ademais a superexpressão de IL-10 em neurônios do PVN foi capaz de inibir a hipertensão causada pela ANG II sc demonstrando-se, assim uma importante participação destes mecanismos na hipertensão dependente de ANG II (SHI et al., 2010). Assim, pode-se sugerir que o tratamento crônico com ATZ sc reduz a PAM de ratos hipertensos por promover uma melhora na modulação simpática/parassimpática que pode ser devido a um prejuízo das ações da ANG II em áreas centrais, como por exemplo, o hipotálamo o que poderia contribuir para uma diminuição da inflamação nesta área, uma downregulation de receptores AT1 bem como normalização do estresse oxidativo, todos os mecanismos que por sua vez quando ativados também poderiam atuar conjuntamente com as ações pressoras diretas da ANG II central para intensificar os níveis de hipertensão.

Embora ainda não seja possível uma conclusão final sobre todos os mecanismos envolvidos no efeito anti-hipertensivo do tratamento crônico ATZ, evidências do presente estudo e de estudos anteriores podem sugerir alguns possíveis mecanismos. Estudos anteriores mostraram que injeções tanto icv quanto iv de ATZ foram capazes de bloquear agudamente a resposta pressora induzida pela ANG II injetada icv em ratos normotensos, SHR e 2R1C (LAUAR et al., 2010; LAUAR et al., 2011, 2012). O ATZ é uma ferramenta farmacológica que inibe a enzima catalase responsável por converter o H₂O₂ em H₂O e O₂. O mecanismo da

ação da catalase depende da dismutação a H_2O_2 normalmente dividida em duas etapas, cada qual consumindo uma molécula de H_2O_2 . Primeiramente, H_2O_2 oxida a catalase endógena, e então um segundo momento o H_2O_2 regenera catalase mais 2 molécula de H_2O e O_2 (ARAGON; ROGAN; AMIT, 1991; HEIM; APPLEMAN; PYFROM, 1955; NICHOLLS, 1962). O ATZ reage com a forma oxidada da catalase e assim compete com a segunda etapa: regeneração da catalase. Como resultado, o início e a eficácia da inibição da catalase por ATZ dependem da concentração local de H_2O_2 e o resultado final é a disponibilidade aumentada de H_2O_2 endógeno (CARDOSO; COLOMBARI; TONEY, 2012). Com isso, o ATZ promove um aumento na disponibilidade de H_2O_2 endógeno. Estudos anteriores já demonstraram que H_2O_2 tanto endógeno, quanto exógeno é capaz de promover uma diminuição da resposta pressora da ANG II de ratos normotensos (LAUAR et al., 2010), SHR e 2R1C LAUAR et al., 2011, 2012). Embora trabalhos da literatura tenham demonstrado que nos animais 2R1C a atividade do sistema renina angiotensina se encontra praticamente normalizada após a 4ª semana da clipagem dos animais (GOLDBLATT, 1938, 1958; MARTINEZ-MALDONADO, 1991; NAVAR et al., 1998), estudos recentes do nosso laboratório (não publicados) mostraram que nos animais 2R1C a atividade da renina plasmática ainda continua elevada após a 4ª semana da hipertensão, o que sugere que a ANG II ainda esteja contribuindo para a manutenção da hipertensão bem como a aumento da atividade simpática. Assim, é possível que o aumento da disponibilidade de H_2O_2 produzido pelo tratamento crônico com ATZ causaria uma redução das ações centrais da ANG II, entre elas da resposta pressora, o levaria a redução da pressão arterial nos ratos com hipertensão 2R1C. No SNC, H_2O_2 também pode afetar a excitabilidade neuronal através de mecanismos diferentes que incluem variações na liberação de neurotransmissores e na ativação de canais iônicos. Por exemplo, H_2O_2 pode bloquear a recaptação de glutamato pelas células gliais, que pode resultar num aumento dos níveis extracelulares de glutamato e um aumento da excitabilidade neuronal (SORG et al., 1997; VOLTERRA et al., 1994). Por outro lado, H_2O_2 pode também reduzir a excitabilidade neuronal como consequência da inibição de liberação de glutamato ou o aumento da liberação de GABA por ativação de canais de K^+_{ATP} (AVSHALUMOV et al., 2005; BAO et al., 2009; SAH et al., 2002; TAKAHASHI; MIKAMI; YANG, 2007; ZOCCARATO; VALENTE; ALEXANDRE, 1995). O tratamento prévio com bloqueador de canais de K^+_{ATP} injetado na área septal medial (ASM) praticamente reverteu a inibição que o tratamento com H_2O_2 na mesma área produziu na resposta de ingestão de água e resposta pressora induzida pela injeção do agonista colinérgico carbacol na ASM, sugerindo que H_2O_2 pode inibir a resposta

pressora e dispsogênica pela abertura de canais de K^+ (MELO et al., 2015). A ativação colinérgica ou angiotensinérgica central produzem ativação simpática e liberação de vasopressina (IMAI et al., 1989), e a injeção de H_2O_2 na ASM também reduziu a expressão de c-FOS induzida pela ativação colinérgica na ASM em células vasopressinérgicas do PVN e núcleo supraóptico (NSO) do hipotálamo (MELO et al., 2015).

Como mencionado anteriormente, a ANG II atuando em receptores AT1 ativa o complexo enzimático NADPH oxidase que reduz o oxigênio molecular a $O_2^{\cdot-}$ (ZIMMERMAN et al., 2002; ZIMMERMAN; DAVISSON, 2004). Trabalhos já demonstraram que a administração de antioxidantes como a vitamina C, ou a superexpressão da enzima SOD no RVL reduziu a hipertensão e a simpatoexcitação em ratos com hipertensão 2R1C (BERGAMASCHI et al., 1995; CAMPOS et al., 2011; NISHI et al., 2010; OLIVEIRA-SALES et al., 2009). Além disso, a administração do antagonista de receptores AT1 losartan por gavagem por 7 dias reduziu a produção de $O_2^{\cdot-}$ evidenciado pela marcação com DHE no RVL, além de promover a diminuição da hipertensão e da atividade do nervo renal em ratos com hipertensão 2R1C.

Lesões centrais nos tecidos ao redor da região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), uma importante área para as ações da ANG II centralmente, praticamente aboliu a hipertensão renal em ratos, sugerindo que os mecanismos angiotensinérgicos centrais são essenciais para este modelo de hipertensão (BRODY; FINK; BUGGY, 1978; MENANI et al., 1988). A importância de mecanismos angiotensinérgicos centrais para hipertensão 2R1C e SHR reforça a possibilidade dos efeitos anti-hipertensivos do ATZ serem devidos a uma redução dos efeitos pressores da ANG II central. Estudos recentes demonstraram que a microinjeção de ATZ e H_2O_2 no PVN suprime a atividade nervosa simpática renal (ASNr) produzida em resposta a injeção de glutamato injetado também no PVN, suportando a ideia que H_2O_2 no PVN possui um efeito inibitório na simpatoexcitação renal induzida pelo glutamato (CARDOSO; COLOMBARI; TONEY, 2012). Os presentes resultados mostram que a injeção sc de ATZ agudamente reduziu simultaneamente a PAM e a atividade simpática do nervo renal o que sugere uma ação central do ATZ inibindo os mecanismos centrais que controlam a atividade simpática. Outro resultado do presente estudo que também reforça esta mesma sugestão é a menor hipotensão produzida pelo bloqueio ganglionar com injeção iv de hexametônio em ratos hipertensos tratados cronicamente com ATZ, o que sugere que a atividade simpática dos animais tratados com ATZ estaria reduzida em comparação com aquela dos ratos hipertensos tratados com salina sc.

Recentemente vem sendo estudado a função do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) em mecanismos do controle cardiovascular e em patologias do sistema cardiovascular como a hipertensão (BUSCHE et al., 2001; COLOMBARI et al., 2010; LI et al., 2006, 2008). O interesse no estudo do MIF deve-se ao fato dele ser um regulador inibitório das ações intracelulares da ANG II quando ela atua centralmente em receptores AT1 (BUSCHE et al., 2001; SUN et al., 2004). Esta ação foi demonstrada em trabalhos utilizando tanto SHR quanto ratos com hipertensão 2R1C, nos quais houve uma atenuação na hipertensão de SHR e no desenvolvimento da hipertensão em ratos 2R1C além da restauração da função barorreflexa em ambos os modelos animais de hipertensos após a super-expressão viral do MIF em neurônios do NTS (BARBOSA et al., 2017; FREIRIA-OLIVEIRA et al., 2013; LI et al., 2008). Interessantemente, o MIF promove seu efeito inibitório sobre as ações da ANG II devido ao seu mecanismo de ação ativado pelo H_2O_2 que ativa a formação de MIF pela sua porção TPOR sequestrando então as EROS que foram formadas pela ANG II agindo em seu receptor AT1 via ativação da NADHP oxidase (HARRISON; SUMNERS, 2009). Assim, MIF e H_2O_2 agem de forma sinérgica em mecanismos que resultam na atenuação da hipertensão.

No presente estudo, também foram testados os efeitos do tratamento crônico com ATZ sc na ingestão diária de água, alimento, peso corporal e na excreção renal nos ratos normotensos ou hipertensos, uma vez que, como mencionado na literatura, modificações do equilíbrio hidroeletrólítico também afetam a pressão arterial (BLANCH et al., 2013; MCKINLEY et al., 2001; MENANI et al., 1990). Nossos resultados mostraram que embora tenha havido pequenas modificações em alguns parâmetros analisados, de forma geral não houve alterações significativas na ingestão de água e alimento, no peso corporal dos animais, bem como no volume urinário e excreção de Na^+ e K^+ que poderiam resultar em alterações na PA dos animais normotensos e hipertensos. Além disso, estes testes foram importantes para mostrar que os animais tiveram uma ótima tolerância para com as doses das drogas utilizadas, ou seja, o tratamento com ATZ não produz nenhum efeito colateral perceptível.

Apesar de todas as alterações centrais envolvidas na hipertensão mencionadas acima, a disfunção endotelial está presente na hipertensão. A disfunção endotelial é definida como um desbalanço entre a produção e a disponibilidade de fatores relaxantes e fatores contráteis derivados do endotélio, associados com um aumento da disponibilidade de EROs e uma diminuição da capacidade antioxidante (SILVA; PERNOMIAN; BENDHACK, 2012). Um importante mediador para o relaxamento vascular liberado pelas células endoteliais é o

óxido nítrico (NO). O NO é produzido pela NO sintase (NOS), que converte a L-arginina e o O₂ molecular em L-citrulina e NO (THOMAS et al., 2008). Estudos tem demonstrado que as EROs participam da modulação do tônus vascular, relaxamento e contração, na hipertensão (CAPETTINI et al., 2008, 2011; SILVA; PERNOMIAN; BENDHACK, 2012). Recentemente tem sido demonstrado que a NOS neuronal (NOS_n) é constitutivamente expressa no endotélio de aorta de camundongos e, além do NO, também produz H₂O₂, um importante fator relaxante dependente do endotélio (CAPETTINI et al., 2008, 2011). Estudos demonstraram que o H₂O₂ pode induzir vasodilatação em artérias periféricas e centrais (BÉNY; VON DER WEID, 1991; IIDA; KATUSIC, 2000; MATOBA et al., 2002), ativadas por canais de Ca²⁺ ou K⁺ em células vasculares de musculatura lisa (BARLOW; EL-MOWAFY; WHITE, 2000; BARLOW; WHITE, 1998; BYCHKOV et al., 1999), e um canal de cátion não-seletivo em células endoteliais (JI et al., 2002). Em SHR, foram realizadas medidas, em vivo, das concentrações basais de NO e H₂O₂ em artérias mesentéricas revelando que há um aumento destas concentrações basais de NO e H₂O₂, quando comparados aos ratos normotensos (ZHOU et al., 2008), revelando um importante fator de hiperpolarização em vários leitos vasculares contribuindo para o tônus vascular (MEURER et al., 2005; PRYSYAZHNA; RUDYK; EATON, 2012; SHIMOKAWA, 2010). Apesar da possibilidade do H₂O₂ exercer esta função periféricamente, promovendo uma vasodilatação, o fato da injeção de ATZ sc não ocasionar nenhuma diminuição da PAM nos animais normotensos, bem como não produzir taquicardia reflexa com diminuição da PAM nos animais hipertensos, demonstra que a participação de mecanismos centrais se sobrepõe aos mecanismos periféricos pois, diminuições de PA em decorrência de vasodilatação causada por um agente vasodilatador agindo periféricamente geralmente resultam em aumentos de FC, exceto se algum mecanismo central esteja produzindo efeito oposto. Os resultados mostrando redução da atividade simpática em ratos hipertensos tratados com ATZ também reforçam a ação do ATZ modificando a atuação de mecanismos pressores centrais para produzir seus efeitos anti-hipertensivos. Os resultados mostrando que o tratamento com ATZ também não modificou as respostas pressoras produzidas pelas injeções iv de noradrenalina ou ANG II em ratos normotensos ou com hipertensão 2R1C também sugerem que os efeitos anti-hipertensivos do ATZ não se devem a uma ação vascular que causasse comprometimento dos mecanismos pressores ativados por estes agentes pressores.

Embora ainda não seja possível uma conclusão final sobre todos os mecanismos envolvidos no efeito anti-hipertensivo do tratamento crônico ATZ, evidências do presente

estudo e de estudos anteriores podem sugerir alguns possíveis mecanismos. Estudos anteriores mostraram que injeções tanto icv quanto iv de ATZ foram capazes de bloquear agudamente a resposta pressora induzida pela ANG II injetada icv em ratos normotensos, SHR e 2R1C (LAUAR et al., 2010; LAUAR et al., 2011, 2012). O ATZ é uma ferramenta farmacológica que inibe a enzima catalase responsável por converter o H_2O_2 em H_2O e O_2 . O mecanismo de ação da catalase depende da dismutação do H_2O_2 , normalmente dividida em duas etapas, cada qual consumindo uma molécula de H_2O_2 . Primeiramente, H_2O_2 oxida a catalase endógena, e então num segundo momento o H_2O_2 regenera catalase mais 2 molécula de H_2O e O_2 (ARAGON; ROGAN; AMIT, 1991; HEIM; APPLEMAN; PYFROM, 1955; NICHOLLS, 1962). O ATZ reage com a forma oxidada da catalase e assim compete com a segunda etapa: regeneração da catalase. Como resultado, o início e a eficácia da inibição da catalase por ATZ dependem da concentração local de H_2O_2 e o resultado final é a disponibilidade aumentada de H_2O_2 endógeno (CARDOSO; COLOMBARI; TONEY, 2012). Estudos anteriores já demonstraram que H_2O_2 tanto endógeno, quanto exógeno é capaz de promover uma diminuição da resposta pressora da ANG II de ratos normotensos (LAUAR et al., 2010), SHR e 2R1C LAUAR et al., 2011, 2012). Embora trabalhos da literatura tenham demonstrado que nos animais 2R1C a atividade do sistema renina angiotensina se encontra praticamente normalizada após a 4ª semana da clipagem dos animais (GOLDBLATT, 1938, 1958; MARTINEZ-MALDONADO, 1991; NAVAR et al., 1998), estudos recentes do nosso laboratório (não publicados) mostraram que nos animais 2R1C a atividade da renina plasmática ainda continua elevada após a 4ª semana da hipertensão, o que sugere que a ANG II ainda esteja contribuindo para a manutenção da hipertensão bem como a aumento da atividade simpática. Assim, é possível que o aumento da disponibilidade de H_2O_2 produzido pelo tratamento crônico com ATZ causaria uma redução das ações centrais da ANG II, entre elas da resposta pressora, o levaria a redução da pressão arterial nos ratos com hipertensão 2R1C. No SNC, H_2O_2 também pode afetar a excitabilidade neuronal através de mecanismos diferentes que incluem variações na liberação de neurotransmissores e na ativação de canais iônicos. Por exemplo, H_2O_2 pode bloquear a recaptção de glutamato pelas células gliais, que pode resultar num aumento dos níveis extracelulares de glutamato e um aumento da excitabilidade neuronal (SORG et al., 1997; VOLTERRA et al., 1994). Por outro lado, H_2O_2 pode também reduzir a excitabilidade neuronal como consequência da inibição de liberação de glutamato ou o aumento da liberação de GABA por ativação de canais de K^+_{ATP} (AVSHALUMOV et al., 2005; BAO et al., 2009; SAH et al., 2002; TAKAHASHI; MIKAMI;

YANG, 2007; ZOCCARATO; VALENTE; ALEXANDRE, 1995). O tratamento prévio com bloqueador de canais de K^+_{ATP} injetado na área septal medial (ASM) praticamente reverteu a inibição que o tratamento com H_2O_2 na mesma área produziu na resposta de ingestão de água e resposta pressora induzida pela injeção do agonista colinérgico carbacol na ASM, sugerindo que H_2O_2 pode inibir a resposta pressora e dispsogênica pela abertura de canais de K^+ (MELO et al., 2015). A ativação colinérgica ou angiotensinérgica central produzem ativação simpática e liberação de vasopressina (IMAI et al., 1989), e a injeção de H_2O_2 na ASM também reduziu a expressão de c-FOS induzida pela ativação colinérgica na ASM em células vasopressinérgicas do PVN e núcleo supraóptico (NSO) do hipotálamo (MELO et al., 2015).

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que o ATZ exerceu um forte efeito em reduzir a modulação/atividade simpática dos animais hipertensos, mecanismo este importante no desenvolvimento e manutenção da hipertensão. Entretanto não foi possível elucidar com maior clareza em quais áreas centrais e por quais mecanismos o ATZ exerce tal efeito simpatolítico. Até o presente momento, os dados do presente trabalho em conjunto com aqueles da literatura (FREIRIA-OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA-SALES et al., 2008, 2009; SRIRAMULA; CARDINALE; FRANCIS, 2013) sugerem que o ATZ exerceria seu efeito anti-hipertensivo por atuar nos mecanismos que causam aumento da expressão de citocinas inflamatórias, de receptores AT1, da NOX2 e do gene marcador de ativação de micróglia no hipotálamo que poderia ser resultado do aumento das ações da ANG II em áreas do SNC como o hipotálamo, culminando numa maior atividade dos neurônios pré-motores simpáticos possivelmente localizados no PVN ou RVL. Esta simpatoexcitação promove aumento tanto da modulação simpática cardíaca quanto vasomotora além de promover uma maior simpatoexcitação para o leito renal, contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão. O ATZ injetado sistemicamente poderia atingir regiões hipotalâmicas ou do tronco cerebral importantes para a regulação cardiovascular levando a diminuição simpática por interferir nas ações centrais da ANG II, além de promover redução da neuroinflamação, na downregulation de receptores AT1, na diminuição da atividade da NOX2 e da micróglia nesta região.

A Figura 31 é uma representação esquemática que mostra as principais alterações encontradas após o tratamento com o ATZ sc na região hipotalâmica e na modulação da atividade simpática, em SHR e ratos com hipertensão 2R1C.

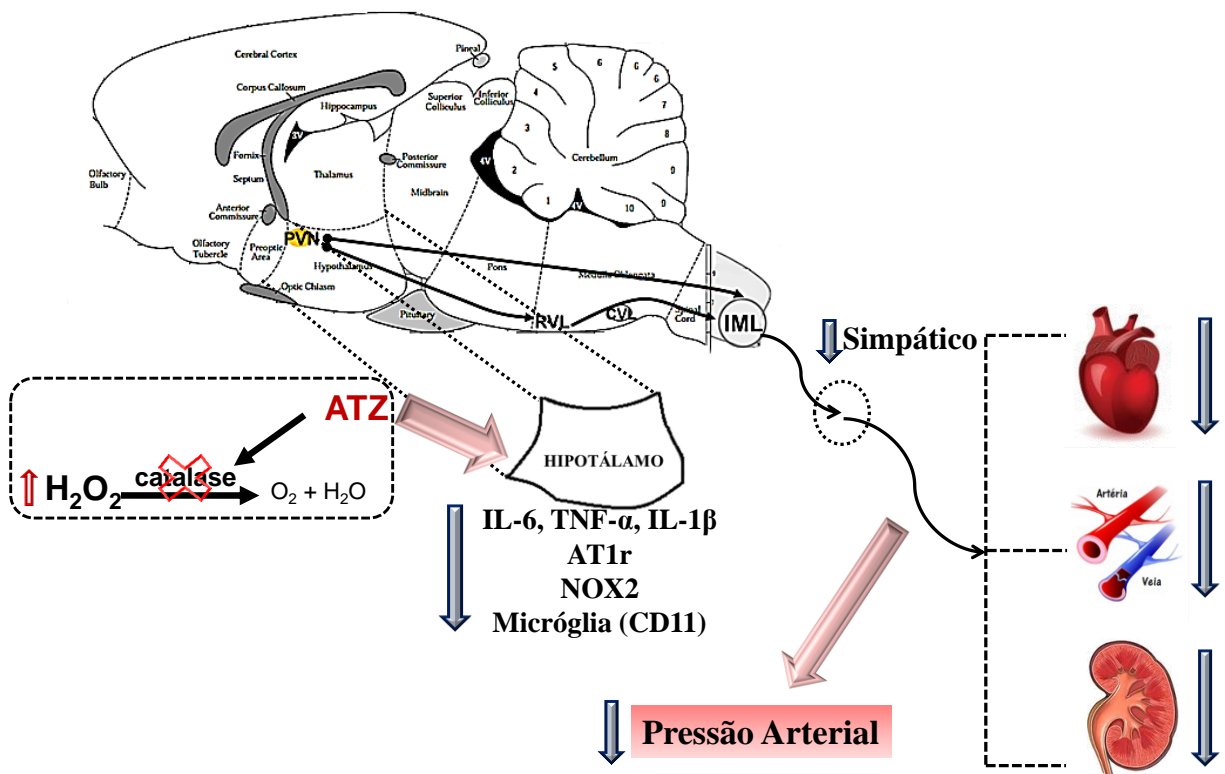


Figura 31: Representação esquemática mostrando que a inibição da catalase pelo tratamento com ATZ diminui vários fatores, como IL-6, TNF- α , IL-1 β , AT1r, NOX2 e micróglia (gene CD11) no hipotálamo de animais hipertensos que leva a uma diminuição da atividade de neurônios pré-motores simpático que contribuem para a diminuição da atividade simpática cardíaca, vasomotora e renal que culmina na diminuição da pressão arterial dos animais hipertensos [corte encefálico modificado de (PAXINOS; WATSON, 1986)]

6. CONCLUSÃO

No presente estudo demonstramos que em animais hipertensos (SHR e 2R1C) tratados com o inibidor da catalase, o ATZ, ocorreu redução da PAM associada a redução da neuroinflamação, expressão de receptores AT1, ativação da NADPH oxidase e ativação da micróglia no hipotálamo, além de diminuição da modulação simpática, do balanço simpato-vagal e da atividade nervosa simpática renal. Deste modo, os presentes resultados sugerem um efeito benéfico do H₂O₂ na redução da PAM e modulação da atividade simpática podendo ser um alvo potencial para terapêutica na hipertensão que envolve mecanismos de aumento da atividade nervosa simpática.

7. REFERÊNCIAS

ADACHI, A. Projection of the hepatic vagal nerve in the medulla oblongata. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 10, n. 3–4, p. 287–93, 1984.

ÁLVAREZ, E. et al. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. **Vascular Health and Risk Management**, v. 9, p. 401, jul. 2013.

ARAGON, C. M.; ROGAN, F.; AMIT, Z. Dose- and time-dependent effect of an acute 3-amino-1,2,4-triazole injection on rat brain catalase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 42, n. 3, p. 699–702, 15 jul. 1991.

ARONSSON, M. et al. Evidence for the existence of angiotensinogen mRNA in magnocellular paraventricular hypothalamic neurons. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 132, n. 4, p. 585–6, abr. 1988.

AVSHALUMOV, M. V et al. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 17, p. 4222–31, 27 abr. 2005.

BALI, A.; JAGGI, A. S. Angiotensin II-triggered kinase signaling cascade in the central nervous system. **Reviews in the neurosciences**, v. 27, n. 3, p. 301–15, 1 abr. 2016.

BAO, L. et al. Mitochondria are the source of hydrogen peroxide for dynamic brain-cell signaling. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 28, p. 9002–10, 15 jul. 2009.

BAO, L.; AVSHALUMOV, M. V; RICE, M. E. Partial mitochondrial inhibition causes striatal dopamine release suppression and medium spiny neuron depolarization via H₂O₂ elevation, not ATP depletion. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 43, p. 10029–40, 26 out. 2005.

BARBOSA, R. M. et al. Increased Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Nucleus of the Solitary Tract Attenuates Renovascular Hypertension in Rats. **American Journal of Hypertension**, 31 jan. 2017.

BARLOW, R. S.; EL-MOWAFY, A. M.; WHITE, R. E. H₂O₂ opens BK(Ca) channels via the PLA₂-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 279, n. 2, p. H475-83, ago. 2000.

BARLOW, R. S.; WHITE, R. E. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 4 Pt 2, p. H1283-9, out. 1998.

BÉNY, J. L.; VON DER WEID, P. Y. Hydrogen peroxide: an endogenous smooth muscle cell hyperpolarizing factor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 176, n. 1, p. 378–84, 15 abr. 1991.

BERGAMASCHI, C. et al. Role of the rostral ventrolateral medulla in maintenance of blood pressure in rats with Goldblatt hypertension. **Hypertension**, v. 26, n. 6 Pt 2, p. 1117–20, dez. 1995.

BILLMAN, G. E. Heart rate variability - a historical perspective. **Frontiers in physiology**, v. 2, p. 86, jan. 2011.

BLAIR-WEST, J. R. et al. Evidence that brain angiotensin II is involved in both thirst and sodium appetite in baboons. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 5 Pt 2, p. R1639-46, nov. 1998.

BLANCH, G. T. et al. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 7, p. R531–R542, 1 abr. 2013.

BLANCH, G. T. et al. Increased expression of angiotensin II type 2 receptors in the solitary-vagal complex blunts renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 64, n. 4, p. 777–83, out. 2014.

BRAAM, B.; NAVAR, L. G.; MITCHELL, K. D. Modulation of tubuloglomerular feedback by angiotensin II type 1 receptors during the development of Goldblatt hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 25, n. 6, p. 1232–7, jun. 1995.

BRANDS, M. W. et al. Interleukin 6 knockout prevents angiotensin II hypertension: role of renal vasoconstriction and janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 activation. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 56, n. 5, p. 879–84, 1 nov. 2010.

BRASILEIRA, S.; *CARDIOLOGIA, @BULLET* ISSN-0066-. 7^a DIRETRIZ BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. v. 107, n. 3, 2016.

BRODY, M. J.; FINK, G. D.; BUGGY, J. **The role of the anteroventral third ventricle (AV3V) region in experimental hypertension***Circulation Research*, 1978. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-17944391587&partnerID=tZOtx3y1>>

BRODY, M. J.; O'NEILL, T. P.; PORTER, J. P. Role of central catecholaminergic systems in pathogenesis and treatment of hypertension. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 6 Suppl 5, p. S727-41, jan. 1984.

BUSCHE, S. et al. Novel role of macrophage migration inhibitory factor in angiotensin II regulation of neuromodulation in rat brain. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4623–30, nov. 2001.

BYCHKOV, R. et al. Hydrogen peroxide, potassium currents, and membrane potential in human endothelial cells. **Circulation**, v. 99, n. 13, p. 1719–25, 6 abr. 1999.

CAMPESE, V. M. et al. Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain. **Brain research**, v. 1134, n. 1, p. 27–32, 23 fev. 2007.

CAMPESE, V. M.; SHAOHUA, Y.; HUIQUIN, Z. Oxidative stress mediates angiotensin II-dependent stimulation of sympathetic nerve activity. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 46, n. 3, p. 533–9, 1 set. 2005.

CAMPOS, R. R. et al. Role of the caudal pressor area in the regulation of sympathetic vasomotor tone. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 41, n. 7, p. 557–62, jul. 2008.

CAMPOS, R. R. et al. The role of oxidative stress in renovascular hypertension. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 38, n. 2, p. 144–52, fev. 2011.

CAPETTINI, L. S. A. et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 295, n. 6, p. H2503-11, dez. 2008.

CAPETTINI, L. S. A. et al. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 6, p. 1738–48, nov. 2011.

CARDOSO, L. M. et al. Cardiovascular responses to hydrogen peroxide into the nucleus tractus solitarius. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 2, p. R462–R469, 1 ago. 2009.

CARDOSO, L. M.; COLOMBARI, E.; TONEY, G. M. Endogenous hydrogen peroxide in the hypothalamic paraventricular nucleus regulates sympathetic nerve activity responses to L-glutamate. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 113, n. 9, p. 1423–31, nov. 2012.

CERUTTI, C. et al. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. **The American journal of physiology**, v. 261, n. 4 Pt 2, p. H1292-9, out. 1991.

CIRIELLO, J.; HOCHSTENBACH, S. L.; RODER, S. Nucleus of the Solitary Tract - I. Robin A. Barraco - Google Livros. In: **Nucleus of the Solitary Tract**. Boca Raton, Florida: [s.n.]. p. 35–50.

COHEN, G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 738, p. 8–14, 17 nov. 1994.

COLOMBARI, E. et al. Macrophage migration inhibitory factor in the paraventricular nucleus plays a major role in the sympathoexcitatory response to salt. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 56, n. 5, p. 956–63, 1 nov. 2010.

CORREA, F. M.; PLUNKETT, L. M.; SAAVEDRA, J. M. Quantitative distribution of angiotensin-converting enzyme (kininase II) in discrete areas of the rat brain by autoradiography with computerized microdensitometry. **Brain research**, v. 375, n. 2, p. 259–66, 11 jun. 1986.

COWLEY, A. W.; GUYTON, A. C. Quantification of intermediate steps in the renin-angiotensin-vasoconstrictor feedback loop in the dog. **Circulation research**, v. 30, n. 5, p. 557–66, maio 1972.

DE KLOET, A. D. et al. Angiotensin type 1a receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus protect against diet-induced obesity. **J Neurosci**, v. 33, n. 11, p. 4825–4833, 2013.

DE KLOET, A. D. et al. Role of neurons and glia in the CNS actions of the renin-angiotensin system in cardiovascular control. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 5, p. R444–R458, set. 2015.

DE OLIVEIRA-SALES, E. B. et al. 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. **American journal of hypertension**, v. 23, n. 7, p. 708–15, jul. 2010.

DEBOER, R. W.; KAREMAKER, J. M.; STRACKEE, J. Hemodynamic fluctuations and baroreflex sensitivity in humans: a beat-to-beat model. **The American journal of physiology**, v. 253, n. 3 Pt 2, p. H680-9, set. 1987.

DESCHEPPER, C. F.; BOUHNICK, J.; GANONG, W. F. Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. **Brain research**, v. 374, n. 1, p. 195–8, 21 maio 1986.

DIBONA, G. F. Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 36, n. 6, p. 1083–8, dez. 2000.

DIBONA, G. F. Peripheral and central interactions between the renin-angiotensin system and the renal sympathetic nerves in control of renal function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 940, p. 395–406, jun. 2001.

DZAU, V. J. et al. Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 8, n. 6, p. 544–8, jun. 1986.

FAVERO, M. T. et al. Chemosensory control by commissural nucleus of the solitary tract in

rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 179, n. 2–3, p. 227–234, 15 dez. 2011.

FERRARIO, C. M.; STRAWN, W. B. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. **The American journal of cardiology**, v. 98, n. 1, p. 121–8, 1 jul. 2006.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiological reviews**, v. 78, n. 3, p. 583–686, jul. 1998.

FREIRIA-OLIVEIRA, A. H. et al. Macrophage migration inhibitory factor in the nucleus of solitary tract decreases blood pressure in SHR. **Cardiovascular Research**, v. 97, n. 1, p. 153–160, 1 jan. 2013.

GANTEN, D. et al. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. **Science (New York, N.Y.)**, v. 173, n. 3991, p. 64–5, 2 jul. 1971.

GANTEN, D. et al. Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in hypertensive rats. **Science (New York, N.Y.)**, v. 221, n. 4613, p. 869–71, 26 ago. 1983.

GOLDBLATT, H. et al. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION: I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA. **The Journal of experimental medicine**, v. 59, n. 3, p. 347–79, 28 fev. 1934.

GOLDBLATT, H. Experimental Hypertension Induced by Renal Ischemia: Harvey Lecture, May 19, 1938. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 14, n. 9, p. 523–53, set. 1938.

GOLDBLATT, H. Experimental renal hypertension; mechanism of production and maintenance. **Circulation**, v. 17, n. 4, Part 2, p. 642–7, abr. 1958.

GROBE, J. L.; XU, D.; SIGMUND, C. D. An Intracellular Renin-Angiotensin System in Neurons: Fact, Hypothesis, or Fantasy. **Physiology**, v. 23, n. 4, p. 187–193, 1 ago. 2008.

GROEMPING, Y. et al. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. **Cell**, v. 113, n. 3, p. 343–55, 2 maio 2003.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews**

Neuroscience, v. 7, n. 5, p. 335–346, maio 2006.

HACKENTHAL, E. et al. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. **Physiological reviews**, v. 70, n. 4, p. 1067–116, out. 1990.

HAEUSLER, G.; FINCH, L.; THOENEN, H. Central adrenergic neurones and the initiation and development of experimental hypertension. **Experientia**, v. 28, n. 10, p. 1200–3, 15 out. 1972.

HARRISON, R. A.; SUMNERS, C. Redox regulation of macrophage migration inhibitory factor expression in rat neurons. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 1, p. 171–175, 4 dez. 2009.

HASLUND-VINDING, J. et al. NADPH oxidases in Microglia oxidant production: Activating Receptors, Pharmacology, and Association with Disease. **British journal of pharmacology**, p. n/a-n/a, 10 jan. 2016.

HEIM, W. G.; APPLEMAN, D.; PYFROM, H. T. Production of catalase changes in animals with 3-amino-1, 2, 4-triazole. **Science (New York, N.Y.)**, v. 122, n. 3172, p. 693–4, 14 out. 1955.

HODGE, R. L.; LOWE, R. D.; VANE, J. R. The effects of alteration of blood-volume on the concentration of circulating angiotensin in anaesthetized dogs. **The Journal of physiology**, v. 185, n. 3, p. 613–26, ago. 1966.

HOFFMAN, W. E. et al. Antidiuretic hormone release and the pressor response to central angiotensin II and cholinergic stimulation. **Neuropharmacology**, v. 16, n. 7–8, p. 463–72, 1977.

IIDA, Y.; KATUSIC, Z. S. Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 31, n. 9, p. 2224–30, set. 2000.

IMAI, Y. et al. Role of vasopressin in cardiovascular response to central cholinergic stimulation in rats. **Hypertension**, v. 13, n. 6 Pt 1, p. 549–57, jun. 1989.

IRANI, K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and

- apoptotic signaling. **Circulation research**, v. 87, n. 3, p. 179–83, 4 ago. 2000.
- Jl, G. et al. PECAM-1 (CD31) regulates a hydrogen peroxide-activated nonselective cation channel in endothelial cells. **The Journal of cell biology**, v. 157, n. 1, p. 173–84, 1 abr. 2002.
- JIANG, B. et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells and the protective effect of puerarin. **Cell biology international**, v. 27, n. 12, p. 1025–31, 2003.
- JOHNSON, A. K. The periventricular anteroventral third ventricle (AV3V): its relationship with the subfornical organ and neural systems involved in maintaining body fluid homeostasis. **Brain research bulletin**, v. 15, n. 6, p. 595–601, dez. 1985.
- JOHNSON, A. K.; HOFFMAN, W. E.; BUGGY, J. Attenuated pressor responses to intracranially injected stimuli and altered antidiuretic activity following preoptic-hypothalamic periventricular ablation. **Brain research**, v. 157, n. 1, p. 161–6, 17 nov. 1978.
- JUDY, W. V et al. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Circulation research**, v. 38, n. 6 Suppl 2, p. 21–9, jun. 1976.
- LALOI, C.; APEL, K.; DANON, A. Reactive oxygen signalling: the latest news. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 3, p. 323–8, jun. 2004.
- LASSÈGUE, B.; CLEMPUS, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 2, p. R277–R297, ago. 2003.
- LAUAR, M. R. et al. Inhibition of central angiotensin II-induced pressor responses by hydrogen peroxide. **Neuroscience**, v. 171, n. 2, p. 524–30, 1 dez. 2010.
- LERMAN, L. O. et al. Animal models of hypertension: An overview. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 146, n. 3, p. 160–173, set. 2005.
- LI, H. et al. Macrophage migration inhibitory factor in the PVN attenuates the central pressor and dipsogenic actions of angiotensin II. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 10, p. 1748–50, 1 ago. 2006.
- LI, H. et al. Macrophage migration inhibitory factor in hypothalamic paraventricular nucleus

neurons decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 9, p. 3175–85, 20 set. 2008.

LIANG, C.-S.; GAVRAS, H. Renin-Angiotensin System Inhibition in Conscious Dogs during Acute Hypoxemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 62, n. 5, p. 961–970, 1 nov. 1978.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LUIZ, J.; DA SILVA, L. CONSIDERAÇÕES SOBRE A CLASSIFICAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL: IMPLICAÇÕES NAS AÇÕES DE ENFERMAGEM. v. 1, 2006.

MAHON, J. M. et al. The association of thirst, sodium appetite and vasopressin release with c-fos expression in the forebrain of the rat after intracerebroventricular injection of angiotensin II, angiotensin-(1-7) or carbachol. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 199–208, nov. 1995.

MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 17, n. 5, p. 707–19, maio 1991.

MATOBA, T. et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 290, n. 3, p. 909–13, 25 jan. 2002.

MATSUMURA, K.; AVERILL, D. B.; FERRARIO, C. M. Angiotensin II acts at AT1 receptors in the nucleus of the solitary tract to attenuate the baroreceptor reflex. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 5 Pt 2, p. R1611-9, nov. 1998.

MÁXIMO CARDOSO, L. et al. Cardiovascular responses produced by central injection of hydrogen peroxide in conscious rats. **Brain research bulletin**, v. 71, n. 1–3, p. 37–44, 11 dez. 2006.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. **The Journal of biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6056–63, 25 nov. 1969.

- MCKINLEY, M. J. et al. Brain angiotensin and body fluid homeostasis. **The Japanese journal of physiology**, v. 51, n. 3, p. 281–9, jun. 2001.
- MELO, M. R. et al. Hydrogen peroxide attenuates the dipsogenic, renal and pressor responses induced by cholinergic activation of the medial septal area. **Neuroscience**, v. 284, p. 611–21, 22 jan. 2015.
- MENANI, J. V et al. Tachycardia during the onset of one-kidney, one-clip renal hypertension: role of the renin-angiotensin system and AV3V tissue. **Brain research**, v. 446, n. 2, p. 295–302, 19 abr. 1988.
- MENANI, J. V et al. The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol. **Neuroscience letters**, v. 113, n. 3, p. 339–44, 8 jun. 1990.
- MEURER, S. et al. Reactive oxygen species induce tyrosine phosphorylation of and Src kinase recruitment to NO-sensitive guanylyl cyclase. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 39, p. 33149–56, 30 set. 2005.
- MICHELINI, L. C.; BONAGAMBA, L. G. Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 15, n. 2 Suppl, p. I45-50, fev. 1990.
- MONTANO, N. et al. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. **Circulation**, v. 90, n. 4, p. 1826–31, out. 1994.
- MOREIRA, T. S. et al. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. **The Journal of Physiology**, v. 577, n. 1, p. 369–386, 15 nov. 2006.
- MOREIRA, T. S. et al. Antihypertensive effects of central ablations in spontaneously hypertensive rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 296, n. 6, p. R1797-806, jun. 2009.
- MORI, K. Participation of the sympathetic nervous system in spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 37, n. 6, p. 609–18, jun. 1973.

NAVAR, L. G. et al. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. **News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 13, p. 170–176, ago. 1998.

NERY, J.; RESUMO, P. Hipertensão renovascular: epidemiologia e diagnóstico. 2002.

NICHOLLS, P. The reaction between aminotriazole and catalase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 59, p. 414–20, 21 maio 1962.

NISHI, E. E. et al. Chronic antioxidant treatment improves arterial renovascular hypertension and oxidative stress markers in the kidney in Wistar rats. **American journal of hypertension**, v. 23, n. 5, p. 473–80, maio 2010.

NOZOE, M. et al. Inhibition of Rac1-derived reactive oxygen species in nucleus tractus solitarius decreases blood pressure and heart rate in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 50, n. 1, p. 62–8, 1 jul. 2007.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 27, p. 282–93, mar. 1963.

OLIVEIRA-SALES, E. B. et al. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. **American journal of hypertension**, v. 21, n. 1, p. 98–104, jan. 2008.

OLIVEIRA-SALES, E. B. et al. Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. **American journal of hypertension**, v. 22, n. 5, p. 484–92, maio 2009.

OLIVEIRA-SALES, E. B. et al. Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 183, p. 23–29, jul. 2014.

PAGANI, M. et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. **Circulation research**, v. 59, n. 2, p. 178–93, ago. 1986.

PALKOVITS, M.; ZÁBORSZKY, L. Neuroanatomy of central cardiovascular control.

Nucleus tractus solitarii: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc. **Progress in brain research**, v. 47, p. 9–34, 1977.

PATON, J. F.; KASPAROV, S. Differential effects of angiotensin II on cardiorespiratory reflexes mediated by nucleus tractus solitarii - a microinjection study in the rat. **The Journal of physiology**, v. 521 Pt 1, p. 213–25, 15 nov. 1999.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. [s.l.] Elsevier, 1986.

PETERSON, J. R. et al. Genetic silencing of Nox2 and Nox4 reveals differential roles of these NADPH oxidase homologues in the vasopressor and dipsogenic effects of brain angiotensin II. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 54, n. 5, p. 1106–14, 1 nov. 2009.

PETERSON, J. R.; SHARMA, R. V; DAVISSON, R. L. Reactive oxygen species in the neuropathogenesis of hypertension. **Current hypertension reports**, v. 8, n. 3, p. 232–41, jun. 2006.

PETTIT, L. K. et al. Modulating the inflammatory properties of activated microglia with Docosahexaenoic acid and Aspirin. **Lipids in health and disease**, v. 12, n. 1, p. 16, 11 fev. 2013.

PHILLIPS, M. I.; SUMNERS, C. Angiotensin II in central nervous system physiology. **Regulatory peptides**, v. 78, n. 1–3, p. 1–11, 30 nov. 1998.

PIRES, W. et al. Physical exercise performance in temperate and warm environments is decreased by an impaired arterial baroreflex. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e72005, jan. 2013.

PLOTH, D. W. Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney, one-clip renal vascular hypertension. **The American journal of physiology**, v. 245, n. 2, p. F131-41, ago. 1983.

PRYSYAZHNA, O.; RUDYK, O.; EATON, P. Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension. **Nature medicine**, v. 18, n. 2, p. 286–90, fev. 2012.

RHEE, S. G. et al. Cellular regulation by hydrogen peroxide. **Journal of the American**

Society of Nephrology : JASN, v. 14, n. 8 Suppl 3, p. S211-5, ago. 2003.

RICE, M. E. H₂O₂: a dynamic neuromodulator. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 17, n. 4, p. 389–406, ago. 2011.

SAAVEDRA, J. M.; FERNANDEZ-PARDAL, J.; CHEVILLARD, C. Angiotensin-converting enzyme in discrete areas of the rat forebrain and pituitary gland. **Brain research**, v. 245, n. 2, p. 317–25, 12 ago. 1982.

SAH, R. et al. Modulation of the GABA(A)-gated chloride channel by reactive oxygen species. **Journal of neurochemistry**, v. 80, n. 3, p. 383–91, fev. 2002.

SALGADO, H. C. et al. Modelos de hipertensão arterial. **Salgado HC Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, 2001.

SANTOS RAS & SAMPAIO WO. REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. p. 47–51, 2002.

SHI, P. et al. Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension. **Hypertension**, v. 56, n. 2, p. 297–303, ago. 2010.

SHI, P.; RAIZADA, M. K.; SUMNERS, C. Brain cytokines as neuromodulators in cardiovascular control. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 37, n. 2, p. e52-7, fev. 2010.

SHIMOKAWA, H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 459, n. 6, p. 915–22, maio 2010.

SILVA, B. R.; PERNOMIAN, L.; BENDHACK, L. M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 441, jan. 2012.

SORG, O. et al. Inhibition of astrocyte glutamate uptake by reactive oxygen species: role of antioxidant enzymes. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 3, n. 7, p. 431–40, jul. 1997.

SRIRAMULA, S.; CARDINALE, J. P.; FRANCIS, J. Inhibition of TNF in the brain reverses alterations in RAS components and attenuates angiotensin II-induced hypertension. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. e63847, jan. 2013.

- STORNETTA, R. L. et al. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. **Science (New York, N.Y.)**, v. 242, n. 4884, p. 1444–6, 9 dez. 1988.
- SU, Q. et al. Inhibition of reactive oxygen species in hypothalamic paraventricular nucleus attenuates the renin–angiotensin system and proinflammatory cytokines in hypertension. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 276, n. 2, p. 115–120, 15 abr. 2014.
- SUN, C. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor: An Intracellular Inhibitor of Angiotensin II-Induced Increases in Neuronal Activity. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 44, p. 9944–9952, 3 nov. 2004.
- SUN, C. et al. NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II. **Circulation research**, v. 96, n. 6, p. 659–66, 1 abr. 2005.
- TAKAHASHI, A.; MIKAMI, M.; YANG, J. Hydrogen peroxide increases GABAergic mIPSC through presynaptic release of calcium from IP3 receptor-sensitive stores in spinal cord substantia gelatinosa neurons. **The European journal of neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 705–16, fev. 2007.
- TAKAKURA, A. C. et al. Inhibition of the caudal pressor area reduces cardiorespiratory chemoreflex responses. **Neuroscience**, v. 177, p. 84–92, 17 mar. 2011.
- TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Contribution of excitatory amino acid receptors of the retrotrapezoid nucleus to the sympathetic chemoreflex in rats. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 10, p. 989–999, out. 2011.
- THOMAS, D. D. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 45, n. 1, p. 18–31, 1 jul. 2008.
- TORVIK, A. Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 106, n. 1, p. 51–141, nov. 1956.
- TOTOLA, L. T. et al. Commissural nucleus of the solitary tract regulates the antihypertensive effects elicited by moxonidine. **Neuroscience**, v. 250, p. 80–91, 10 out. 2013.
- VAN DE BORNE, P. et al. Absence of low-frequency variability of sympathetic nerve

- activity in severe heart failure. **Circulation**, v. 95, n. 6, p. 1449–54, 18 mar. 1997.
- VEERASINGHAM, S. J.; RAIZADA, M. K. Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. **British journal of pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 191–202, 2003.
- VILHARDT, F. et al. Microglia antioxidant systems and redox signaling. **British Journal of Pharmacology**, p. n/a-n/a, 11 jan. 2016.
- VOLTERRA, A. et al. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 14, n. 5 Pt 1, p. 2924–32, maio 1994.
- WAKI, H. et al. Gene expression profiles of major cytokines in the nucleus tractus solitarii of the spontaneously hypertensive rat. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 142, n. 1–2, p. 40–4, 3 nov. 2008.
- WANG, J. et al. Arginine vasopressin enhances GABAergic inhibition of cardiac parasympathetic neurons in the nucleus ambiguus. **Neuroscience**, v. 111, n. 3, p. 699–705, 2002.
- WEI, S.-G. et al. Proinflammatory cytokines upregulate sympathoexcitatory mechanisms in the subfornical organ of the rat. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 65, n. 5, p. 1126–33, maio 2015.
- WEINBERG, E. D. Cellular Iron Metabolism in Health and Disease. **Drug Metabolism Reviews**, v. 22, n. 5, p. 531–579, 22 jan. 1990.
- WRIGHT, J. W.; HARDING, J. W. The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 465, n. 1, p. 133–51, 26 jan. 2013.
- ZHOU, X. et al. NAD(P)H oxidase-derived peroxide mediates elevated basal and impaired flow-induced NO production in SHR mesenteric arteries in vivo. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 295, n. 3, p. H1008–H1016, set. 2008.
- ZHU, G.-Q. et al. ANG II in the paraventricular nucleus potentiates the cardiac sympathetic

afferent reflex in rats with heart failure. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 97, n. 5, p. 1746–54, 1 nov. 2004.

ZHU, M. et al. Angiotensin II decreases neuronal delayed rectifier potassium current: role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. **Journal of neurophysiology**, v. 82, n. 3, p. 1560–8, set. 1999.

ZIMMERMAN, M. C. et al. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. **Circulation research**, v. 91, n. 11, p. 1038–45, 29 nov. 2002.

ZIMMERMAN, M. C.; DAVISSON, R. L. Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 84, n. 2–3, p. 125–49, jan. 2004.

ZOCCARATO, F. et al. Modulation of glutamate exocytosis by redox changes of superficial thiol groups in rat cerebrocortical synaptosomes. **Neuroscience letters**, v. 274, n. 2, p. 107–10, 22 out. 1999.

ZOCCARATO, F.; VALENTE, M.; ALEXANDRE, A. Hydrogen peroxide induces a long-lasting inhibition of the Ca(2+)-dependent glutamate release in cerebrocortical synaptosomes without interfering with cytosolic Ca²⁺. **Journal of neurochemistry**, v. 64, n. 6, p. 2552–8, jun. 1995.