

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

ADELSON HÉRIC ALVES MONTEIRO

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) ENDÓGENA NO NÚCLEO  
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO NAS ALTERAÇÕES  
CARDIOVASCULARES QUE OCORREM DURANTE AS DIFERENTES FASES DA  
HEMORRAGIA**

BELO HORIZONTE

2022

ADELSON HÉRIC ALVES MONTEIRO

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) ENDÓGENA NO NÚCLEO  
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO NAS ALTERAÇÕES  
CARDIOVASCULARES QUE OCORREM DURANTE AS DIFERENTES FASES DA  
HEMORRAGIA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Andrea Siqueira  
Haibara

BELO HORIZONTE

2022

04

Monteiro, Adelson Héric Alves.

Efeitos da angiotensina-(1-7) endógena no núcleo paraventricular do hipotálamo nas alterações cardiovasculares que ocorrem durante as diferentes fases da hemorragia [manuscrito] / Adelson Héric Alves Monteiro. – 2022.

95 f.: il.; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Andrea Siqueira Haibara.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**ATA DA DEFESA DA TESE Nº 367 DE ADELSON HÉRIC ALVES MONTEIRO**

Às 14:00 horas do dia 14 do mês de dezembro de 2022, transmitida pela plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Adelson Héric Alves Monteiro**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Andrea Siqueira Haibara**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Cristiane Busnardo Santiago**, Universidade Estadual Paulista, **Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora**, ICEB/Universidade Federal de Ouro Preto, **Prof. Dr. André de Souza Mecawi**, Universidade Federal de São Paulo, **Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Profa. Dra. Andrea Siqueira Haibara**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Efeitos da Angiotensina-(1-7) Endógena no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo nas Alterações Cardiovasculares Que Ocorrem Durante As Diferentes Fases da Hemorragia**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2022**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Siqueira Haibara**, **Professora do Magistério Superior**, em 15/12/2022, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Busnardo Santiago**, **Usuária Externa**, em 15/12/2022, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Candido Celso Coimbra, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2022, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andreia Carvalho Alzamora, Usuário Externo**, em 21/12/2022, às 08:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **André de Souza Mecawi, Usuário Externo**, em 28/12/2022, às 12:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1960707** e o código CRC **2A51B45E**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**"Efeitos da Angiotensina-(1-7) Endógena no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo nas Alterações Cardiovasculares Que Ocorrem Durante As Diferentes Fases da Hemorragia"**

**ADELSON HÉRIC ALVES MONTEIRO**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **14 de dezembro de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Profa. Dra. Cristiane Busnardo Santiago, UNESP**

**Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora, ICEB/UFOP**

**Prof. Dr. Andre de Souza Mecawi, UNIFESP**

**Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra, ICB/UFMG**

**Profa. Dra. Andrea Siqueira Haibara, ICB/UFMG - Orientadora**

**Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2022.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Siqueira Haibara, Professora do Magistério Superior**, em 15/12/2022, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Busnardo Santiago, Usuária Externa**, em 15/12/2022, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Candido Celso Coimbra, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2022, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andreia Carvalho Alzamora, Usuário Externo**, em 21/12/2022, às 08:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **André de Souza Mecawi, Usuário Externo**, em 28/12/2022, às 12:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1960722** e o código CRC **57162332**.

## AGRADECIMENTOS

À Deus agradeço por ser minha base e me dar forças para aguentar todas as provas em tempos tão difíceis.

À minha amada esposa Isabela que esteve ao meu lado nos momentos mais felizes e difíceis, com paciência e sabedoria. Me ajudou muito pessoalmente e profissionalmente, tendo participação importante na educação de meu amado filho Nicolas, que é um dos motivos de eu conseguir me superar a cada dia, obrigado filho!

À minha segunda mãe e orientadora, professora Doutora Andrea Siqueira Haibara, que me ensinou a estudar, ser um cientista, foi minha psicóloga, orientadora e amiga. Precisaria de duas vidas para pagar tudo o que fez por mim nesses anos, eu não teria chegado até aqui sem você.

A todos os amigos de Laboratório e departamento espero não ter esquecido de ninguém aqui, sem vocês o cotidiano no laboratório não seria o mesmo muito obrigado Filipe, Sthéfanie, Cristiane, Gabriel, Lucas, Sílvia, Dani, Luiz, Zezé, Jônathas, Bruna, Thais, Paola, Nayara, Bryan, Barbara e Carol.

A todos os professores do laboratório de Hipertensão, foi uma honra poder dividir o laboratório com vocês e ter a oportunidade de tirar dúvidas e conversar com mentes tão brilhantes.

Gostaria também de agradecer ao pessoal do NNC, infelizmente a análise de potencial de campo não entrou no trabalho por problemas técnicos, porém agradeço muito o tempo que passamos juntos fazendo experimentos e aprendendo. Obrigado Leo por me ajudar com os experimentos, escutar meus desabafos e pelas risadas. Flavio você é o cara! Fisioterapeuta pode ser bom de cálculo, você provou isso! Obrigado pela paciência e pelo apoio, pode ter certeza de que vou guardar aqui o GD do tio Flavio! E professor Márcio obrigado pela paciência, conversas, ensinamentos e por me apresentar Sandman.

Não poderia deixar de agradecer a Ubirajara e Washington por toda a ajuda na compreensão da análise da variabilidade da frequência cardíaca e pressão sistólica.

A CAPES e CNPq, pelo financiamento da minha bolsa de doutorado. Nesse período de crise, negação da ciência e irresponsabilidades seria praticamente



impossível realizar esse trabalho, comprar insumos e participar de eventos científicos se não tivesse o auxílio da taxa de bancada.

E por fim, mas não menos importante gostaria de agradecer a todos os animais que participaram desse estudo, essa pesquisa não poderia ser realizada sem eles.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

(Albert Einstein)

## RESUMO

No intuito de caracterizar os efeitos cardiovasculares mediados pelo PVN, avaliar ações endógenas dos peptídeos com maior ação biológica do SRA, antes, durante e após a hemorragia ratos Wistar foram submetidos à microinjeção bilateral de Muscimol, A779 e Losartan (agonista gabaérgico, antagonista dos receptores Mas da angiotensina-(1-7) e antagonista dos receptores AT<sub>1</sub> da angiotensina II, respectivamente). A hemorragia foi realizada em volume fixo de 24 mL/kg durante 20 min em animais acordados e com livre movimentação. Além das alterações sobre os parâmetros de PAM e FC, a função autonômica foi analisada através da variabilidade da FC e da PAS por análise espectral. Também foi avaliado o envolvimento da vasopressina periférica nos efeitos do A779 no PVN. A microinjeção de Muscimol antecipou a queda da PA induzida pela hemorragia, atenuou sua queda no final da hemorragia e prejudicou fase final da recuperação da PA. A microinjeção de Losartan resultou em atenuação da queda da PA no fim da hemorragia, recuperação mais ágil da PA durante a recuperação, suficiente para retornar aos valores basais. Os ratos tratados com A779 apresentaram resultado similar de atenuação da queda da PA no fim da hemorragia, porém acompanhado de taquicardia. Esse efeito foi abolido com a administração i.v. do antagonista de receptor V<sub>1</sub>. Os ratos tratados com A779 também apresentaram menor variação da frequência cardíaca no final da hemorragia, sem aumento dos componentes de BF e AF nesse período. Também apresentaram maior labilidade da PA durante a toda a hemorragia, porém, inferior à apresentada no grupo controle, que normalizou na fase de recuperação. Também foi avaliada através da análise por histoquímica a atividade da óxido nítrico sintase no fim da hemorragia, no entanto não houve diferença significativa do número de neurônios NADPH-diaforase positivos entre os grupos Salina e A779. Assim este estudo sugere que o PVN apresenta um papel fundamental na modulação da pressão arterial, principalmente nas fases compensada e de recuperação. Os peptídeos do SRA Angiotensina II e Ang-(1-7) agindo nesse núcleo, desempenham resposta moduladora tendo relação com a queda da pressão arterial na fase descompensada e de recuperação. A Ang-(1-7), peptídeo foco do estudo, exerce modulação da pressão arterial possivelmente por redução do tônus vagal e na síntese ou liberação de vasopressina.

Palavras-Chave: Hemorragia, Sistema Renina Angiotensina, Choque hemorrágico, Neurofisiologia, Fisiologia cardiovascular e PVN.

## ABSTRACT

To characterize the cardiovascular effects mediated by the PVN, to evaluate the endogenous actions of the peptides with greater biological action of the RAS, before, during and after the hemorrhage, Wistar rats were submitted to bilateral microinjection of Muscimol, A779 and Losartan (gabaergic agonist, receptor antagonist Angiotensin-(1-7) MA and angiotensin II AT1 receptor antagonist, respectively). Bleeding was performed in a fixed volume of 24 mL/kg for 20 min in animals that were awake and freely moving. In addition to changes in MAP and HR parameters, autonomic function was analyzed through HR and SBP variability by spectral analysis. The involvement of peripheral vasopressin in the effects of A779 on PVN was also evaluated. Muscimol microinjection anticipated the BP drop induced by the hemorrhage, attenuated its decrease at the end of the hemorrhage and impaired the final phase of BP recovery. Losartan microinjection resulted in attenuation of the BP drop at the end of the hemorrhage, more agile BP recovery during recovery, sufficient to return to baseline values. Rats treated with A779 showed a similar result of attenuation of the drop in BP at the end of the hemorrhage but accompanied by tachycardia. This effect was abolished with i.v. of the V1 receptor antagonist. Rats treated with A779 also showed less variation in heart rate at the end of the hemorrhage, with no increase in LF and HF components during this period. They also presented greater BP lability during the entire hemorrhage, however, lower than that presented in the control group, which normalized in the recovery phase. The activity of nitric oxide synthase at the end of the hemorrhage was also evaluated through histochemical analysis, however there was no significant difference in the number of NADPH-diaphorase positive neurons between the Salina and A779 groups. Thus, this study suggests that the PVN plays a fundamental role in the modulation of blood pressure, especially in the compensated and recovery phases. The RAS peptides Angiotensin II and Ang-(1-7) acting in this nucleus, perform a modulating response related to the drop in blood pressure in the decompensated and recovery phases. Ang-(1-7), the peptide that was the focus of the study, modulates blood pressure possibly by reducing vagal tonus and the synthesis or release of vasopressin.

**Key Words:** Hemorrhage, Renin Angiotensin System, Hemorrhagic shock, Neurophysiology, Cardiovascular Physiology and PVN.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\beta$  -NADPH -  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido  
 $\mu\text{g}$  - micrograma  
 $\mu\text{l}$  - microlitro  
 $\mu\text{m}$  – micrômetro  
AF – alta frequência  
Ang II - Angiotensina II  
Ang-(1-7) - Angiotensina (1-7)  
AVP - arginine vasopressin - arginina vasopressina  
BF – baixa frequência  
bpm – batimentos por minuto  
CEBIO - Centro de bioterismo  
CEUA - comissão de ética no uso de animais  
CVLM - caudal ventrolateral medulla - região ventrolateral caudal do bulbo  
dTyr - (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP) Antagonista de receptor V<sub>1</sub>  
ECA - enzima conversora de angiotensina  
ECA2 - enzima conversora de angiotensina 2  
eNOS - endothelial nitric oxide synthase - óxido nítrico sintase endotelial  
EPM - erro padrão da média  
FC - frequência cardíaca  
G - grama  
GABA – ácido gama-aminobutírico  
Hz - Hertz  
ICC – insuficiência cardíaca crônica  
IP – Intervalo de Pulso  
i.v. - intravenoso  
ICB - Instituto de Ciências Biológicas  
ICV - intracerebroventricular  
IP - intervalo de pulso  
Kg – kilograma  
MBF - frequências muito baixas  
mg - miligramas

mL - mililitros

mm – milímetro

mmHg – milímetros de mercúrio

NADPH-diaforase – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase),

nl - nanolitro

NMDA - N-methyl-D-aspartate - N-metil D-aspartato

nmol - Nanomol

nNOS - neuronal nitric oxide synthase - óxido nítrico sintase neuronal

NO - nitric oxide - óxido nítrico

NOS - nitric oxide synthase - óxido nítrico sintase

NTS - núcleo do trato solitário

PA – pressão arterial

PAM - pressão arterial média

PAP - pressão arterial pulsátil

PAS – Pressão arterial sistólica

PB - phosphate buffer - tampão fosfato

PE-10 - tubo de polietileno número 10

PE-50 - tubo de polietileno número 50

PFA - paraformaldeído

PS – Pressão sistólica

PVN - paraventricular nucleus of hypothalamus - núcleo paraventricular do hipotálamo

RMSSD - the root mean square of successive differences between normal heartbeats - raiz quadrada média de diferenças sucessivas entre batimentos cardíacos normais

RVLM - rostroventrolateral medulla - região ventrolateral rostral do bulbo

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNC - sistema nervoso central

SRA - sistema renina-angiotensina

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VFC - variabilidade da frequência cardíaca

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. HEMORRAGIA.....	19
1.2. FASES DA HEMORRAGIA E SUAS CARACTERÍSTICAS SISTÊMICAS.....	19
1.3. SISTEMA NERVOSO CENTRAL NA REGULAÇÃO HEMODINÂMICA DURANTE A HEMORRAGIA.....	24
1.4. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA CEREBRAL NA HEMORRAGIA.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. OBJETIVO GERAL .....	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
3.1. ANIMAIS .....	31
3.2. IMPLANTE DE CÂNULAS NO PVN .....	31
3.3. CANULAÇÃO DAS ARTÉRIAS E VEIA FEMORAL.....	32
3.4. REGISTRO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.....	32
3.5. INDUÇÃO DA HEMORRAGIA.....	33
3.6. PREPARAÇÃO DAS DROGAS.....	34
3.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO SÍTIO DE MICROINJEÇÃO.....	34
3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA NOS NO PVN .....	35
3.9. ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA .....	37
3.9.1. PROCESSAMENTO DO ARQUIVO DE DADOS CARDIOVASCULARES .....	37
3.9.2. ANÁLISE DA VARIABILIDADE CARDIOVASCULAR NO DOMÍNIO DO TEMPO E NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA .....	38
4. RESULTADOS .....	42
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE HEMORRAGIA.....	42
4.1.1. PERCENTAGEM DE SANGUE REMOVIDO EM 20 MINUTOS .....	43
4.1.2. REPRESENTAÇÃO DAS FASES DA HEMORRAGIA.....	43



4.2. EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE MUSCIMOL NO PVN EM RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA .....	44
4.2.1. SALINA VS MUSCIMOL.....	45
4.3. EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE LOSARTAN NO PVN EM RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA .....	46
4.3.1. SALINA VS LOSARTAN.....	47
4.4. EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE A779 NO PVN EM RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA.....	48
4.4.1. SALINA VS A779 .....	49
4.5. EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE ANG-(1-7) NO PVN EM RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA.....	50
4.5.1. SALINA VS ANG-(1-7) .....	51
4.5.2. A779 VS ANG-(1-7).....	52
4.6. EFEITOS DO BLOQUEIO PERIFÉRICO DOS RECEPTORES $V_1$ DA VASSOPRESSINA SOBRE AS ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO A779 NO PVN DE RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA.....	53
4.6.1 SALINA VS SALINA + DTYR.....	55
4.6.2. A779 VS A779+DTYR .....	56
4.7. ANÁLISE DA DENSIDADE ESPECTRAL DA FC SOBRE O EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE A779 NO PVN DE RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA .....	57
4.7.1. VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA: DOMÍNIO DO TEMPO .....	58
4.7.2. VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA: DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA....	59
4.8. ANÁLISE DA DENSIDADE ESPECTRAL DA PS SOBRE O EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE A779 NO PVN DE RATOS SUBMETIDOS A HEMORRAGIA .....	60
4.8.1. VARIABILIDADE DA PRESSÃO SISTÓLICA: DOMÍNIO DO TEMPO.....	61
4.8.2. VARIABILIDADE DA PRESSÃO SISTÓLICA: DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA.....	62
4.9. AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS NITRÉRGICOS DO PVN NOS EFEITOS DO A779: ATIVIDADE DA NADPH-DIAFORASE EM NEURÔNIOS DO PVN DE RATOS SUBMETIDOS A HEMORRAGIA.....	63
5. DISCUSSÃO.....	64
6. CONCLUSÃO .....	73

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
8. ANEXOS.....	87
ANEXO 1: PRINCIPAIS DIFERENÇAS DA RESPOSTA A HEMORRAGIA ENTRE ESPÉCIES.....	87
ANEXO 2: DILIGÊNCIA - PROTOCOLO CEUA: 111/2018 .....	89
ANEXO 3:TABELA DE VALORES ABSOLUTOS.....	90
ANEXO 4: MUSCIMOL VS LOSARTAN VS A779.....	91
ANEXO 5: SALINA+DTYR VS A779+DTYR.....	92
ANEXO 6: VALORES ABSOLUTOS MUSCIMOL VS SALINA .....	93
ANEXO 7: VALORES ABSOLUTOS LOSARTAN VS SALINA .....	94
ANEXO 8: VALORES ABSOLUTOS A779 VS SALINA.....	95

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. HEMORRAGIA

No início da segunda guerra mundial foram realizados os primeiros estudos que detalhavam as alterações hemodinâmicas que ocorriam durante a perda aguda de sangue (BARCROFT et al., 1944; WARREN et al., 1945). Estes estudos demonstraram que a perda aguda de sangue promove resposta hemodinâmica bifásica caracterizada por resposta inicial de aumento da resistência vascular e da frequência cardíaca (FC), que ocorre simultaneamente à queda do débito cardíaco, mantendo assim os níveis normais da pressão arterial (PA) (DARLINGTON; SHINSAKO; DALLMAN, 1986; FEJES-TOTH; BRINCK-JOHNSEN; NARAY-FEJES-TOTH, 1988; KHANMORADI; NASIMI, 2017; SCHADT; LUDBROOK, 1991; TROY et al., 2003) Com a progressão da hemorragia e da perda de sangue atingindo níveis críticos, ocorre queda abrupta da PA sucedida por náusea, fraqueza e/ou síncope, que é atribuída à queda da resistência vascular e bradicardia (LUDBROOK; RUTTER, 1988; MORITA; VATNER, 1985; SCHADT et al., 1984; SHEN; COWLEY; VATNER, 1991). Posteriormente foi descrito que após o fim da hemorragia ocorre restauração gradual da PA e da frequência cardíaca em direção aos níveis basais (EVANS; LUDBROOK; VENTURA, 1994; SCHADT; LUDBROOK, 1991; TROY et al., 2003). Os mecanismos envolvidos na queda abrupta da pressão arterial que ocorre em perdas sanguíneas prolongadas e de alto volume ainda não foram totalmente esclarecidos.

Até a presente data os tratamentos convencionais não são totalmente eficazes na recuperação de indivíduos com perdas massivas de sangue, o que levanta a necessidade de uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos que atuam para normalizar a PA em cada fase da hemorragia.

## 1.2. FASES DA HEMORRAGIA E SUAS CARACTERÍSTICAS SISTÊMICAS

Como as respostas a hemorragia variam de acordo com ao modelo animal, para fins didáticos nessa introdução serão abordados apenas os estudos realizados em mamíferos de pequeno porte. No *anexo 1* as principais diferenças das respostas nas três fases da hemorragia entre as espécies são detalhadas.

Fatores como idade, espécie, gênero, estado de anestesia, velocidade, intensidade e duração do sangramento, são variáveis consideradas como capazes afetar os modelos experimentais utilizados para o estudo da hemorragia (CHIEN,

1967). Assim, estudos utilizando animais não anestesiados para avaliar as respostas das alterações hemodinâmicas ocorridas devido à hemorragia começaram a se tornar cada vez mais frequentes (SCHADT; LUDBROOK, 1991). Nos diversos modelos estudados, houve uma resposta em comum, onde inicialmente a medida em que o débito cardíaco diminui, os reflexos cardiovasculares provocavam um aumento progressivo da frequência cardíaca, maior resistência ao fluxo sanguíneo periférico, e dependendo da intensidade do sangramento, também é observado queda da resistência vascular cerebral (FORSYTH; HOFFBRAND; MELMON, 1970; NEUTZE; WYLER; RUDOLPH, 1968; SCHADT; LUDBROOK, 1991). Portanto, perdas de sangue de baixa intensidade e/ou curta duração que apresentam poucos sinais e sintomas, como ausência de hipotensão, é compensada pelo aumento progressivo da atividade simpática que mesmo com a queda do débito cardíaco é suficiente para manter a pressão arterial em seus níveis basais, através de respostas mediadas predominantemente pelo barorreflexo. Esse tipo de hemorragia se enquadra na primeira fase da hemorragia, conhecida como compensada ou simpatoexcitatória (BUSNARDO et al., 2016; EVANS et al., 2001; EVANS; LUDBROOK; VENTURA, 1994; HESLOP; KEAY; BANDLER, 2002; TROY et al., 2003; TROY; HOPKINS; KEAY, 2014). Assim os barorreceptores arteriais desempenham um papel fundamental sobre as respostas hemodinâmicas na fase compensada da hemorragia.

A concentração plasmática de Norepinefrina (NE) parece exercer ações hemodinâmicas relevantes durante a fase compensada, porém, seu aumento pode variar de acordo com o modelo animal utilizado (DARLINGTON; SHINSAKO; DALLMAN, 1986; FORSYTH; HOFFBRAND; MELMON, 1970; HAGGENDAL, 1986; SCHADT, 1989). Apesar destas respostas variarem de acordo com a espécie estudada, estes dados reforçam os achados de que os mecanismos responsáveis por manter a pressão arterial em seus níveis basais, apesar da queda do débito cardíaco que ocorre durante a fase compensada, não acontecem apenas pela retirada vagal, mas também ocorre devido ao aumento da atividade simpática cardíaca, que contribui com o aumento da contratilidade do músculo cardíaco, mantendo assim os níveis de pressão normais apesar da queda do débito cardíaco (DARLINGTON; SHINSAKO; DALLMAN, 1986; FEJES-TOTH; BRINCK-JOHNSEN; NARAY-FEJES-TOTH, 1988; SCHADT; LUDBROOK, 1991; TROY et al., 2003).

Está bem demonstrado na literatura que a concentração plasmática de vasopressina aumenta consideravelmente em animais submetidos a modelos de

hemorragia capazes de causar hipotensão. Estudos realizados em coelhos e ratos demonstraram que a hemorragia não hipotensiva pode causar aumento da concentração plasmática de vasopressina (QUAIL; WOODS; KORNER, 1987; WANG et al., 1983, 1988). Entretanto, o bloqueio do receptor  $V_1$  durante a fase compensada nesses animais, não demonstrou efeitos significativos nos valores de pressão arterial, portanto, mesmo com o aumento da concentração plasmática esse peptídeo aparentemente não tem ação relevante na fase compensada nesses animais (BUSNARDO et al., 2016; KORNER et al., 1990; SCHADT; HASSER, 1991).

A ação do sistema renina angiotensina (SRA) também foi avaliada durante a fase compensada da hemorragia. O aumento da atividade plasmática da renina durante a primeira fase da hemorragia foi relatado em vários estudos durante a fase compensada em cães, coelhos e ratos, porém, sem ações significativas nessa fase (BOTELHO et al., 1994; FEJES-TOTH; BRINCK-JOHNSEN; NARAY-FEJES-TOTH, 1988; QUAIL; WOODS; KORNER, 1987; WANG et al., 1983, 1983).

Atualmente está bem estabelecido que a perda de sangue em níveis críticos (alguns estudos descrevem como perdas acima de 30% do volume sanguíneo total) da início a segunda fase da hemorragia, nomeada de descompensada ou simpatoinibitória. Essa fase tem como principal característica a queda abrupta da pressão arterial (EVANS et al., 2001; LUDBROOK; POTOCHNIK; WOODS, 1988; SCHADT; LUDBROOK, 1991; TROY et al., 2003). Alguns autores atribuem essa queda abrupta da PA a sinais nociceptivos evocados por isquemia em leitos musculares viscerais e esqueléticos, em parte como consequência da vasoconstrição mediada pela fase compensada. Também foi sugerido que essa queda pode ser atribuída a uma falha do impulso vasomotor simpático, em conjunto a um aumento do impulso vagal cardíaco, que resulta em reduções na resistência periférica, pressão arterial e, em algumas espécies, queda da frequência cardíaca (EVANS et al., 2001; SCHADT; HASSER, 1991; SCHADT; LUDBROOK, 1991; TROY et al., 2003). Porém, até os dias de hoje alguns dos mecanismos que desencadeiam o início da segunda fase da hemorragia permanecem controversos. Algumas evidências sugerem que os receptores cardiopulmonares com aferências vagais podem ser importantes para os ajustes circulatórios que ocorrem durante a fase descompensada. Foi demonstrado que gatos anestesiados apresentam bradicardia quando submetidos a hemorragia severa, e que é possível abolir essa bradicardia através do bloqueio vagal por resfriamento.

É concebível que, com sangramento abrupto, os receptores sejam excitados por uma compressão imprópria do miocárdio quando os ventrículos se contraem vigorosamente em torno de uma câmara quase vazia e, então, induzem uma bradicardia reflexa. Esse mecanismo reflexo, semelhante à chamada reação de síncope vasovagal no homem, pode, portanto, servir como um sistema protetor, causando uma parada no coração e permitindo um melhor enchimento diastólico em situações em que o retorno venoso é criticamente reduzido. Os autores sugeriram que essa resposta, provavelmente seria desencadeada pelo reflexo cardiopulmonar, que poderia ter uma função protetora ao frear a frequência cardíaca em momentos de enchimento diastólico deficiente (ÖBERG; THORÉN, 1972; THORÉN, 1979).

Foi demonstrado em alguns modelos animais, que a bradicardia durante a perda sanguínea severa é precedida e correlacionada com o aumento da descarga em aferentes vagais não mielinizados. Além da bradicardia a ativação dos receptores ventriculares também foi sugerida como capaz de produzir vasodilatação renal e muscular devido à inibição da atividade nervosa simpática (ÖBERG; THORÉN, 1973; THORÉN, 1979), o que explicaria a queda da resistência vascular apresentada nessa fase. Essa hipótese é reforçada por estudos em coelhos acordados, submetidos a bloqueio dos receptores cardíacos através da injeção pericárdica de procaína durante a hemorragia. Estes estudos demonstraram um papel fundamental dos receptores cardiopulmonares na resposta hemodinâmica à hemorragia durante a fase descompensada, pois os animais apresentaram abolição da queda da resistência vascular e da inibição simpática durante a fase descompensada, que resulta em atenuação significativa da queda da pressão arterial durante a fase descompensada (BURKE; DORWARD, 1988; EVANS; LUDBROOK; POTOČNIK, 1989). Vale ressaltar que a simpatoinibição que ocorre durante hemorragia severa em ratos anestesiados pode ser abolida pela vagotomia cervical (MORGAN et al., 1988; SKOOG; MÅNSSON; THORÉN, 1985). Além disso, o aumento da atividade do nervo adrenal durante a fase descompensada, também é abolida pela vagotomia, indicando que pode haver um efeito diferencial de aferentes vagais no fluxo simpático regional (VICTOR et al., 1989).

Durante a transição da fase compensada para descompensada, a atividade dos nervos simpáticos periféricos diminui ao passo que a medula adrenal se torna mais ativa. Diversos estudos relatam um aumento considerável de epinefrina plasmática no início da hipotensão em cães, coelhos e ratos (DARLINGTON; SHINSAKO;

DALLMAN, 1986; ENGELAND et al., 1981; HAGGENDAL, 1986; RUTTER; POTOČNIK; LUDBROOK, 1987; SCHADT; GADDIS, 1988). Coelhos submetidos a adrenalectomia ou desnervação das adrenais mostram uma diminuição significativa de norepinefrina plasmática na transição da fase compensada para descompensada, enquanto que animais com as adrenais intactas não apresentam alteração da concentração plasmática (SCHADT; GADDIS, 1988). A função fisiológica desta ativação adrenal tardia na hemorragia não é clara. Alguns autores sugeriram que o aumento da liberação de epinefrina é vital para a manutenção da função circulatória durante a hemorragia quando a atividade nos nervos simpáticos periféricos é muito baixa (SCHADT; LUDBROOK, 1991; VICTOR et al., 1989).

Várias evidências demonstram que os níveis plasmáticos de vasopressina aumentam abruptamente durante a fase descompensada em animais não anestesiados (FEJES-TOTH; BRINCK-JOHNSEN; NARAY-FEJES-TOTH, 1988; LUDBROOK; POTOČNIK; WOODS, 1988; QUAIL; WOODS; KORNER, 1987; SCHADT; HASSER, 1991). Mesmo com o aumento plasmático durante a hipotensão gerada pela hemorragia, esse peptídeo não demonstra realizar ações significativas sobre os níveis de pressão arterial, durante a fase descompensada da hemorragia em alguns mamíferos de pequeno porte (JOHNSON; BENNETT; HATTON, 1988), já que o bloqueio dos receptores  $V_1$  não afeta a resposta hemodinâmica à hemorragia nessa fase em coelhos (KORNER et al., 1990; SCHADT; HASSER, 1991) ou ratos não anestesiados (FEJES-TOTH; BRINCK-JOHNSEN; NARAY-FEJES-TOTH, 1988). No entanto, não se pode descartar a ação desse peptídeo durante a fase descompensada já que em cães que não apresentam uma taquicardia basal como coelhos e ratos, quando tratados com antagonistas de receptor  $V_1$  antes ou após serem submetidos a um modelo de hemorragia moderada, apresentam níveis de pressão arterial menores do que o grupo controle. Isso sugere que a vasopressina pode desempenhar um papel importante na manutenção da pressão arterial nessa fase em alguns animais. Uma possível explicação, seria que o limiar do estímulo hemorrágico necessário para promover o aumento da concentração de vasopressina plasmática em cães, parece ser menor do que em coelhos e ratos (GOETZ; BOND; SMITH, 1974; LIARD, 1988; WANG et al., 1988). De modo semelhante durante a fase descompensada é observado um aumento plasmático da concentração dos peptídeos do sistema renina angiotensina, porém, mesmo com o aumento ocorre queda da resistência vascular

nessa fase (BOTELHO et al., 1994; EVANS et al., 2001; SCHADT; LUDBROOK, 1991; TROY et al., 2003).

Com o fim da hemorragia tem início terceira fase, caracterizada por restauração gradual de pressão arterial e frequência cardíaca, essa fase é chamada de recuperação. O aumento da concentração plasmática de peptídeos do sistema renina angiotensina que ocorre durante a fase descompensada (BOTELHO et al., 1994), contribui de forma significativa para a recuperação espontânea da hipotensão após a hemorragia. Em coelhos conscientes, a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) retarda e reduz a recuperação espontânea, além de levar a uma pressão arterial mais baixa e maior condutância vascular no intervalo após uma hemorragia severa (KORNER et al., 1990; SCHADT; GADDIS, 1990).

Assim como a Ang II, a vasopressina apresenta grande relevância durante a fase de recuperação. O bloqueio prévio do receptor  $V_1$  diminui a magnitude da recuperação espontânea da hipotensão devido a hemorragia aguda em coelhos e ratos conscientes (JOHNSON; BENNETT; HATTON, 1988; SCHADT; HASSER, 1991). Há outra evidência que sugere que a Vasopressina pode ajudar a restaurar a pressão arterial após a hemorragia. Ratos não anestesiados pré-tratados por injeção intravenosa com o antagonista  $V_1$ , a taxa de recuperação da pressão sanguínea após a hemorragia é atenuada (JOHNSON; BENNETT; HATTON, 1988). No entanto, a dose limiar para este efeito é muito menor quando o antagonista é administrado no ventrículo cerebral lateral, sugerindo que tanto um mecanismo vasopressinérgico central quanto periférico estão envolvidos na manutenção da pressão arterial após a hemorragia.

### **1.3. SISTEMA NERVOSO CENTRAL NA REGULAÇÃO HEMODINÂMICA DURANTE A HEMORRAGIA**

Há muito ainda para se compreender quanto aos mecanismos e sensores responsáveis pelas respostas adequadas em cada fase da hemorragia, bem como a organização central de redes neurais responsável pela regulação nervosa e hormonal da pressão arterial durante a hipotensão hemorrágica. Porém já é bem estabelecido que a função dos reflexos cardiovasculares, liberação de diversos hormônios e alteração do tônus autonômico requer a integridade das estruturas do bulbo, ponte e hipotalâmicas, que tem grande relação com o controle cardiovascular.



Está claro que os barorreceptores arteriais são a primeira linha de defesa na mediação das respostas reflexas à hipovolemia aguda. A deformação da parede dos vasos ativa os barorreceptores que geram os potenciais de ação que são conduzidos pelos nervos vago e glossofaríngeo até o NTS, onde estimulam neurônios de segunda ordem que se projetam para neurônios da área bulbar ventrolateral caudal (CVL) (DAMPNEY, 1994; SPYER, 1994). Os neurônios da CVL, por sua vez, inibem os neurônios da área bulbar ventrolateral rostral (RVL), através de sinapse gabaérgica (JESKE; REIS; MILNER, 1995; LI et al., 1991). Do NTS também são estimulados outros neurônios de segunda ordem que se projetam para o núcleo ambíguo (NA) uma área que constitui a origem das fibras pré-ganglionares parassimpáticas cardíacas (STUESSE, 1982). Dessa forma a estimulação dos barorreceptores produz redução reflexa da atividade simpática e aumento da atividade parassimpática vagal, através da ativação de projeções do NTS para o CVL, que por sua vez inibe o RVL, bem como do NTS para o NA, resultando em dilatação arteriolar e venosa, redução da contratilidade miocárdica e bradicardia (AICHER et al., 2000).

Regiões encefálicas também apresentam ações hemodinâmicas relevantes durante as três fases da hemorragia. O papel de regiões prosencéfálicas e mesocefálicas na regulação da resposta trifásica da hemorragia, foi avaliada em ratos submetidos a descerebração pré-colicular e pré-trigeminal (TROY et al., 2003). Verificou-se que a descerebração pré-trigeminal atenuou a queda da pressão arterial durante a fase descompensada e proporcionou níveis mais elevados de pressão durante a fase de recuperação, tanto em ratos submetidos a hemorragias de longa quanto de curta duração. Em contraste, a descerebração pré-colicular intensificou a queda da pressão arterial nas fases compensada e de recuperação em ratos submetidos a hemorragia com remoção de 30% do volume sanguíneo total em 20 minutos. Esses resultados sugerem que a integridade de estruturas do prosencéfalo é crítica para respostas compensatórias e recuperação à perda de sangue mais intensa. As estruturas do mesencéfalo são críticas para a resposta descompensada à perda progressiva de sangue, independentemente da taxa. Vale ressaltar que núcleos autonômicos encefálicos, localizados em regiões prosencefálicas também recebem aferências provenientes de barorreceptores arteriais (BADOER; MEROLLI, 1998; LI; DAMPNEY, 1994; PETROV et al., 1995; SILVEIRA et al., 2003). Além disso, neurônios que se projetam para regiões supramedulares, como os núcleos supraóptico e paraventricular (SON e PVN, respectivamente) do hipotálamo, também

são ativados durante a hemorragia em ratos (BADOER et al., 1993). Já foi demonstrado em ratos submetidos a hemorragia progressiva, que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos, abole a resposta hipotensora na fase descompensada e reduz a resposta taquicárdica no período pós-hemorragico, aparentemente por meio de um controle integrado envolvendo a atividade do sistema nervoso autônomo e a liberação de vasopressina na circulação (BUSNARDO et al., 2016).

O núcleo paraventricular do hipotálamo é um importante centro integrador, o qual apresenta ações fundamentais no controle cardiovascular, regulando o tônus simpático e o volume do fluido extracelular. Esse núcleo pode ser subdividido em duas porções principais: a magnocelular e a parvocelular. A porção magnocelular é responsável pela síntese de vasopressina, a qual que é transportada para o lobo posterior da hipófise e apresenta funções críticas no controle da pressão arterial durante a hemorragia. Os neurônios neuroendócrinos parvocelulares localizados na região periventricular do PVN se projetam para a eminência mediana e estão envolvidos na liberação de hormônios pituitários. Neurônios da divisão parvocelular também se projetam para os neurônios pré-motores e pré-ganglionares simpáticos (BADOER, 2001), localizados na área ventrolateral rostral (RVLM) e coluna intermédio-lateral (CIML). Vale ressaltar que o PVN apresenta outras conexões com núcleos de extrema importância no controle autonômico da pressão arterial como o núcleo do trato solitário (NTS) e área ventrolateral (CVLM), conferindo ao PVN um papel importante nos ajustes tônico e reflexo da atividade simpática (BADOER; MEROLLI, 1998; LI; DAMPNEY, 1994; PETROV et al., 1995; SILVEIRA et al., 2003).

Mais de 30 neurotransmissores já foram identificados no PVN (PYNER, 2009; STERN; LI; ZHANG, 2003), sendo alguns desses bem estabelecidos na literatura, como a Ang II que, além de exercer efeitos excitatórios na atividade simpática, aumenta a secreção de vasopressina (BUSNARDO et al., 2016; HESLOP; KEAY; BANDLER, 2002; KHANMORADI; NASIMI, 2017; LI; PATEL, 2003). E tanto na porção magnocelular quanto parvocelular do PVN já foi confirmada a presença dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, no qual esse peptídeo se liga (ALLEN et al., 1999; MCKINLEY et al., 1998). A angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], outro peptídeo do sistema renina angiotensina (SRA) também identificado no PVN, bem como o receptor Mas (BECKER et al., 2007), receptor através do qual esse peptídeo realiza diversas ações biológicas (SANTOS et al., 2018). Já foi demonstrado que a Ang-(1-7) pode modular a atividade simpática, podendo tanto aumentá-la quanto diminuí-la dependendo do estado do animal (HAN

et al., 2012; PATEL; SCHULTZ, 2013; PATEL et al., 2016; SUN et al., 2012; ZHENG; LIU; PATEL, 2011), de forma semelhante no PVN esse peptídeo pode levar tanto a um aumento quanto queda da secreção de vasopressina (QADRI et al., 1998; SCHIAVONE et al., 1988; WHITAKER; MOLINA, 2013), reduz a expressão de nNOS (GUIMARAES et al., 2014), melhora a sensibilidade do barorreflexo em ratos com ICC (Zeng), atenua a hipertensão de ratos com apneia do sono (DA SILVA; FONTES; KANAGY, 2011), induz queda da PA em ratos SHR (YAMAZATO et al., 2007). Também já está bem estabelecido na literatura que a Ang-(1-7) apresenta ações que, na maioria das vezes, são opostas e/ou contrarreguladoras às da Ang II (SANTOS et al., 2018). No entanto, ainda pouco se sabe sobre as ações desse heptapeptídeo no PVN durante as fases da hemorragia experimental, e quão relevante esse peptídeo pode ser nessa circunstância.

#### **1.4. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA CEREBRAL NA HEMORRAGIA**

O SRA é um sistema cuja cascata de formação inclui interações enzima-substratos que resultam na produção de vários peptídeos biologicamente ativos que desempenham importante papel no controle da pressão arterial, homeostase dos fluidos corporais, eletrólitos e função celular (FERRARIO CARLOS M. et al., 1997; SANTOS et al., 2003, 2018). Dentre esses peptídeos podemos destacar a Ang-(1-7), que realiza várias ações no sistema nervoso central (SNC), onde apresenta efeitos complexos, específicos da área ou grupamento neural e dependente da condição fisiológica do indivíduo. No SNC, assim como de forma sistêmica, a Ang-(1-7) apresenta efeitos sobre a PA, na maioria das vezes, contrários aos da Ang II. Mesmo quando a Ang-(1-7) produz efeitos cardiovasculares semelhantes aos promovidos pela Ang II, isso se dá através de diferentes mecanismos efetores e de sinalização (CAMPAGNOLE-SANTOS et al., 1989; LIMA et al., 1999; SANTOS et al., 2003, 2018; SILVA et al., 1993).

Estudos sugerem que o aumento de Ang II circulante na hipertensão resulta em inflamação vascular e aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, o que facilita o acesso da Ang II a outras regiões do cérebro (BIANCARDI et al., 2014; SETIADI et al., 2018; SHANKS; RAMCHANDRA, 2021). Uma vez que a Ang II atravessa a barreira hematoencefálica, esse peptídeo pode ativar neurônios além da barreira (YAO; MAY, 2013). O que sugere uma via pela qual a Ang II pode entrar no

cérebro em condições de alta ativação do SRA, como hipertensão e insuficiência cardíaca. A Ang II também pode influenciar os processos centrais ao sinalizar as vias neuronais dos órgãos circunventriculares (BIANCARDI; STERN, 2016). Vale destacar que o desequilíbrio dos dois braços do SRA no cérebro, favorecendo a atividade Ang II/AT<sub>1</sub> estão envolvidos na fisiopatologia de doenças como hipertensão arterial, síndrome metabólica, insuficiência cardíaca, distúrbios psiquiátricos e estresse emocional (SANTOS et al., 2018). A Ang-(1-7), também realiza ações críticas na manutenção da pressão arterial no SNC, diversos estudos sugerem que a redução dos níveis de Ang-(1-7) no NTS pode estar relacionada ao controle barorreflexo atenuado que é observado na hipertensão e no envelhecimento (ARNOLD et al., 2008; CHAVES et al., 2000; DIZ et al., 2011; HERINGER-WALTHER et al., 2001). Além disso, estudos em um modelo de rato transgênico com baixos níveis de angiotensinogênio no SNC, e, conseqüentemente, com níveis reduzidos de Ang II e Ang-(1-7), observaram que a atividade eferente simpática mediada por neurónios do PVN é suprimida nesse animal (GOMES DA SILVA et al., 2012). De modo interessante a infusão crônica de A-779 no PVN resultou em atenuação a hipertensão induzida em um modelo de apneia do sono em ratos (DA SILVA; FONTES; KANAGY, 2011), o que corrobora com o efeito estimulador simpático de injeções agudas de Ang-(1-7) no PVN. No entanto, também já foi demonstrado que microinjeções de Ang-(1-7) no PVN aumentaram efetivamente a atividade simpática e a pressão arterial por meio de uma ativação do receptor MAS pela via cAMP-PKA (HAN et al., 2012; LI et al., 2012, 2013; SUN et al., 2012; ZHOU et al., 2010). Todos esses dados reforçam a hipótese de que a produção cerebral, bem como, a ação de angiotensinas no SNC desempenha papel significativo na regulação do tônus autonômico, modulando assim a PA e FC. Alguns dos efeitos centrais da Ang-(1-7) sugerem que esse peptídeo também tem potencial para exercer modulação da pressão arterial durante a hipotensão hemorrágica. O efeito pressor induzido pela microinjeção de Ang-(1-7) no RVLM é potencializado em animais submetidos à hemorragia (LIMA et al., 1999). Tem sido sugerido que a resposta pressora da Ang-(1-7) no PVN ou RVLM seja decorrente de aumento de tônus simpático (GOMES DA SILVA et al., 2012; HAN et al., 2012), liberação de vasopressina e possível inibição de um mecanismo vasodilatador (OLIVEIRA; CAMPAGNOLE-SANTOS; SANTOS, 2013). Apesar de ser bem consolidado que a Ang-(1-7) apresenta efeito neuro-excitatório no PVN e na liberação de vasopressina (QADRI et al., 1998; SCHIAVONE et al., 1988), outros estudos sugerem o contrário.

Ratos com ICC, por exemplo apresentaram aumento da expressão e subsequente interação de ECA2 e nNOS no PVN com redução no fluxo simpático, sendo esse efeito revertido pelo bloqueio do receptor Mas com o antagonista A779 (ZHENG; LIU; PATEL, 2011). Estudos que restauraram a ECA2 em núcleos hipotalâmicos induziram um aumento de NO e diminuição na atividade do nervo simpático (KAR; GAO; ZUCKER, 2010; XIA et al., 2011). Estudos em animais submetidos ao choque hemorrágico associado à intoxicação por etanol, demonstrou que a administração intracerebroventricular (ICV) do antagonista de receptor Mas, A779, promoveu aumento dos níveis de vasopressina (WHITAKER; MOLINA, 2013), sugerindo, portanto, que nessa condição experimental a Ang-(1-7) endógena tenha efeito inibitório sobre a liberação de vasopressina. Nesse estudo foi observado aumento dos níveis de Ang-(1-7) concomitante ao aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e da produção de Óxido Nítrico (NO) no PVN, sendo esses efeitos abolidos pelo tratamento com A779. Anteriormente, foi demonstrado que o NO no PVN tem efeito inibitório sobre a liberação de vasopressina (WHITAKER; SULZER; MOLINA, 2011). Em conjunto, esses estudos sugerem que a Ang-(1-7) no PVN, através de mecanismo dependente do NO, inibe a liberação de vasopressina durante o choque hemorrágico em ratos intoxicados por etanol. Estudos in vitro e in vivo demonstram ainda que o NO exerce um papel inibitório em neurônios pré autonômicos que se projetam a RVLM, além de promover resposta inibitória em neurônios magnocelulares (STERN; LI; ZHANG, 2003; STERN; ZHANG, 2005). Entretanto é importante ressaltar que apesar do papel do NO ser amplamente estudado seu papel no SNC ainda é controverso. Já foi demonstrado que o NO também exerce um papel excitatório em neurônios parvocelulares (BAINS; FERGUSON, 1997). É importante salientar que o papel da Ang-(1-7) cerebral nos níveis de vasopressina plasmático só foi estudado em ratos submetidos a hipotensão hipovolêmica com intoxicação por etanol. Até o momento poucos estudos avaliando os efeitos da Ang-(1-7) no PVN durante a hipotensão hemorrágica foram realizados. Assim, o estudo do papel do SNC, particularmente do PVN, na manutenção da PA e FC na hipotensão hipovolêmica, bem como o papel da Ang-(1-7) e seus mecanismos, atuando nas diferentes fases da hemorragia se tornam necessários.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar o papel do PVN e particularmente da Ang-(1-7) endógena nesse núcleo nas alterações cardiovasculares que ocorrem durante as diferentes fases da hemorragia.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar os efeitos do silenciamento dos neurônios do PVN através do agonista de receptor GABA, o Muscimol, sobre as alterações de PAM e FC induzidas pela hemorragia;
- Avaliar os efeitos da microinjeção do antagonista de receptor AT<sub>1</sub>, Losartan, no PVN sobre as alterações de PAM e FC induzidas pela hemorragia;
- Avaliar os efeitos da microinjeção do antagonista de receptor Mas, o A779, no PVN sobre as alterações de PAM e FC induzidas pela hemorragia;
- Avaliar os efeitos da microinjeção de Ang-(1-7) no PVN sobre as alterações de PAM e FC induzidas pela hemorragia;
- Avaliar os efeitos da microinjeção do antagonista de A779 no PVN junto da injeção intravenosa do antagonista de receptor V<sub>1</sub>, o dTyr de sobre as alterações de PAM e FC induzidas pela hemorragia;
- Avaliar a contribuição da modulação do tônus autonômico cardíaco e vascular através da análise espectral da frequência cardíaca e pressão arterial sistólica nos efeitos induzidos pelo A779 microinjetado no PVN;
- Avaliar a participação de mecanismos nitrérgicos do PVN nos efeitos induzidos pelo A779 microinjetado no PVN, através da análise da expressão da enzima NOS nos neurônios do PVN.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. ANIMAIS**

No presente estudo foram utilizados ratos Wistar (285-375 gramas) provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em um ambiente com luz e temperatura controladas, alimentados com ração e água à vontade. Todos os procedimentos realizados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo 2, CEUA 111/2018).

#### **3.2. IMPLANTE DE CÂNULAS NO PVN**

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal e fixados a um aparelho estereotáxico. Dois pontos antropométricos do crânio - o bregma (ponto de união das suturas sagital e coronal) e o lâmbda (ponto de união das suturas sagital e lambdóide) - foram utilizados como referência para nivelar a cabeça dos animais no plano horizontal. Utilizando-se o bregma, foram determinados os pontos de introdução das cânulas bilateralmente no PVN. Nesses pontos, foram feitas trepanações do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se dois orifícios de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro para implantação das cânulas de aço inoxidável (12 x 0.55 mm d.i) que foram posicionadas bilateralmente no cérebro em direção ao PVN, conforme as coordenadas: 1,2 mm caudal ao bregma, 0,5 mm lateral à linha mediana e 6,0 mm abaixo do bregma de acordo com as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2007). As cânulas foram posicionadas 2 mm acima do PVN e fixadas ao crânio usando-se parafusos de aço inox e resina acrílica dental. Mandris metálicos (Fio de aço Morelli 0,3 mm) foram utilizados para oclusão das cânulas. Os ratos receberam injeção de 0,6 mL/kg de pentabiótico® veterinário (1:200000 Fort Dodge) por via intramuscular como medida de profilaxia, assim como 0,1mL/100g do anti-inflamatório Banamine (50mg/mL MSD) por via subcutânea. Os animais foram mantidos em caixas coletivas, em salas com temperatura e luminosidade controladas até serem submetidos à cirurgia de canulação dos vasos femorais.

### **3.3. CANULAÇÃO DAS ARTÉRIAS E VEIA FEMORAL**

No dia anterior aos experimentos os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal e submetidos à cirurgia de canulação bilateral das artérias femorais e de uma veia femoral. Uma das cânulas arteriais foi utilizada para o registro direto da pressão arterial e da frequência cardíaca e a outra para indução da hemorragia. A canulação da veia femoral foi realizada apenas nos animais do grupo experimental no qual o antagonista de receptor  $V_1$ , DTyr (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP) foi utilizado. As cânulas foram confeccionadas a partir de um tubo de polietileno PE-10 (4 cm para a artéria e 2 cm para a veia) fixado a um tubo de polietileno PE-50 (15 cm). Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução salina (NaCl 0,9%) e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Foi realizada tricotomia da região inguinal e da região interescapular do animal seguida de assepsia destes locais com álcool iodado (1%). O animal foi posicionado em decúbito dorsal, tendo as patas traseiras fixadas à mesa cirúrgica. Através de uma pequena incisão na região inguinal, o feixe vâsculo-nervoso femoral foi localizado, os vasos femorais identificados e, cuidadosamente, separados do nervo femoral para inserção das cânulas em seus respectivos vasos. Na sequência, as cânulas foram conduzidas subcutaneamente com o auxílio de um trocater e exteriorizadas na região interescapular, onde foram suturadas junto à pele, permitindo o registro e a administração de drogas nos animais com livre movimentação. Terminado o procedimento, os locais de incisão foram suturados e os animais mantidos em caixas individuais até o dia seguinte para a realização dos experimentos.

### **3.4. REGISTRO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES**

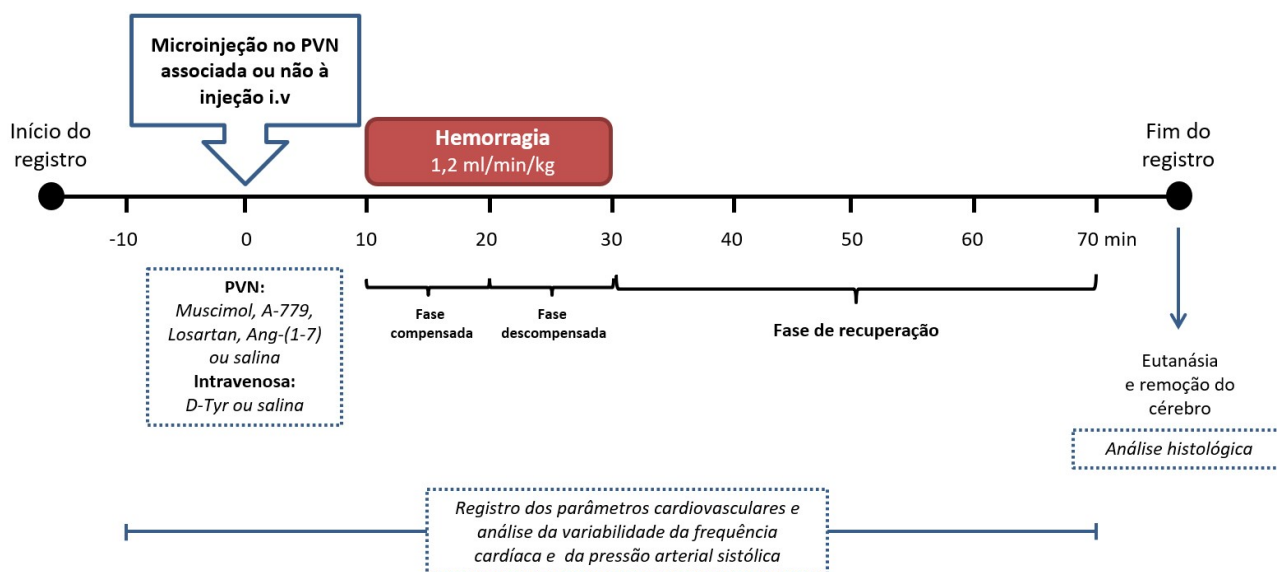
Os registros da pressão arterial e da frequência cardíaca foram realizados em animais não anestesiados e com livre movimentação um dia após o procedimento de canulação, descrito no item 3.3. Após a calibração do equipamento, uma das cânulas arteriais, previamente heparinizada (1:20), foi conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados analógico digital (Biopac Systems MP 150). O software Acqknowledge 3.9.1 foi utilizado para o registro e visualização da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Os valores de PAM e FC foram calculados pelo programa Acqknowledge (Biopac



Systems) a partir dos valores obtidos de PAP em uma frequência de amostragem de 2000 Hz. Após um período de no mínimo 60 minutos para adaptação do animal e completa estabilização da PA e FC, foi iniciado o registro dos parâmetros cardiovasculares basais por cerca de 10 minutos. Na sequência, foi realizado o procedimento de microinjeção de drogas no PVN e/ou injeção i.v. do antagonista de receptores  $V_1$  da vasopressina, e após 10 minutos, foi iniciada a indução da hemorragia, conforme descrito a seguir (item 3.5 e Figura 1). Os parâmetros cardiovasculares foram continuamente registrados ao longo de todo o período de experimento.

### **3.5. INDUÇÃO DA HEMORRAGIA**

A indução da hemorragia foi realizada de acordo com modelos descritos em estudos anteriores (BUSNARDO et al., 2016, 2021; TROY et al., 2003). Os animais foram submetidos à hemorragia de volume fixo de 24 mL/kg, correspondendo a 30% do volume sanguíneo total, durante um período de 20 min (1,2 mL/min/kg). O volume sanguíneo total do animal foi estimado como 7,5% do peso corporal (LEE; BLAUFox, 1985). A taxa utilizada de remoção de sangue promove respostas cardiovasculares que podem ser divididos em 3 períodos baseados nas alterações promovidas sobre a PAM, denominados: compensação, descompensação e recuperação (TROY et al., 2003). O sangue foi retirado através da cânula implantada em uma das artérias femorais utilizando bomba peristáltica. A PAM e a FC foram registadas durante 10 minutos antes da administração das drogas, 10 minutos após a administração das drogas, 20 min durante a hemorragia e 40 minutos após a conclusão da hemorragia. O delineamento experimental geral é mostrado na Figura1:



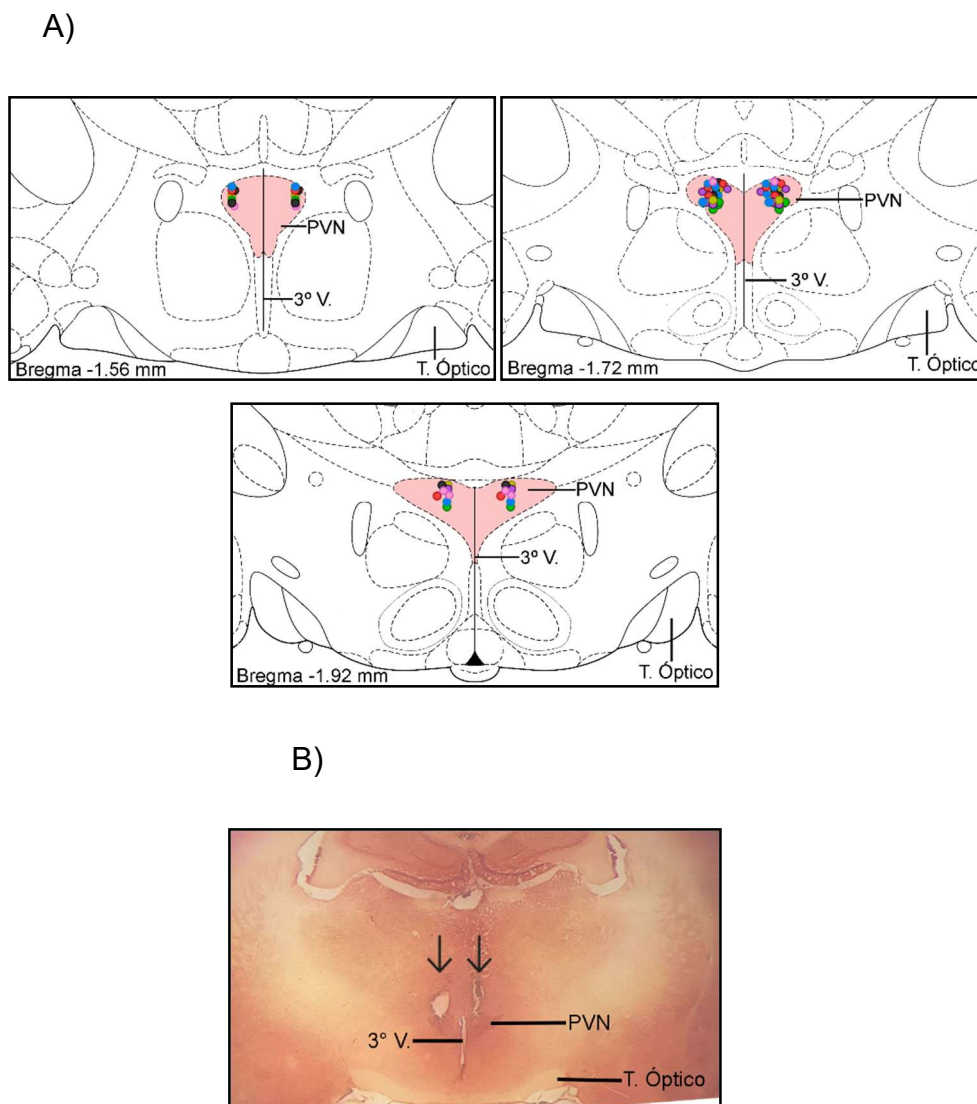
**Figura 1:** Desenho esquemático do protocolo experimental geral utilizado neste estudo. PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; dTyr: antagonista dos receptores  $V_1$  da vasopressina.

### 3.6. PREPARAÇÃO DAS DROGAS

No presente estudo foi microinjetado no PVN: 1) o antagonista do receptor Mas (A779, 1 nmol), 2) o antagonista do receptor  $AT_1$  (Losartan, 1 nmol), 3) o agonista de receptor GABA (muscimol, 1 nmol) e 4) o peptídeo Ang-(1-7) (25pmol), todos diluídos em salina estéril (NaCl 0,9%). As doses utilizadas foram baseadas em estudos anteriores do Laboratório de Hipertensão (GOMES DA SILVA et al., 2012). Essas soluções foram microinjetadas bilateralmente no PVN no volume de 100 nl. Para avaliar papel dos receptores  $V_1$  periféricos nos efeitos induzidos pelo A779 no PVN foi utilizado o antagonista DTyr (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(Me)AVP (dTyr), também diluído em salina estéril, na dose de 50 µg/mL/kg por via intravenosa (BUSNARDO et al., 2016).

### 3.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO SÍTIO DE MICROINJEÇÃO

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com Tiopental, 60mg/Kg, por via intraperitoneal, os cérebros removidos e cortes transversais de 50 µm da região do PVN foram feitos em criostato de congelamento. Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas e corados com vermelho neutro 1% através da técnica de Nissl. Os mesmos foram analisados por microscopia óptica para confirmação histológica do sítio de microinjeção, utilizando como referência o atlas de Paxinos e Watson (2007). Apenas os animais com confirmação do sítio de injeção no PVN foram considerados neste estudo (Figura 2).

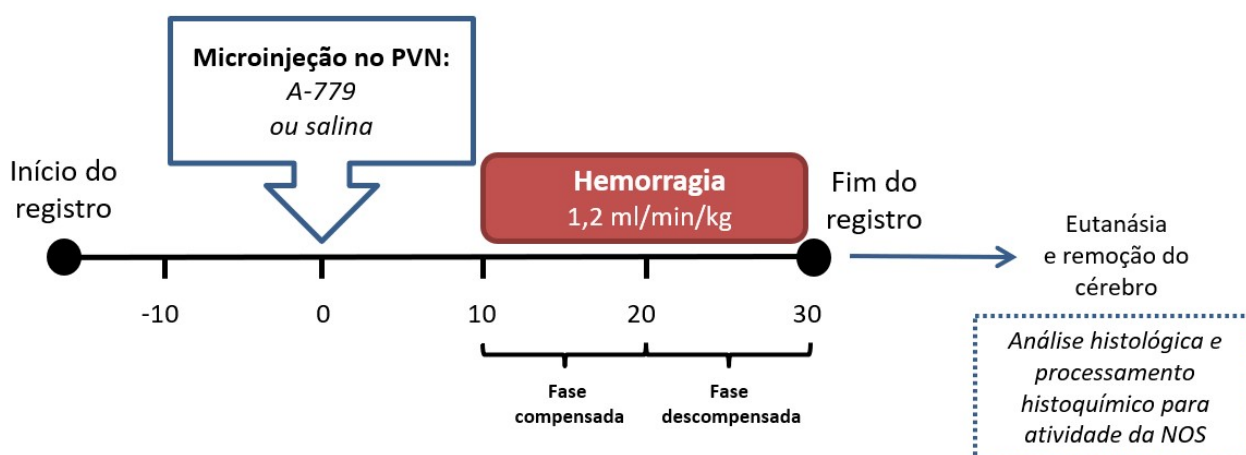


**Figura 2:** A) Representação esquemática de uma seqüência de cortes transversais do hipotálamo, ilustrando os centros das microinjeções no PVN (modificado a partir do atlas de Paxinos e Watson, 2007). Grupos: ● Salina, ● Muscimol, ● A779, ● Ang-(1-7), ● Losartan, ● Salina+dTyr e ● A779+dTyr. B) Fotomicrografia de um corte transversal do cérebro de um animal representativo do grupo estudado mostrando o sítio de microinjeção bilateral no PVN, corados pelo vermelho neutro 1% utilizando-se a técnica de Nissl. A microinjeção bilateral é indicada pelas setas. PVN (Núcleo paraventricular do hipotálamo), trato Óptico, 3° V. (terceiro ventrículo).

### 3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA NOS NO PVN

A técnica histoquímica para avaliação da atividade da NADPH-diaforase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase), utilizando azul de nitrotetrazólio como cromógeno, permite localizar células que expressam a enzima NOS no sistema nervoso, ou seja, com essa técnica é possível identificar a distribuição de neurônios

que produzem NO (HINOVA-PALOVA et al., 2014). Isso é possível porque, na existência da enzima NOS, ocorre a redução do azul de nitrotetrazólio na presença de  $\beta$ -NADPH ( $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido), que são os dois principais reagentes utilizados nessa técnica, dando origem ao formazan, que é insolúvel e possui cor azul, causando a evidenciação neuronal (HOPE et al., 1991). Para essa avaliação, os animais foram submetidos a um protocolo de hemorragia semelhante ao descrito no item 3.5, com a diferença de que foi encerrado após o fim da hemorragia (figura 3), logo após o experimento os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental (60mg/Kg, i.p.) e perfundidos transcardiacamente com 100 mL de tampão fosfato (PB 0,1M pH 7,4) contendo 0,1% de heparina concentrada (5.000 U.I./mL), seguido pela perfusão de 400 mL de paraformaldeído 4% (PFA) em PB 0,1M, ambos na taxa de 10 mL/min. Após a perfusão, os cérebros foram retirados e colocados em PFA 4% overnight na geladeira sendo, então, transferidos para solução de sacarose 30% em PB 0,1M, onde ficaram por 48h na geladeira. Posteriormente, foram realizados cortes de 40  $\mu$ m na região do PVN em criostato de congelamento. Os cortes foram lavados em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e incubados em solução contendo 0,3% Triton X-100, 0,1 mg/mL de azul de nitrotetrazólio (Sigma) e 1,0 mg/mL de  $\beta$ -NADPH (Sigma) em PB 0,1M, por 90 minutos na estufa a 37°C. Após a reação, os cortes foram novamente lavados em tampão fosfato e montados em lâminas de vidro (ZHENG et al., 2005). A presença de NADPH-diaforase no PVN foi examinada em microscópio de luz (Olympus BX50), no aumento de 10x, e o número de células com marcação positiva foi contado por meio do programa Image J.



**Figura 3:** Desenho esquemático do protocolo experimental utilizado para avaliação da atividade da enzima nos. PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; NOS: óxido nítrico sintase.

### **3.9. ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA**

A análise da variabilidade cardiovascular é realizada através da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), definida como variação batimento a batimento na FC (duração do intervalo R-R), e através da variabilidade da pressão sistólica, definida como variação entre as sístoles (BILLMAN, 2011; SHAFFER; GINSBERG, 2017; SHAFFER; MCCRATY; ZERR, 2014). A análise da variabilidade cardiovascular indexa a função neurocardíaca, gerada por interações coração-cérebro e processos dinâmicos do sistema nervoso autônomo (SHAFFER; GINSBERG, 2017). Portanto, a análise da variabilidade cardiovascular quando usada adequadamente se torna uma ótima ferramenta para avaliação do balanço simpato-vagal cardíaco.

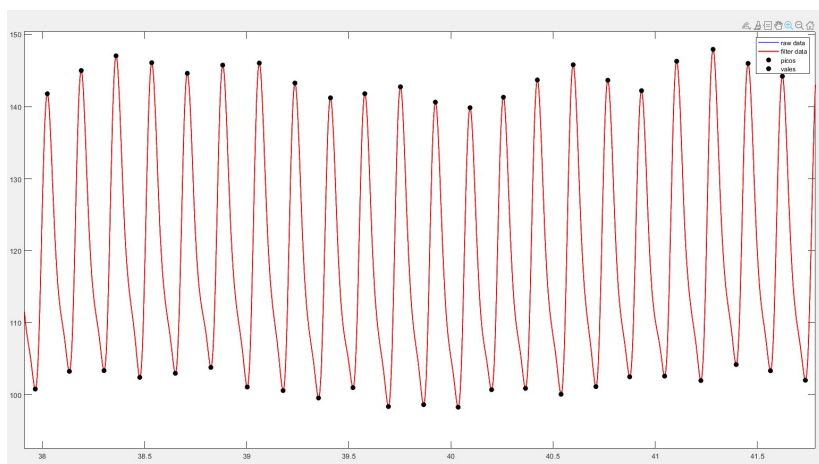
A análise da variabilidade cardiovascular pode ser realizada através de métodos lineares, que podem ser realizados no domínio do tempo ou da frequência, e métodos não-lineares que permitem quantificar a imprevisibilidade de uma série temporal (SHAFFER; GINSBERG, 2017). Nesse estudo foram utilizados os métodos lineares, realizados no domínio do tempo, ou seja, aqueles que quantificam a quantidade da variabilidade nas medições e intervalo de pulso (IP), o período entre os batimentos cardíaco sucessivos, e medições no domínio da frequência, no qual se avalia as oscilações de ondas oriundas da FC, divididas em frequências muito baixas (MBF), baixas (BF) e altas (AF) (BILLMAN, 2011; SHAFFER; GINSBERG, 2017; SHAFFER; MCCRATY; ZERR, 2014).

#### **3.9.1. PROCESSAMENTO DO ARQUIVO DE DADOS CARDIOVASCULARES**

Os valores de pressão arterial pulsátil (PAP) foram registrados continuamente e amostrados em uma taxa fixada em 2 kHz durante os experimentos processados pelo software ACQKNOWLEDGE versão 3.9.1, Biopac Systems e armazenado em disco rígido sob a forma de arquivo de dados.

Os valores da pressão arterial sistólica (PAS) foram identificados a cada batimento e o intervalo de pulso (IP) foi definido como o intervalo entre dois picos sistólicos consecutivos usando uma rotina personalizada (MATLAB academic use, Mathworks, Natick, MA, USA). Em seguida, por meio de um algoritmo (sequência de

instruções necessárias para realizar uma tarefa) foram calculados os intervalos de tempo entre os picos sistólicos (Figura 4).



**Figura 4.** Um algoritmo desenvolvido no software MATLAB detectou os picos sistólicos e diastólicos (pontos pretos) no registro da pressão arterial (em vermelho), os quais foram utilizados para o cálculo do intervalo de pulso (IP). O eixo Y representa os valores da pressão (mmHg) e o eixo X representa o tempo (ms).

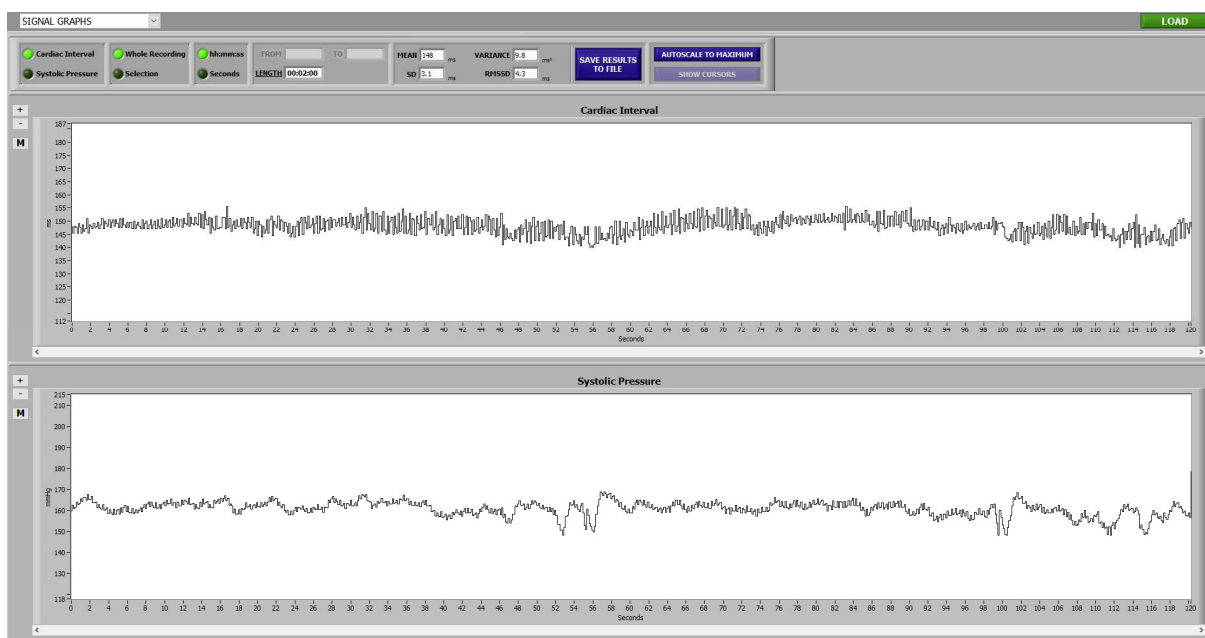
Os valores da pressão arterial sistólica e dos intervalos entre os picos sistólicos a cada batimento foram gerados em um arquivo do formato .txt. Esses arquivos foram utilizados posteriormente para a análise da variabilidade cardiovascular do domínio do tempo e no domínio da frequência.

### 3.9.2. ANÁLISE DA VARIABILIDADE CARDIOVASCULAR NO DOMÍNIO DO TEMPO E NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

Os arquivos .txt com os valores dos intervalos entre os picos sistólicos e da pressão arterial sistólica foram lidos no software CARDIOSERIES versão 2.7 (Figura 5). Este software gera os seguintes parâmetros de variabilidade no domínio do tempo:

- Média: Corresponde à soma dos valores dos IP (ms) e da PS (mmHg), dividida pelo número de elementos deste conjunto;
- Desvio padrão: Indica o grau de variação dos intervalos de pulso (ms) e da pressão sistólica (mmHg);
- Variância: Indica o grau de variação dos intervalos de pulso ( $\text{ms}^2$ ) e da pressão sistólica ( $\text{mmHg}^2$ );
- RMSSD: É a raiz quadrada média de diferenças sucessivas entre batimentos cardíacos normais. Esse valor é obtido calculando primeiro cada diferença de tempo sucessiva entre batimentos cardíacos em milissegundos. É avaliado apenas na análise

espectral da FC, e representa a atividade parassimpática (AUBERT; SEPS; BECKERS, 2003; KLEIGER; STEIN; BIGGER, 2005; PUMPRLA et al., 2002; SHAFFER; MCCRATY; ZERR, 2014).

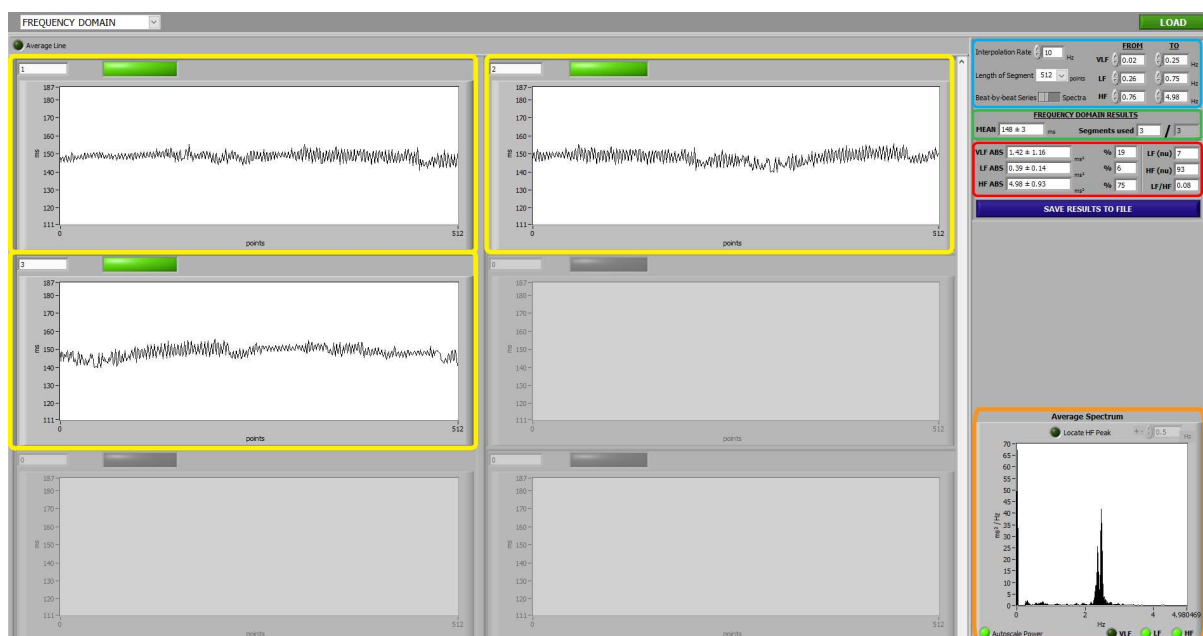


**Figura 5.** Programa CARDIOSERIES versão 2.7: A tela inicial do programa mostra os parâmetros da variabilidade no domínio do tempo. O painel superior mostra os valores do intervalo de pulso (ms) e o painel inferior mostra a pressão arterial sistólica (mmHg) em função do tempo (segundos).

Na segunda página do software CARDIOSERIES são gerados os valores dos parâmetros de variabilidade cardiovascular no domínio da frequência (Figura 6). Foram realizadas análises no domínio do tempo e da frequência onde os dados foram coletados em 4 períodos: 1) Basal (dados coletados antes da injeção das drogas); 2) Início da hemorragia (dados coletados entre os 10 minutos iniciais da hemorragia), 3) Fim da hemorragia (dados coletados entre os 5 minutos finais da hemorragia) e 4) Recuperação (dados coletados nos minutos finais do período de recuperação). Em cada período foram coletados intervalos de 2 minutos selecionados a partir do registro contínuo da pressão arterial após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Os valores da pressão arterial sistólica foram utilizados para a análise espectral em função da associação entre a variabilidade da pressão sistólica e a função simpática vasomotora (YOSHIMOTO et al., 2011). A densidade espectral foi obtida por meio da transformação rápida de Fourier e o tamanho do segmento foi fixado em 512 pontos com 50% de sobreposição.

Os componentes espectrais, para as bandas de muito baixa frequência (MBF; 0,02 – 0,25 Hz;), baixa frequência (BF; 0,26 – 0,75 Hz) e alta frequência (AF; 0,76 – 4,98 Hz) foram avaliados usando as larguras de bandas que foram previamente descritas por Cerutti et al. (1994). A variabilidade destes componentes serve como indicadores da atividade autonômica, sendo:

- Para a frequência cardíaca:
  - Componentes de MBF e BF: indicam modulação autonômica mediada pelo barorreflexo (DWORKIN; DWORKIN; TANG, 2000; GOLDSTEIN et al., 2011);
  - Componente de AF: indica atividade parassimpática cardíaca mediada pelo barorreflexo e atividade ventilatória (GOLDSTEIN et al., 2011).
- Para a pressão arterial sistólica:
  - Componentes de MBF e BF: indica atividade simpática vascular (RADAELLI et al., 2006; WAKI et al., 2006);
  - Componente de AF: indicam atividade simpática cardíaca e atividade ventilatória (YOSHIMOTO et al., 2011).



**Figura 6.** Programa CARDIOSERIES versão 2.7. Nos painéis numerados de 1 a 3 (à esquerda), estão representados os parâmetros da variabilidade no domínio da frequência em segmentos de 512 pontos (amarelo). Na parte superior e à direita, estão representados a taxa de interpolação e o tamanho do segmento (azul). No centro em verde está o valor da média, calculada a partir dos valores médios obtidos por cada um dos segmentos e número total de segmentos. Logo abaixo dentro do quadrado



vermelho estão representadas as larguras das bandas de muito baixa, baixa e alta frequência nos valores absolutos, em percentagem, em unidades normalizadas e a razão BF/AF. Na parte inferior e à direita, está representado um gráfico da densidade espectral calculada como a média da densidade dos seis segmentos analisados (laranja). O gráfico mostra um pico na banda de baixa frequência e um pico na banda de alta frequência.

### **3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

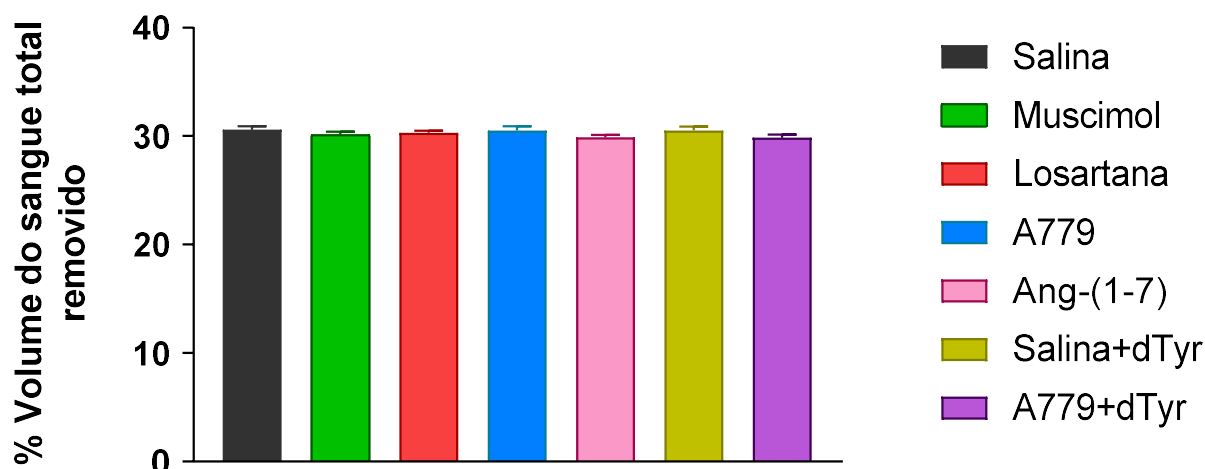
Os resultados foram inicialmente submetidos à análise de distribuição e normalidade (*Shapiro-Wilk test*). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $x \pm$  EPM). Para comparação entre grupos foi utilizada a análise de variância de duas vias (Two-Way ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni, através do software GraphPad Prism (versão 8.0). Para comparação entre os valores da variação da PAM e FC em relação ao período basal (minuto 0) foi utilizada a análise de variância de uma via (One-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE HEMORRAGIA

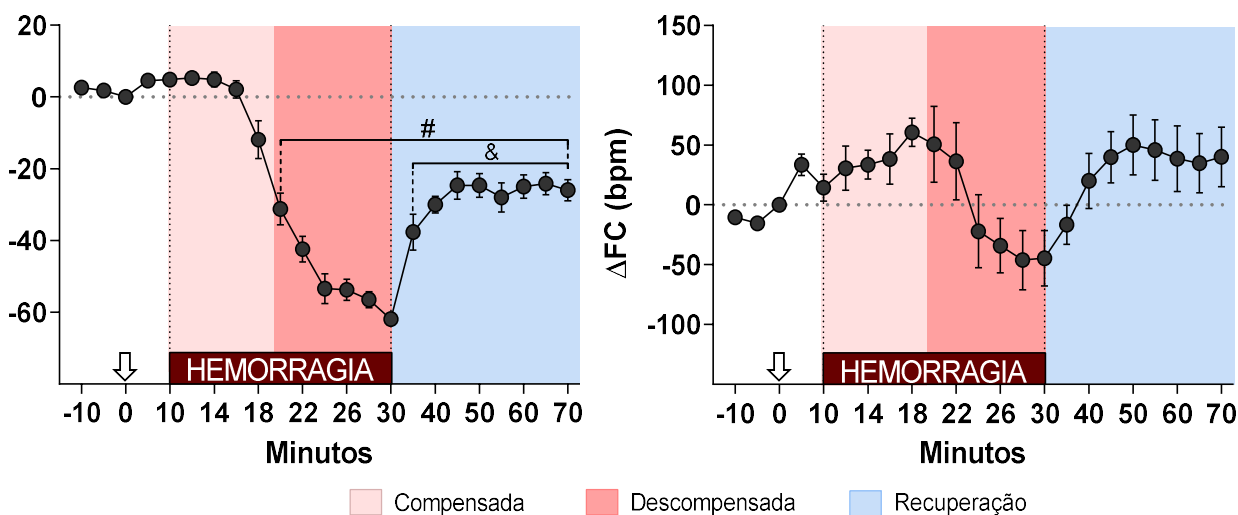
A percentagem de sangue removido em cada grupo é exibida na figura 7, mostrando que não houve diferença significativa no volume de sangue removido entre os grupos. A figura 8 ilustra a variação da PAM e FC antes, durante e após a hemorragia, é possível identificar as três fases características da hemorragia (compensada, descompensada e recuperação), determinadas a partir de alterações que ocorrem na PAM. A fase compensada compreende o período no qual a hemorragia não promove alterações significativas nos valores de PAM em relação àqueles observados no período basal. A fase descompensada se inicia no momento no qual a PAM não consegue mais ser mantida, quando observamos queda abrupta deste parâmetro que progride até o final da hemorragia. Terminada a hemorragia, tem-se início a fase da recuperação onde a PA tende a aumentar e retornar aos níveis basais. A figura 8 mostra as alterações de PAM e FC no grupo tratado com salina, utilizado como controle, onde é possível observar que a diferença significativa da variação da PAM em relação ao período basal (minuto 0) tem início 10 minutos após o começo da hemorragia ( $-31 \pm 4$  mmHg). A hipotensão continua progredindo com o decorrer da hemorragia, atingindo seu pico aos 30 minutos  $-31 \pm 4$ ,  $-42 \pm 4$ ,  $-53 \pm 4$ ,  $-54 \pm 3$ ,  $-57 \pm 2$  e  $-62 \pm 1$  mmHg aos 20, 22, 24, 26, 28 e 30 min, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Com o fim da hemorragia os animais apresentaram um aumento significativo da PAM quando comparado ao valor observado após 20 minutos de hemorragia (minuto 30), mas que não foi o suficiente para a PAM retornar aos valores basais, embora permaneça estável nesses patamares até o fim do período de registro (minuto 70) ( $-62 \pm 1$  vs  $-38 \pm 5$ ,  $-30 \pm 2$ ,  $-25 \pm 4$ ,  $-25 \pm 3$ ,  $-28 \pm 4$ ,  $-25 \pm 3$ ,  $-24 \pm 3$  e  $-26 \pm 3$  mmHg, minuto 30 vs minutos 35 ao 70, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Não foi observada diferença estatística dos valores de variação da FC durante e após a hemorragia em relação ao tempo pré-tratamento (minuto 0). O Anexo 3 contém a tabela que apresenta os valores de peso corporal (g), volume total de sangue removido (ml) e valores absolutos da PAM (mmHg) antes e ao final da hemorragia de todos os grupos experimentais.

#### 4.1.1. PERCENTAGEM DE SANGUE REMOVIDO EM 20 MINUTOS



**Figura 7.** Percentagem do volume sanguíneo removido no período 20 minutos. Grupo Salina n= 8, Grupo Muscimol n=5, A779 n =8, Losartan n=5, Ang-(1-7) n= 4, Salina+dTyr n= 5 e A779+dTyr n =5. (One-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni)

#### 4.1.2. REPRESENTAÇÃO DAS FASES DA HEMORRAGIA



**Figura 8.** Alterações da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) e da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em animais não anestesiados. As barras coloridas destacam as três fases da hemorragia: compensada, descompensada e recuperação. A seta representa o momento da microinjeção de Salina (NaCl 0,9%, n= 8). A barra vermelha próxima ao eixo x indica o período de hemorragia. # Diferença significativa em relação ao período pré-tratamento (minuto 0)  $p < 0,05$ ; & Diferença significativa em relação ao período fim da hemorragia (minuto 30)  $p < 0,05$  (One-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

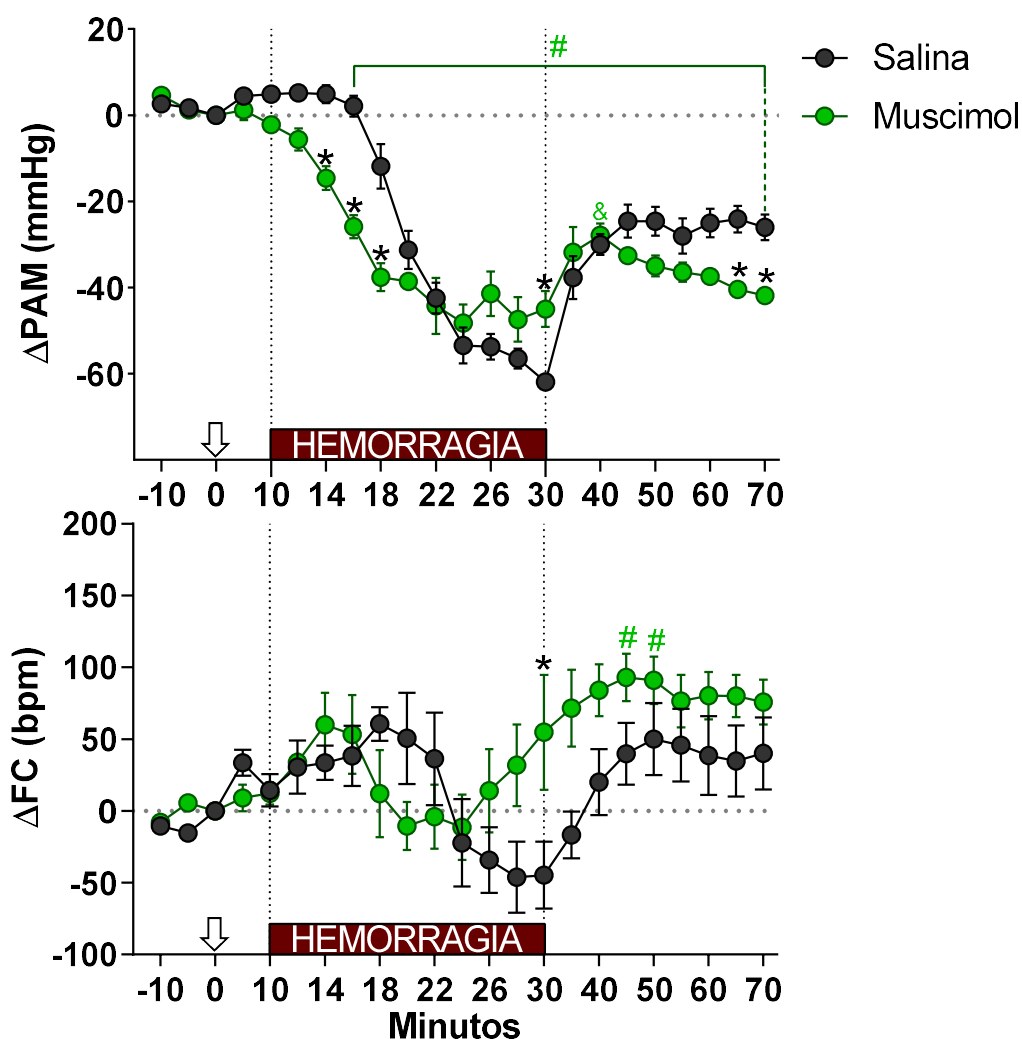
## 4.2. EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE MUSCIMOL NO PVN EM RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA

Inicialmente avaliamos o papel do PVN nas alterações cardiovasculares induzidas em nosso modelo de hemorragia experimental. Para isso o agonista de receptor GABA Muscimol foi microinjetado bilateralmente no PVN e avaliado seus efeitos sobre as alterações de PAM e FC antes, durante e após a hemorragia.

Ao analisar de modo isolado o grupo Muscimol, é possível observar que houve antecipação da fase descompensada, uma vez que a queda significativa da pressão arterial tem início 6 minutos após o começo da hemorragia, diferente do grupo Salina onde a hipotensão começa após 10 minutos. Interessantemente, a microinjeção de Muscimol no PVN reduziu o valor do pico hipotensivo ( $-48 \pm 4$  mmHg) quando comparado ao grupo Salina ( $-62 \pm 1$  mmHg), sendo este atingido mais precocemente (no minuto 24), mantendo-se estável nesse mesmo patamar até o fim da hemorragia ( $-41 \pm 5$ ,  $-47 \pm 5$  e  $-45 \pm 4$  mmHg, minuto 26 ao 30, respectivamente,  $p < 0,05$ ). A microinjeção de Muscimol também interferiu com a fase da recuperação da PAM, uma vez que não houve diferença significativa nos valores de  $\Delta$ PAM em relação ao período em que se encerra a hemorragia ( $-45 \pm 4$  mmHg vs  $-32 \pm 5$ ,  $-32 \pm 1$ ,  $-35 \pm 2$ ,  $-36 \pm 2$ ,  $-37 \pm 2$ ,  $-40 \pm 1$  e  $-42 \pm 2$  mmHg, minuto 30 vs minutos 35 ao 70, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Adicionalmente, no final da fase da recuperação (minutos 65 e 70) o grupo Muscimol apresentou valores inferiores de PAM em comparação ao grupo Salina ( $-24 \pm 3$  e  $-26 \pm 3$  mmHg vs  $-40 \pm 1$  e  $-42 \pm 2$  mmHg, minutos 65 e 75, respectivamente  $p < 0,05$ ).

Em relação às alterações de FC, o grupo Muscimol apresentou taquicardia apenas durante um curto intervalo da recuperação ( $+93 \pm 17$  e  $+91 \pm 17$  bpm, minutos 45 e 50 respectivamente,  $p < 0,05$ ). Em comparação ao grupo Salina somente nos minutos finais da hemorragia (minuto 30) foi observada diferença significativa ( $-45 \pm 23$  bpm vs  $+55 \pm 40$  bpm,  $p < 0,05$ ) Figura 9.

## 4.2.1. SALINA VS MUSCIMOL



**Figura 9.** Efeito da microinjeção bilateral de Muscimol no PVN sobre as alterações da PAM (mmHg) e FC (bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em ratos não anestesiados. A seta representa o momento da microinjeção de Salina (NaCl 0,9%, n= 8) ou Muscimol (1 nmol, n= 5); \* Diferença significativa em relação ao grupo Salina,  $p < 0,05$  (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni); # Diferença significativa em relação ao minuto 0 do respectivo grupo,  $p < 0,05$  & Diferença significativa em relação ao minuto 30 do respectivo grupo,  $p < 0,05$  (One-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

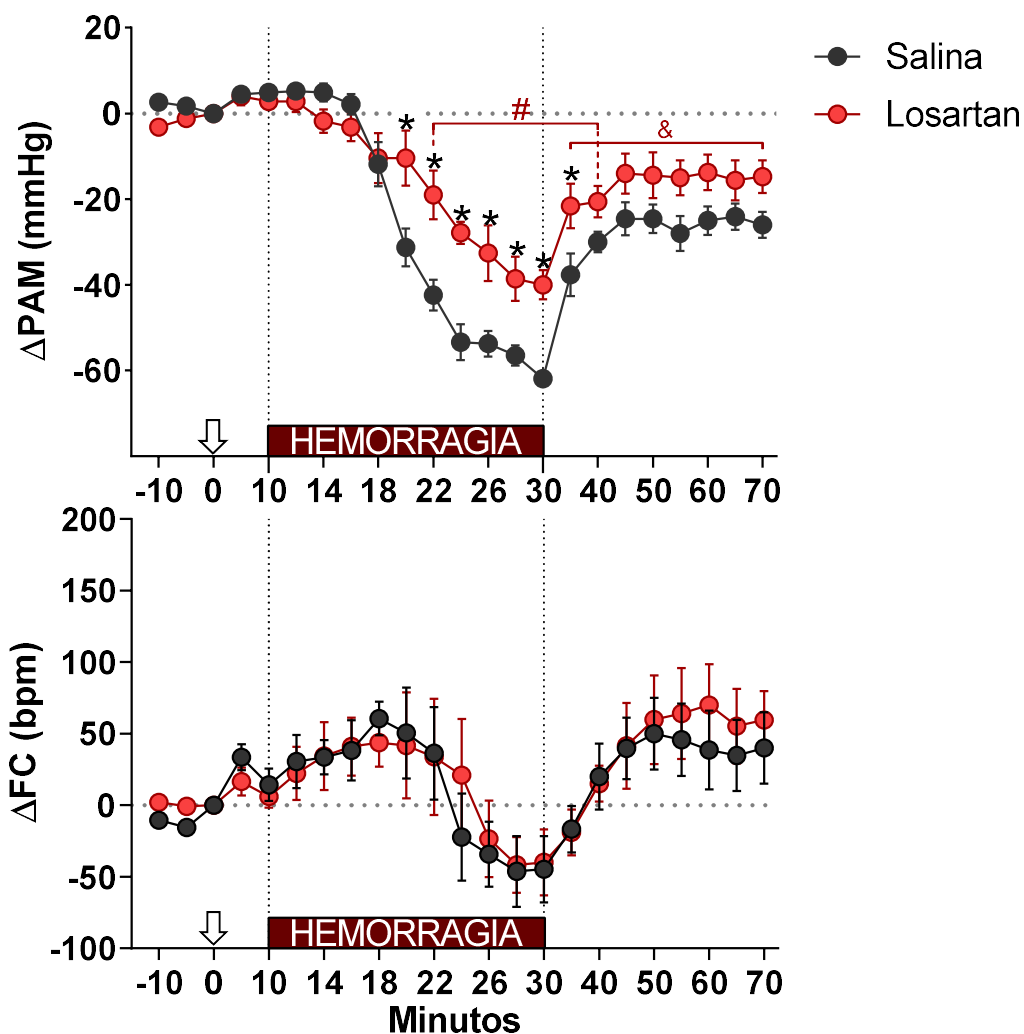
### 4.3. EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE LOSARTAN NO PVN EM RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA

Considerando que tanto a Ang II quanto a Ang (1-7) promovem respostas simpatoexcitatórias no PVN (GOMES DA SILVA et al., 2012; HAN et al., 2012; KHANMORADI; NASIMI, 2017), mesmo que por mecanismos diferentes, avaliamos o efeito do bloqueio bilateral dos receptores AT<sub>1</sub> no PVN em ratos submetidos à hemorragia experimental, através da microinjeção do antagonista Losartan, para avaliação de seus efeitos sobre a variação da PAM e FC antes, durante e após a hemorragia.

A microinjeção bilateral de Losartan no PVN promoveu efeitos sobre a PAM semelhantes aos observados pela microinjeção de A779 (Anexo 4) com queda da pressão arterial em relação ao período basal tendo início após 12 minutos de hemorragia, se mantendo em queda progressiva até o fim da hemorragia ( $-10 \pm 6$ ,  $-19 \pm 6$ ,  $-28 \pm 3$ ,  $-33 \pm 7$ ,  $-39 \pm 5$  e  $-40 \pm 3$  mmHg, minutos 20 ao 30, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Ao final da hemorragia ocorre recuperação completa da PAM, observada pelo fato da PAM se elevar de forma significativa em relação ao pico da hipotensão no final da hemorragia (minuto 30), sendo que 15 minutos após o término da hemorragia os valores de pressão arterial não foram diferentes àqueles observados no período basal (minuto 0) ( $-14 \pm 5$ ,  $-14 \pm 5$ ,  $\pm 15 \pm 4$ ,  $-14 \pm 4$ ,  $-16 \pm 5$  e  $-15 \pm 4$  mmHg, minutos 45 a 70, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Em relação às alterações de FC promovidas pelo Losartan, não foi observado diferença estatística nesse parâmetro em nenhuma das fases, durante ou após a hemorragia, em comparação ao período basal.

Quando comparado ao grupo Salina a microinjeção de Losartan atenuou a queda da pressão arterial ao longo da hemorragia, fazendo com que o pico da hipotensão hemorrágica fosse reduzido (grupo Salina:  $-31 \pm 4$ ,  $-42 \pm 4$ ,  $-53 \pm 4$ ,  $-54 \pm 3$ ,  $-57 \pm 2$  e  $-62 \pm 1$  mmHg vs grupo Losartan:  $+10 \pm 6$ ,  $-19 \pm 6$ ,  $-28 \pm 3$ ,  $-33 \pm 7$ ,  $-39 \pm 5$  e  $-40 \pm 3$  mmHg, minutos 20 ao 30, respectivamente,  $p < 0,05$ ). De forma surpreendente, apesar da hipotensão hemorrágica ter sido atenuada no grupo Losartan, as alterações sobre a variação da FC ao longo do experimento não foram diferentes daquelas observadas no grupo Salina (Figura 10).

## 4.3.1. SALINA VS LOSARTAN



**Figura 10.** Efeito da microinjeção bilateral de Losartan no PVN sobre as alterações da PAM (mmHg) e FC (bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em ratos não anestesiados. A seta representa o momento da microinjeção de salina (NaCl 0,9%, n = 8) ou Losartan (1 nmol, n= 5); \* Diferença significativa em relação ao mesmo período do grupo Salina,  $p < 0,05$ . (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni); # Diferença significativa em relação ao minuto 0 do respectivo grupo,  $p < 0,05$ ; & Diferença significativa em relação ao minuto 30 do respectivo grupo,  $p < 0,05$  (One-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

#### 4.4. EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE A779 NO PVN EM RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA

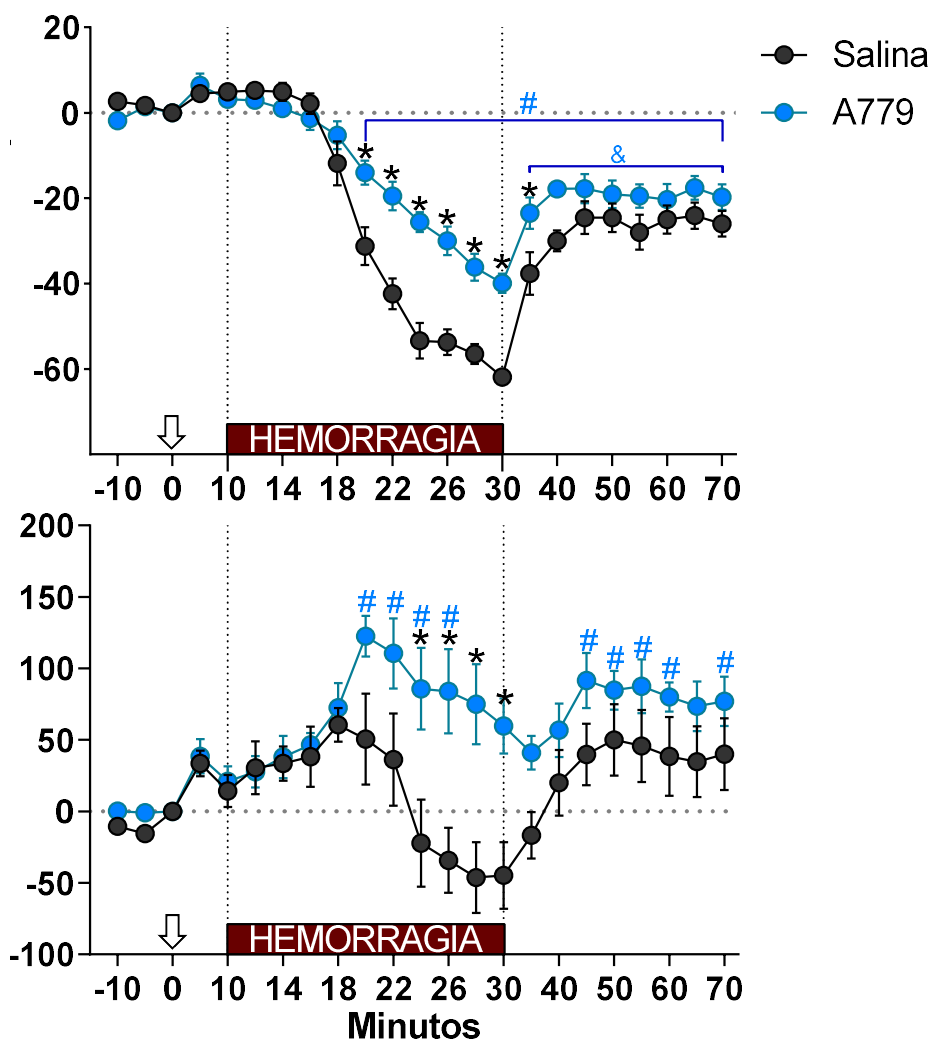
Para avaliar o papel da Ang-(1-7) endógena no PVN sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela hemorragia experimental, o antagonista do receptor Mas A779 foi microinjetado bilateralmente no PVN e foi avaliado as alterações da PAM e FC antes, durante e após a hemorragia.

O grupo A779 apresentou perfil de queda da pressão arterial induzida pela hemorragia de modo qualitativamente semelhante ao grupo Salina, iniciando após 10 minutos de hemorragia (minuto 20) e apresentando queda progressiva até o fim remoção do sangue ( $-14 \pm 3$ ,  $-20 \pm 3$ ,  $-26 \pm 2$ ,  $-30 \pm 3$ ,  $-36 \pm 3$  e  $-40 \pm 2$  mmHg, minutos 20 ao 30, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Com o fim da hemorragia, tem início a fase da recuperação, quando é observado aumento progressivo da pressão arterial quando comparado ao período em que a hemorragia foi finalizada ( $-40 \pm 2$  vs  $-24 \pm 4$ ,  $-18 \pm 2$ ,  $-18 \pm 3$ ,  $-19 \pm 3$ ,  $-20 \pm 3$ ,  $-20 \pm 4$ ,  $-17 \pm 3$  e  $-20 \pm 3$ , minuto 30 vs minutos 35 ao 70, respectivamente,  $p < 0,05$ ), embora a PAM se mantenha em níveis mais baixos quando comparado ao período basal. A queda da pressão arterial durante a hemorragia no grupo A779 foi acompanhada por taquicardia ( $+123 \pm 14$ ,  $+111 \pm 24$ ,  $+86 \pm 28$  e  $+84 \pm 30$  bpm, minutos 20 ao 26, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Também foi observada taquicardia durante a maior parte da fase de recuperação ( $+92 \pm 19$ ,  $+85 \pm 14$ ,  $+88 \pm 19$ ,  $+80 \pm 10$  e  $+77 \pm 17$  bpm, minutos 45 ao 70, respectivamente,  $p < 0,05$ ).

Quando comparado ao grupo Salina, a microinjeção de A779 resultou em atenuação da taxa de redução da PA ao longo período de hemorragia, resultando em atenuação do pico de hipotensão ao final da hemorragia (minuto 30) (Salina:  $-31 \pm 4$ ,  $-42 \pm 4$ ,  $-53 \pm 4$ ,  $-54 \pm 3$ ,  $-57 \pm 2$  e  $-62 \pm 1$  mmHg vs A779:  $-14 \pm 3$ ,  $-20 \pm 3$ ,  $-26 \pm 2$ ,  $-30 \pm 3$ ,  $-36 \pm 3$  e  $-40 \pm 2$  mmHg, minutos 20 ao 30, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Em função dos menores valores de hipotensão hemorrágica, o grupo A779 também apresentou uma recuperação da PAM mais ágil comparada ao grupo controle Salina:  $-38 \pm 5$  mmHg vs A779:  $-24 \pm 4$  mmHg, minuto 35,  $p < 0,05$ ). Por fim, o menor valor de hipotensão ao longo da hemorragia no grupo A779, quando comparado ao grupo Salina, pode ser atribuído à resposta compensatória de taquicardia que ocorre à partir do minuto 24 (grupo Salina:  $-22 \pm 30$ ,  $-34 \pm 23$ ,  $-46 \pm 25$  e  $-45 \pm 23$  bpm vs grupo A779:  $+86 \pm 28$ ,  $+84 \pm 30$ ,  $+75 \pm 28$  e  $+75 \pm 28$  bpm, minutos 24 ao 30, respectivamente,  $p < 0,05$ ) Figura 11.



## 4.4.1. SALINA VS A779



**Figura 11.** Efeito da microinjeção bilateral de A779 no PVN sobre as alterações da PAM (mmHg) e FC (bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em ratos não anestesiados. A seta representa o momento da microinjeção de Salina (NaCl 0,9%, n = 8) ou A779 (1 nmol, n = 8); \* Diferença significativa em relação grupo Salina,  $p < 0,05$  (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni); # Diferença significativa em relação ao minuto 0 do respectivo grupo,  $p < 0,05$ ; & Diferença significativa em relação ao minuto 30 do respectivo grupo,  $p < 0,05$  (One-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

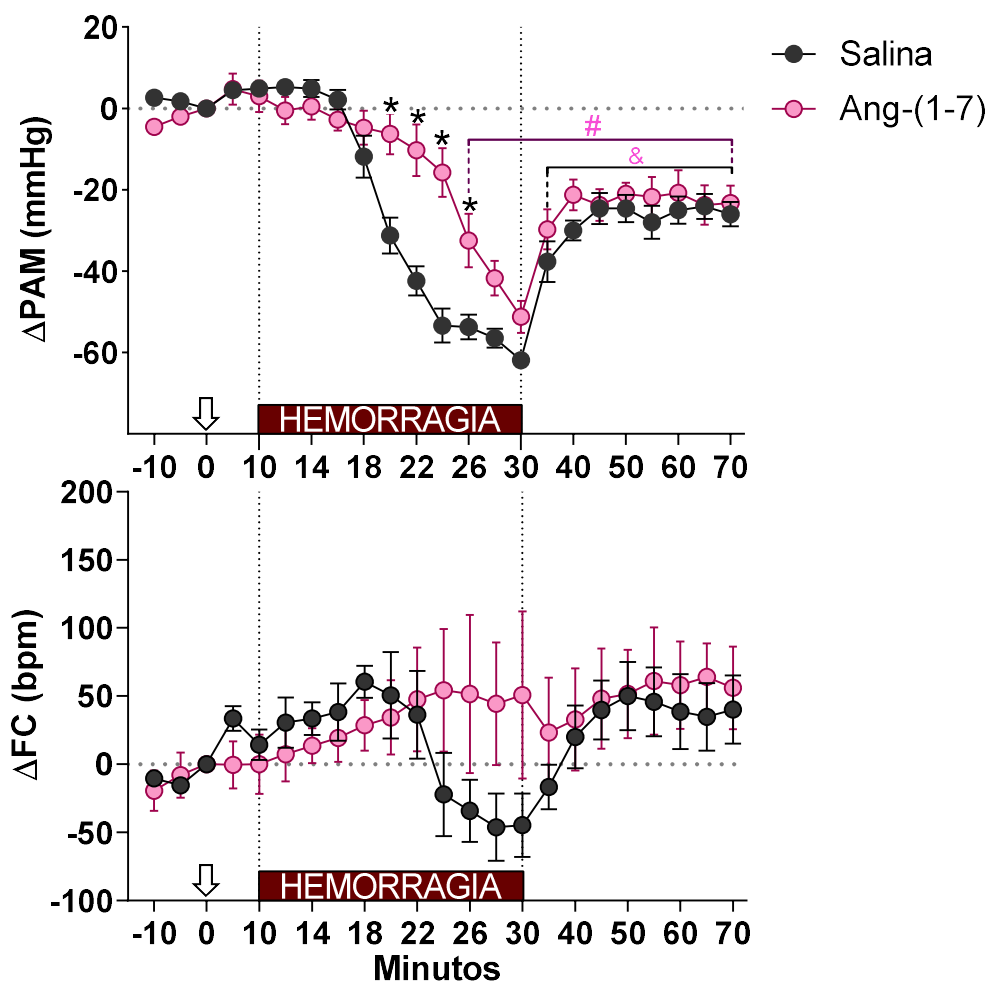
#### 4.5. EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE ANG-(1-7) NO PVN EM RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA

Além da investigação da ação da Ang-(1-7) endógena através do bloqueio dos receptores Mas do PVN, também foi avaliado os efeitos da Ang-(1-7) microinjetada diretamente no PVN de ratos submetidos a hemorragia. Os animais tratados com este peptídeo apresentaram queda da PAM em relação ao período basal após 16 minutos do início da hemorragia  $-33 \pm 7$ ,  $-42 \pm 4$  e  $-52 \pm 4$  mmHg, minutos 26 a 30, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Finalizada a hemorragia e iniciada a fase da recuperação, houve aumento significativo da pressão arterial, mas que não foi o suficiente para retornar os valores desse parâmetro aos níveis basais (minuto 0), ( $-51 \pm 4$  mmHg vs  $-30 \pm 5$ ,  $-21 \pm 4$ ,  $-24 \pm 4$ ,  $-21 \pm 3$ ,  $-22 \pm 5$ ,  $-21 \pm 6$ ,  $-24 \pm 5$  e  $-23 \pm 4$  mmHg, minuto 30 vs minutos 35 ao 70, respectivamente,  $p < 0,05$ ). A microinjeção de Ang-(1-7) no PVN não promoveu alterações significativas sobre as variações de FC que ocorrem durante e após a hemorragia (Figura 12).

Quando comparado ao grupo Salina, o grupo tratado com Ang-(1-7) apresentou atraso no início da fase descompensada da pressão arterial, uma vez que a hipotensão induzida pela hemorragia ocorreu somente à partir da segunda metade desse período (grupo Salina:  $-31 \pm 4$ ,  $-42 \pm 4$ ,  $-53 \pm 4$  e  $54 \pm 3$  vs grupo Ang-(1-7):  $-6 \pm 5$ ,  $-10 \pm 6$ ,  $-16 \pm 6$  - e  $-33 \pm 7$  mmHg, minutos 20 ao 26, respectivamente,  $p < 0,05$ ), sem no entanto reduzir de forma significativa o valor do pico desta hipotensão (minuto 30) comparado ao grupo Salina [ $-62 \pm 1$  vs  $-51 \pm 4$  mmHg, Salina vs Ang-(1-7)]. Em relação à FC, a microinjeção de Ang-(1-7) não promoveu alterações significativas nesse parâmetro durante e após a hemorragia em relação ao grupo Salina (Figura 12).

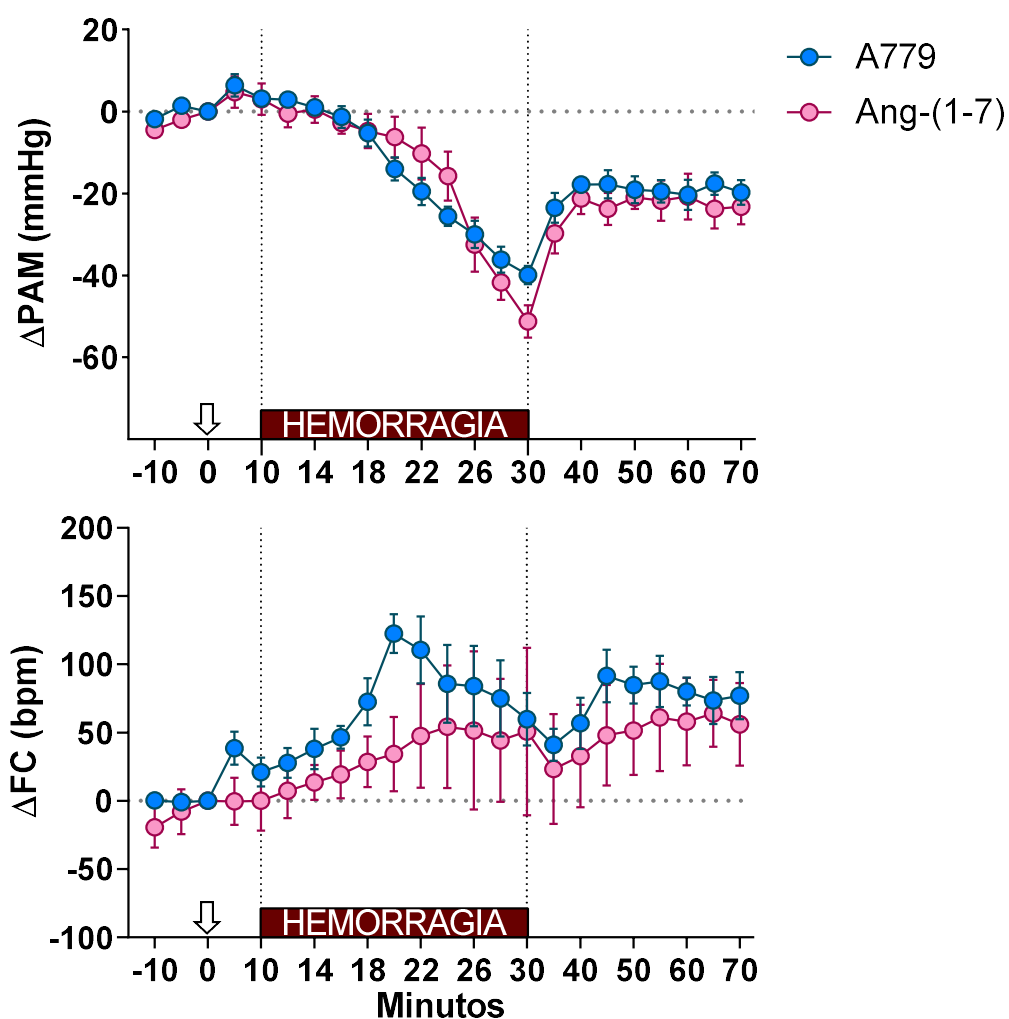
De forma surpreendente, quando comparamos os efeitos da microinjeção de Ang-(1-7) com o antagonista do receptor Mas, o A779, no PVN não observamos diferenças significativas entre os tratamentos sobre as alterações de PAM e FC induzidas pela hemorragia (Figura 13).

## 4.5.1. SALINA VS ANG-(1-7)



**Figura 12.** Efeito da microinjeção bilateral de Ang-(1-7) no PVN sobre as alterações da PAM (mmHg) e FC (bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em ratos não anestesiados. A seta representa o momento da microinjeção de salina (NaCl 0,9%, n = 8) ou Ang-(1-7) (25 pmol, n= 4); \* Diferença significativa em relação ao mesmo período do grupo Salina,  $p < 0,05$  (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni); # Diferença significativa em relação ao minuto 0 do respectivo grupo,  $p < 0,05$ ; & Diferença significativa em relação ao minuto 30 do respectivo grupo,  $p < 0,05$  (One-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

## 4.5.2. A779 VS ANG-(1-7)



**Figura 13** Efeito da microinjeção bilateral de Ang-(1-7) no PVN sobre as alterações da PAM (mmHg) e FC (bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em ratos não anestesiados. A seta representa o momento da microinjeção de A779 (1 nmol, n=8) ou Ang-(1-7) (25 pmol, n= 4); (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

#### 4.6. EFEITOS DO BLOQUEIO PERIFÉRICO DOS RECEPTORES V<sub>1</sub> DA VASSOPRESSINA SOBRE AS ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO A779 NO PVN DE RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA

Para avaliar se os efeitos do A779 microinjetado no PVN sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela hemorragia experimental poderiam envolver mecanismo dependente da ação da vasopressina periférica, o antagonista de receptor V<sub>1</sub> (dTyr, i.v.) foi utilizado.

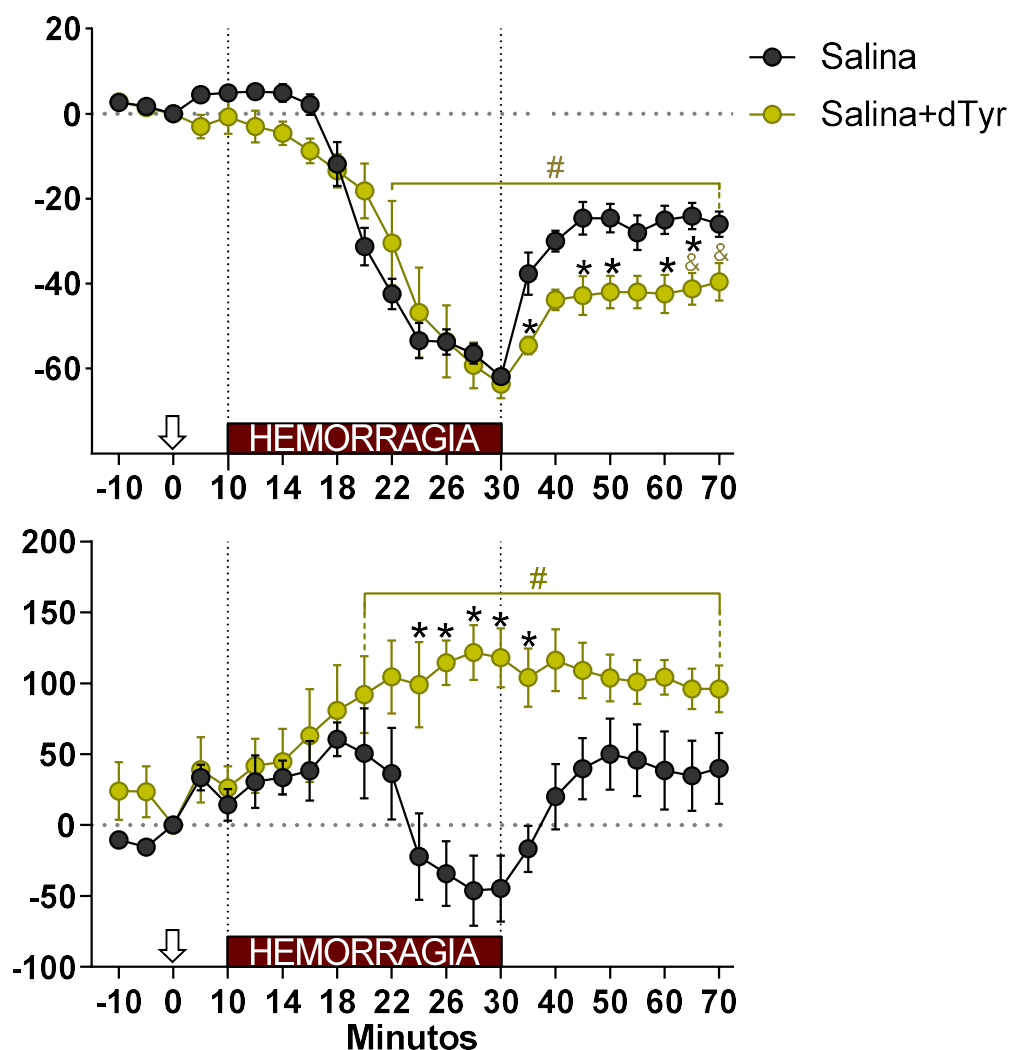
Inicialmente avaliamos os efeitos do tratamento com dTyr sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela hemorragia no grupo de ratos submetidos à microinjeção de Salina no PVN. Este grupo apresentou queda da pressão arterial em relação ao período basal após 12 minutos de hemorragia ( $-30 \pm 9$ ,  $-47 \pm 11$ ,  $-54 \pm 9$ ,  $-59 \pm 5$  e  $-64 \pm 3$  mmHg, minutos 22 ao 30, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Entretanto, o bloqueio dos receptores V<sub>1</sub> não promoveu alterações significativas, nem no decurso temporal nem no valor do pico da hipotensão hemorrágica, quando comparado ao grupo apenas com Salina no PVN. Já na fase da recuperação, após o período da hemorragia, o bloqueio dos receptores V<sub>1</sub> atenuou a elevação da PAM que ocorre nessa fase, sendo observada diferença significativa nos valores de pressão arterial durante boa parte do período de recuperação (grupo Salina:  $-38 \pm 5$ ,  $-25 \pm 4$ ,  $-25 \pm 3$ ,  $-25 \pm 3$  e  $-24 \pm 3$  mmHg vs grupo Salina + dTyr:  $-55 \pm 2$ ,  $-43 \pm 5$ ,  $-42 \pm 4$ ,  $-42 \pm 5$  e  $-41 \pm 4$  mmHg, minutos 35 ao 65, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Sobre as variações de FC, o tratamento com Salina+dTyr induziu taquicardia significativa, tanto em relação ao período basal ( $+92 \pm 27$ ,  $+105 \pm 26$ ,  $+99 \pm 30$ ,  $+115 \pm 16$ ,  $+122 \pm 19$ ,  $+118 \pm 21$ ,  $+104 \pm 21$ ,  $+116 \pm 22$ ,  $+109 \pm 19$ ,  $+104 \pm 16$ ,  $+101 \pm 16$ ,  $+104 \pm 12$ ,  $+96 \pm 14$  e  $+96 \pm 17$  bpm, minutos 20 ao 70, respectivamente,  $p < 0,05$ ), quanto em relação ao grupo tratado somente com Salina (grupo Salina:  $-22 \pm 31$ ,  $-34 \pm 23$ ,  $-46 \pm 25$  e  $-45 \pm 23$  bpm vs grupo Salina+dTyr:  $+99 \pm 30$ ,  $+114 \pm 16$ ,  $+122 \pm 19$  e  $+118 \pm 21$  bpm, minutos 24 ao 30, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Figura 14.

Na sequência avaliamos os efeitos do tratamento com dTyr sobre a ação do A779 no PVN nas alterações cardiovasculares induzidas pela hemorragia. O tratamento simultâneo com dTyr interferiu com o efeito do A779 na fase descompensada, uma vez que o antagonista V<sub>1</sub> aboliu o efeito do A779 sobre a redução da hipotensão que ocorre durante o período da hemorragia, resultando em resposta hipotensora de maior magnitude (grupo A779:  $-30 \pm 3$ ,  $-36 \pm 3$  e  $-40 \pm 2$

mmHg vs grupo A779+dTyr:  $45 \pm 9$ ,  $-53 \pm 8$  e  $-58 \pm 6$  mmHg, minutos 26 ao 30, respectivamente,  $p < 0,05$ ). O pré-tratamento com dTyr também interferiu no efeito do A779 na fase de recuperação, uma vez que os valores de PAM nessa fase atingem valores menores (grupo A779:  $-23 \pm 4$ ,  $-18 \pm 4$ ,  $-19 \pm 3$ ,  $-20 \pm 4$  e  $-18 \pm 3$  mmHg vs grupo A779+dTyr:  $-41 \pm 5$ ,  $-38 \pm 3$ ,  $-41 \pm 2$ ,  $-37 \pm 3$  e  $-37 \pm 3 \pm x$  mmHg, minutos 35 ao 70, respectivamente,  $p < 0,05$ ) (Figura 15). Entretanto, em relação aos efeitos do A779 sobre as variações da FC que ocorrem antes, durante e após a hemorragia, o bloqueio dos receptores  $V_1$  não promoveu alterações significativas sobre esse parâmetro. (Figura 15).

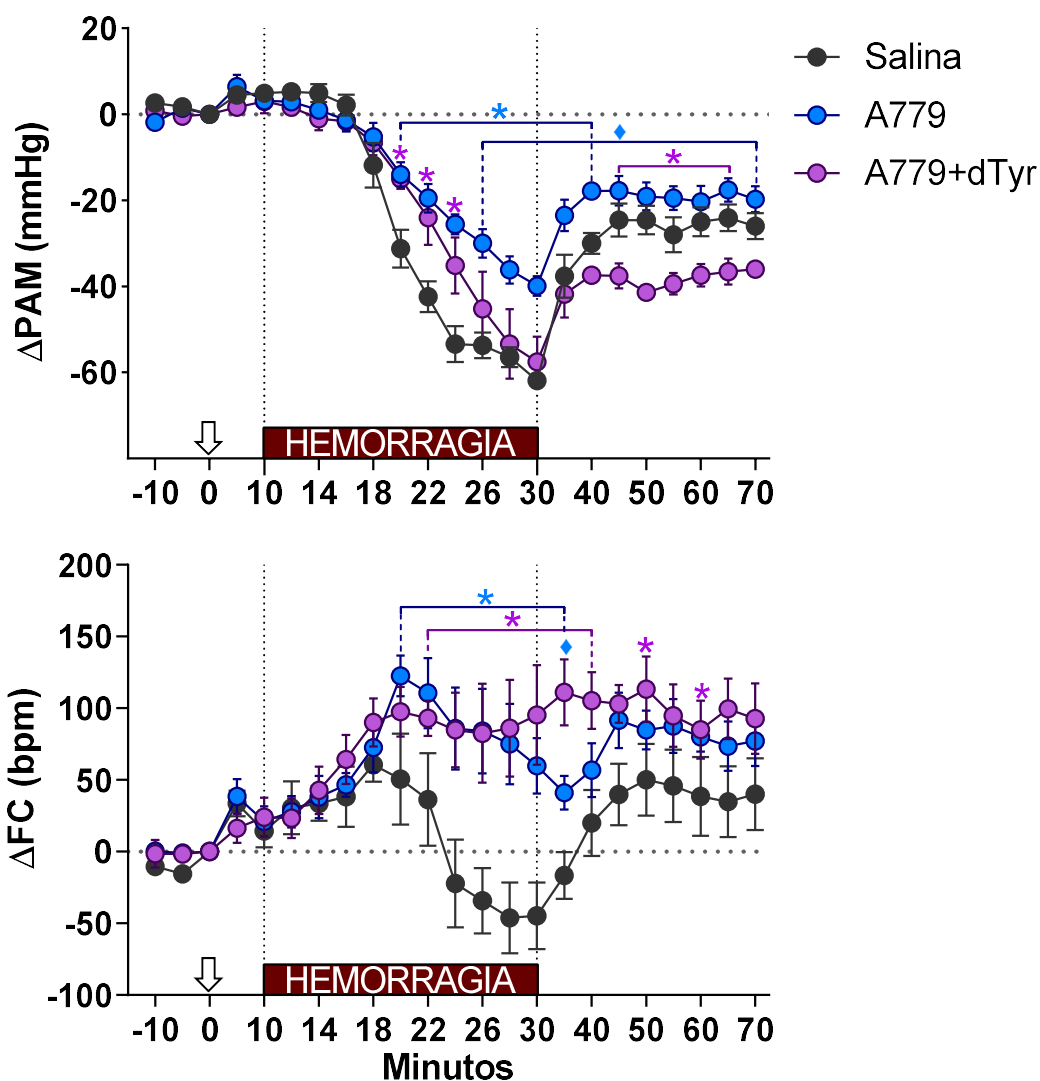
Ao compararmos o grupo A779+dTyr com o grupo Salina+dTyr observamos que não há diferença significativa sobre as alterações de PAM e FC que ocorrem nas várias fases da hemorragia (Anexo 5).

## 4.6.1 SALINA VS SALINA + DTYR



**Figura 14.** Efeito da microinjeção bilateral de salina no PVN junto da injeção i.v. do antagonista de receptor  $V_1$  sobre as alterações da PAM (mmHg) e FC (bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em ratos não anestesiados. A seta representa o momento da microinjeção bilateral de Salina (NaCl 0,9%,  $n = 8$ ) ou Salina junto da injeção i.v de dTyr (50  $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{kg}$ ,  $n=5$ ); \* Diferença significativa em relação ao mesmo período do grupo Salina,  $p < 0,05$  (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni); # Diferença significativa em relação ao minuto 0 do respectivo grupo,  $p < 0,05$ ; & Diferença significativa em relação ao minuto 30 do respectivo grupo,  $p < 0,05$  (One-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

## 4.6.2. A779 VS A779+DTYR



**Figura 15.** Efeito da microinjeção bilateral de A779 no PVN junto da injeção i.v. do antagonista de receptor  $V_1$  sobre as alterações da PAM (mmHg) e FC (bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em ratos não anestesiados. A seta representa o momento da microinjeção de Salina (NaCl 0,9%, n = 8), A779 (1 nmol, n = 8) ou A779 + dTyr (50  $\mu$ g/mL/kg, n = 5); \* e \* Diferença significativa do respectivo grupo em relação ao grupo salina, e ♦ diferença significativa do grupo A779 em relação grupo A779+dTyr  $p < 0,05$  (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni);

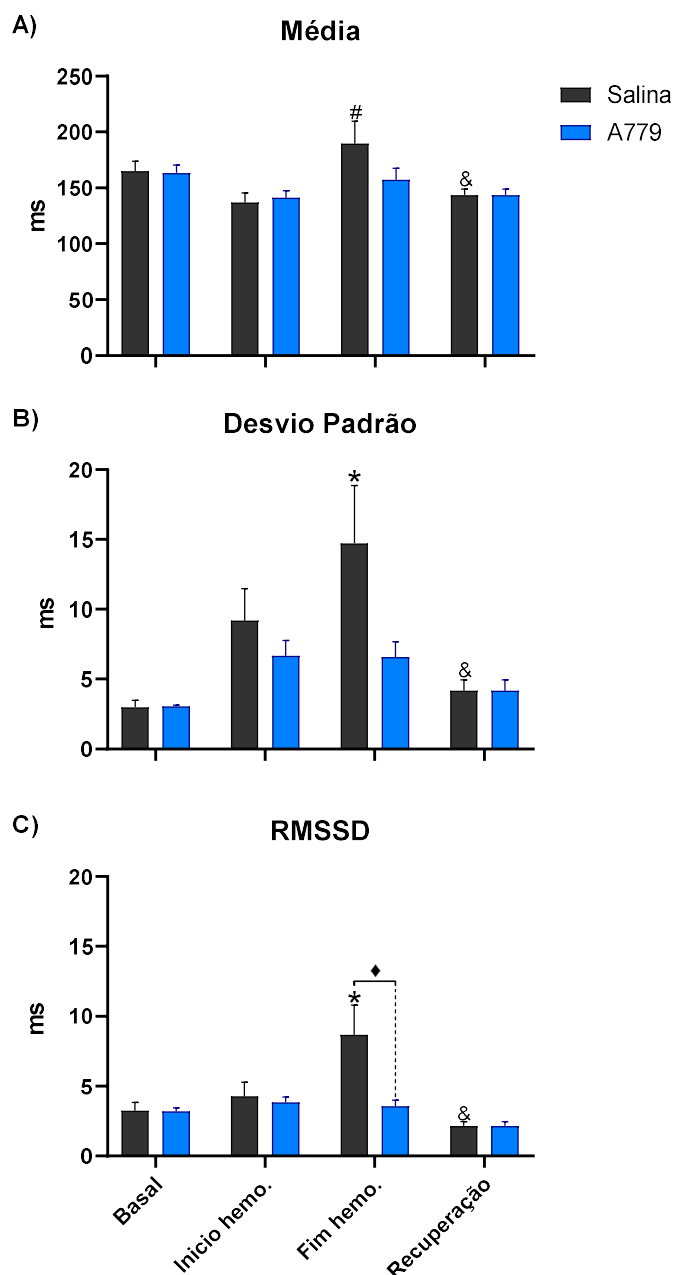


#### 4.7. ANÁLISE DA DENSIDADE ESPECTRAL DA FC SOBRE O EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE A779 NO PVN DE RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA

A influência da microinjeção de A779 no PVN sobre a densidade espectral da frequência cardíaca foi avaliada em 4 períodos: 1) basal, 2) início da hemorragia, 3) fim da hemorragia e 4) recuperação. Como pode ser observado na figura 16 A onde é apresentado o gráfico da Média, os ratos do grupo Salina apresentaram valores de intervalo de pulso superiores no período final da hemorragia em comparação com ao início da hemorragia ( $137 \pm 9$  vs  $190 \pm 20$  ms,  $p < 0,05$ ), tendo esses valores do final da hemorragia retornado aos níveis basais na fase de recuperação ( $190 \pm 20$  vs  $144 \pm 5$  ms,  $p < 0,05$ ). A figura 16 B, que compara o Desvio Padrão antes, durante (início e fim) e após a hemorragia, mostra que os ratos do grupo Salina apresentaram maior variação da frequência cardíaca no período final da hemorragia quando comparado ao período basal ( $3 \pm 0,4$  vs  $15 \pm 4$  ms,  $p < 0,05$ ), os quais também retornaram aos valores basais no período de recuperação ( $15 \pm 4$  vs  $4 \pm 1$  ms,  $p < 0,05$ ). De forma semelhante, o índice RMSSD (representa a atividade parassimpática) apresentou o mesmo padrão, onde a variação da frequência cardíaca no período final da hemorragia foi maior do que o período basal ( $3 \pm 1$  vs  $9 \pm 2$  ms,  $p < 0,05$ ) e retornou aos valores basais no período de recuperação ( $9 \pm 2$  vs  $2 \pm 0,3$  ms,  $p < 0,05$ ). O tratamento com A779 aboliu o aumento do índice RMSSD observado no período final da hemorragia ( $9 \pm 2$  vs  $4 \pm 0,4$  ms,  $p < 0,05$ ) Figura 16 C.

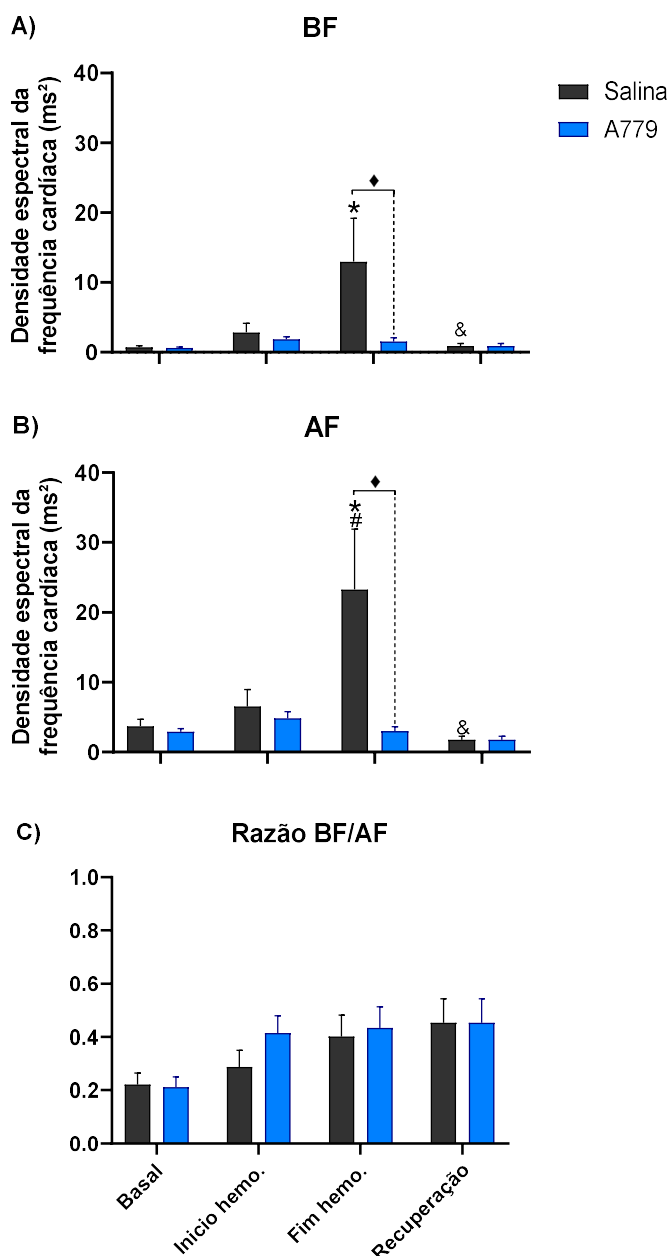
Quanto ao domínio da frequência podemos observar aumento dos componentes de BF e AF do grupo Salina no período final da hemorragia quando comparado ao período basal (BF:  $1 \pm 0,2$  vs  $13 \pm 6$  ms,  $p < 0,05$ ; AF:  $4 \pm 1$  vs  $23 \pm 9$  ms,  $p < 0,05$ ) figura 17 A e B. Na fase da recuperação a elevação dos componentes de BF e AF retornam aos valores basais (BF:  $1 \pm 0,2$  vs  $0,9 \pm 0,3$  ms, AF:  $4 \pm 1$  vs  $2 \pm 0,5$  ms  $p < 0,05$ ). A microinjeção de A779 no PVN aboliu a elevação dos componentes de BF e AF que ocorre no fim da hemorragia no grupo Salina (BF:  $13 \pm 6$  vs  $2 \pm 1$  ms,  $p < 0,05$ ; AF:  $23 \pm 9$  vs  $2 \pm 0,4$  ms,  $p < 0,05$ ) figura 16 A e B. Por fim não houve diferença significativa da razão BF/AF entre os grupos antes, durante ou após a hemorragia, bem como, não houve diferença significativa entre os grupos nos períodos início da hemorragia, fim da hemorragia e recuperação quando comparados ao período basal figura 17 C.

#### 4.7.1. VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA: DOMÍNIO DO TEMPO



**Figura 16.** Efeito da microinjeção bilateral de A779 (1nmol, n= 8) ou salina (NaCl 0,9%, n= 8) no PVN sobre as alterações da densidade espectral da frequência cardíaca: Média (painel A), Desvio Padrão (painel B) e RMSSD (painel C) nos períodos antes, durante (início e fim) e após a hemorragia em ratos não anestesiados. ♦ Diferença significativa em relação ao grupo Salina; \* Diferença significativa em relação ao período basal do respectivo grupo; # Diferença significativa em relação ao período início hemorragia. do respectivo grupo; & Diferença significativa em relação ao período fim da hemorragia do respectivo grupo,  $p < 0,05$  (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

#### 4.7.2. VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA: DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA



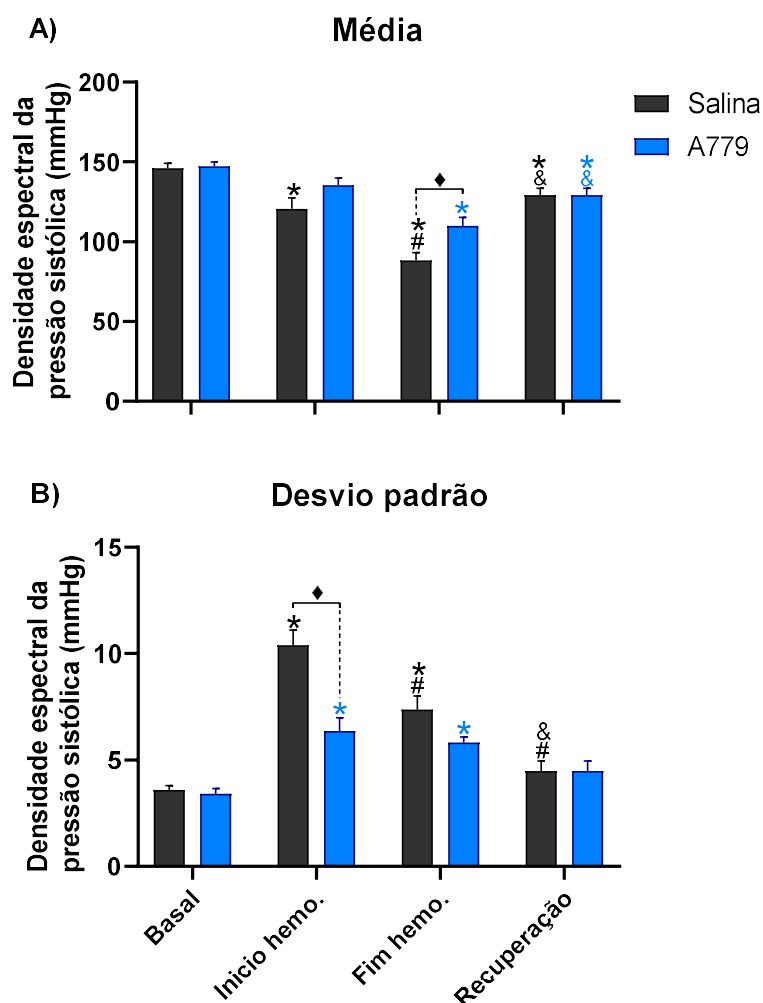
**Figura 17.** Efeito da microinjeção bilateral de A779 (1nmol, n= 8) ou salina (NaCl 0,9%, n= 8) no PVN sobre as alterações densidade espectral da frequência cardíaca:Baixa Frequência (BF, painel A), Alta frequência (AF, painel B) e Razão BF/AF (painel C) nos períodos antes, durante (início e fim) e após a hemorragia em ratos não anestesiados. ♦ Diferença significativa em relação ao grupo Salina; \* Diferença significativa em relação ao período basal do respectivo grupo; # Diferença significativa em relação ao período início hemorragia do respectivo grupo; & Diferença significativa em relação ao período fim da hemorragia do respectivo grupo,  $p < 0,05$  (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

#### 4.8. ANÁLISE DA DENSIDADE ESPECTRAL DA PS SOBRE O EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE A779 NO PVN DE RATOS SUBMETIDOS A HEMORRAGIA

A influência da microinjeção de A779 no PVN sobre a densidade espectral da pressão sistólica também foi avaliada através dos dados coletados nos mesmos períodos relatados no item anterior. Ao analisar a PS média é possível observar um padrão similar ao da análise da  $\Delta$ PAM entre estes grupos (Figura 11), onde a pressão sistólica média do grupo Salina apresentou queda já no período inicial da hemorragia comparado ao período basal ( $146 \pm 3$  vs  $140 \pm 7$  mmHg,  $p < 0,05$ ), que foi ainda mais atenuada no fim da hemorragia ( $146 \pm 3$  vs  $88 \pm 5$  mmHg,  $p < 0,05$ ) tendendo a retornar aos valores basais no período de recuperação ( $146 \pm 3$  vs  $129 \pm 4$  mmHg,  $p < 0,05$ ). O grupo A779 apresentou queda PS Média somente no período final da hemorragia ( $147 \pm 3$  vs  $110 \pm 5$  mmHg,  $p < 0,05$ ) e um ligeiro aumento da pressão sistólica que também não foi capaz de retornar aos valores basais na recuperação ( $146 \pm 3$  vs  $129 \pm 4$  mmHg,  $p < 0,05$ . Figura 18A). O tratamento com A779 resulta em menor queda da PS Média no fim da hemorragia ( $88 \pm 5$  vs  $110 \pm 5$  mmHg,  $p < 0,05$ ). Finalizando a análise do domínio do tempo, o grupo Salina apresentou maior labilidade da pressão arterial (Desvio Padrão) durante a toda a hemorragia (início e fim) comparados ao período basal ( $4 \pm 0,2$  vs  $10 \pm 0,7$  e  $7 \pm 0,7$  mmHg,  $p < 0,05$ ), a qual foi normalizada na fase de recuperação. O grupo A779 também apresentou um padrão similar de maior labilidade durante o período de hemorragia comparado ao basal ( $3 \pm 0,2$  vs  $6 \pm 0,6$  e  $6 \pm 0,3$  mmHg,  $p < 0,05$ ). Porém o A779 apresentou menor labilidade no período inicial da hemorragia quando comparado ao grupo Salina ( $10 \pm 0,7$  vs  $6 \pm 0,6$  mmHg,  $p < 0,05$ ) Figura 18B.

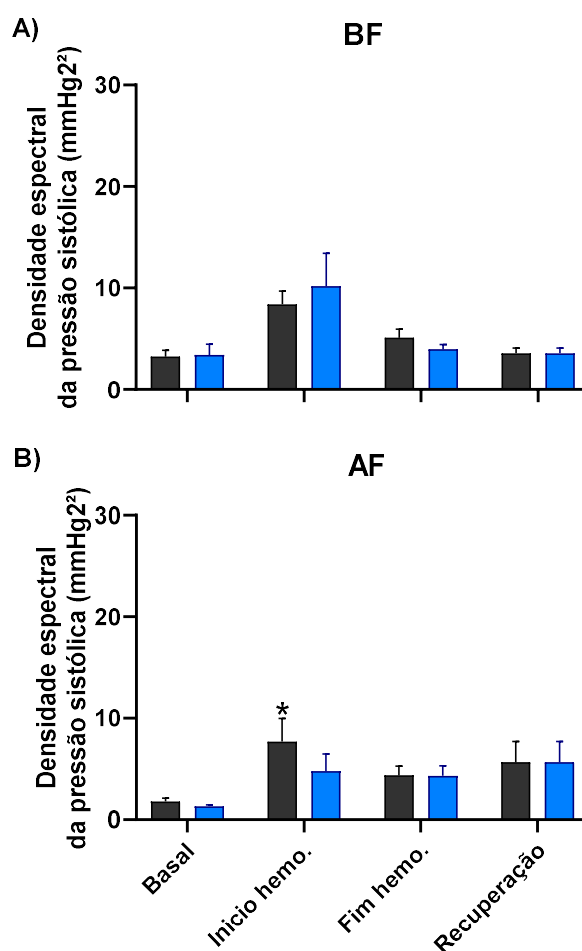
Na análise do domínio da frequência, o grupo Salina apresentou um aumento no componente de AF apenas no período inicial da hemorragia comparado ao basal ( $2 \pm 0,3$  vs  $8 \pm 2$  mmHg<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ) Figura 19A. Por sua vez, no grupo A779 não foi observado diferença dos componentes de BF e AF em nenhum dos períodos Figura 19B.

#### 4.8.1. VARIABILIDADE DA PRESSÃO SISTÓLICA: DOMÍNIO DO TEMPO



**Figura 18.** Efeito da microinjeção bilateral de A779 (1nmol, n= 8) ou salina (NaCl 0,9%, n= 8) no PVN sobre as alterações da densidade espectral da pressão sistólica: Média (painel A) e Desvio Padrão (painel B) nos períodos antes, durante (início e fim) e após a hemorragia em ratos não anestesiados. ♦ Diferença significativa em relação ao grupo Salina; \* e \* Diferença significativa em relação ao período basal do respectivo grupo; # Diferença significativa em relação ao período início hemorragia do grupo Salina; & Diferença significativa em relação ao período fim da hemorragia do grupo Salina, p<0,05 (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

#### 4.8.2. VARIABILIDADE DA PRESSÃO SISTÓLICA: DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

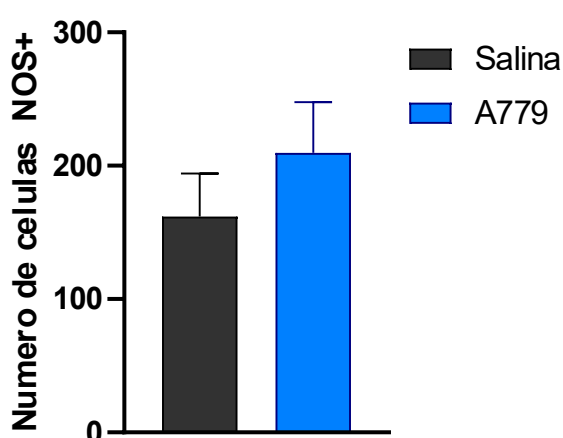


**Figura 19.** Efeito da microinjeção bilateral de A779 (1nmol, n= 8) ou salina (NaCl 0,9%, n= 8) no PVN sobre as alterações densidade espectral da frequência cardíaca:Baixa Frequência (BF, painel A) e Alta frequência (AF, painel B) nos períodos antes, durante (início e fim) e após a hemorragia em ratos não anestesiados. \* Diferença significativa em relação ao período basal do respectivo grupo  $p < 0,05$  (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

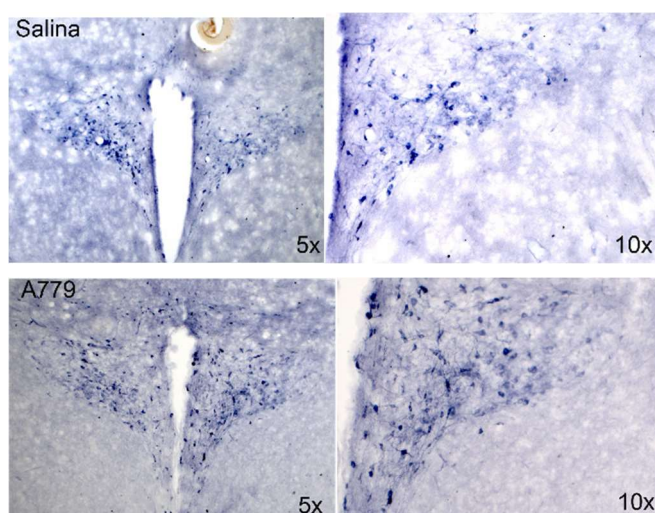
#### 4.9. AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS NITRÉRGICOS DO PVN NOS EFEITOS DO A779: ATIVIDADE DA NADPH-DIAFORASE EM NEURÔNIOS DO PVN DE RATOS SUBMETIDOS A HEMORRAGIA

A expressão da NADPH-diaforase foi utilizada como uma maneira indireta de avaliar se o tratamento com A779 altera a expressão da enzima NO sintase no PVN de animais submetidos a hemorragia. Como mostrado na Figura 20, não houve diferença significativa do número de neurônios NADPH-diaforase positivos entre os grupos Salina e A779 no PVN.

A)



B)



**Figura 20.** Alteração da expressão da enzima NADPH-diaforase nos neurônios do PVN induzida pela microinjeção bilateral de Salina (NaCl 0,9%, n=5) ou A779 (1 nmol, n=3) em ratos submetidos a hemorragia (painel A). Fotomicrografias de seções transversais do PVN no aumento de 5 e 10x de um animal representativo do grupo Salina e de um animal representativo do grupo A779 (painel B)

## 5. DISCUSSÃO

Nossos dados sugerem um papel modulatório do PVN sobre a pressão arterial durante as fases compensada e recuperação da hemorragia, já que a inibição promovida pela microinjeção bilateral de Muscimol no PVN levou a queda antecipada da pressão arterial e prejudicou a sua recuperação após a hemorragia. Além disso, nossos dados mostram que os peptídeos Ang II e Ang-(1-7) podem ter ação endógena relevante na manutenção da pressão arterial durante a hemorragia, já que tanto a microinjeção bilateral de Losartan quanto de A779, promoveu atenuação da queda da pressão arterial no fim da hemorragia e recuperação mais ágil. Os efeitos do A779 parecem ser dependentes de ação sobre a síntese/liberação de vasopressina periférica. Vale ressaltar que a microinjeção de A779 reduziu a hipotensão e a labilidade da pressão sistólica durante a fase descompensada, possivelmente por uma atenuação do tônus vagal, que levou a redução da resposta bradicárdica durante a fase descompensada.

A hemorragia é um estímulo estressor complexo onde a variação da duração bem como da intensidade do estímulo hemorrágico pode gerar respostas encefálicas distintas. Por exemplo, ratos submetidos a decerebração de regiões prosencefálicas e hemorragia de taxa fixa de 24 mL/kg em um período de 20 minutos, apresentam queda antecipada e recuperação prejudicada da pressão arterial após o fim da hemorragia em relação ao grupo controle, enquanto ratos submetidos a descerebração da mesma região e submetidos a hemorragia na mesma taxa, porém, em um período de 40 minutos não apresentam essa queda antecipada da pressão arterial nem diferenças nos níveis pressóricos na fase de recuperação (TROY et al., 2003). Em nosso trabalho utilizamos o modelo de hemorragia em uma taxa fixa de 24 mL/kg totalizando remoção de uma quantidade fixa de 30% do volume sanguíneo total em um período de 20 minutos, por ter se mostrado uma boa estratégia experimental por gerar respostas hemodinâmicas trifásicas claras (compensação, descompensação e recuperação), sendo o período de retirada de sangue normalmente composto por durações próximas de compensação e descompensação (BARCROFT; EDHOLM, 1945; BUSNARDO et al., 2016, 2021; EVANS et al., 1991; LUDBROOK; POTOCHNIK; WOODS, 1988; SCHADT; LUDBROOK, 1991; TROY et al.,



2003). Usando esse modelo foi possível avaliar o papel do PVN em ratos não anestesiados durante essas fases da hemorragia através do silenciamento deste núcleo pela microinjeção do agonista de receptor GABA. Nossos dados corroboram os achados de Troy (2003) onde ratos submetidos ao mesmo modelo de hemorragia e descerebração de regiões prosencefálicas apresentaram queda antecipada da pressão arterial e prejuízo da fase de recuperação.

Escolhemos o PVN como nosso alvo no SNC por ser um importante centro integrador, apresentando ações fundamentais no controle cardiovascular, regulando o tônus simpático e o volume do fluido extracelular (KRUKOFF; MACTAVISH; JHAMANDAS, 1997; MENDONÇA et al., 2018; PYNER, 2009; WATKINS; CORK; PYNER, 2009). Estudos anteriores já sugeriram o envolvimento do PVN nos circuitos cerebrais envolvidos no ajuste cardiovascular durante desafios ortostáticos, onde o bloqueio da neurotransmissão sináptica com cloreto de cobalto inibiu o aumento da PAM durante o desafio ortostático (DE ANDRADE et al., 2012). Além disso, é importante ressaltar que diversos estudos sugerem que modelos experimentais de hemorragia e hipotensão são capazes de causar ativação maciça de neurônios neurosecretores magnocelulares e parvocelulares no PVN (BADOER; MEROLLI, 1998; KRUKOFF; MACTAVISH; JHAMANDAS, 1997; LI; DAMPNEY, 1994; PETROV et al., 1995; ROBERTS et al., 1993). Em ratos já foi demonstrado a existência de duas vias pressoras glutamatérgicas no PVN, uma via simpática que é mediada por receptores NMDA e outra via vasopressinérgica que é mediada por receptores não-NMDA (BUSNARDO; TAVARES; CORRÊA, 2009), e que estas vias estão envolvidas na mediação das respostas cardiovasculares à hemorragia, por meio de um controle integrado envolvendo atividade do sistema nervoso e liberação de vasopressina na circulação. Além disso, já foi sugerido que os receptores não-NMDA localizados no PVN parecem contribuir para o retorno da pressão arterial aos valores basais durante a fase de recuperação (BUSNARDO et al., 2016). Nossos dados corroboram esses dados ao sugerir que o PVN tem um papel fundamental no controle dos parâmetros cardiovasculares, onde possivelmente contribui com as respostas que participam da manutenção da PA em níveis normais na fase compensada da hemorragia, além de ter papel no retorno da mesma para níveis basais na fase da recuperação.

O sistema renina-angiotensina (SRA) também tem papel importante na modulação dos parâmetros cardiovasculares no PVN. O aumento da atividade da

renina plasmática tem sido consistentemente relatado durante a fase compensada da hemorragia em cães, coelhos e ratos não anestesiados (FEJES-TOTH; BRINCK-JOHNSEN; NARAY-FEJES-TOTH, 1988; OLIVER et al., 1990; SCHADT; LUDBROOK, 1991; WANG et al., 1983, 1988). Hoje sabemos que os peptídeos do SRA apresentam papéis biologicamente ativos na modulação da pressão arterial agindo no coração, pulmão, vasos sanguíneos e sistema nervoso central, sendo a Ang II um dos peptídeos com ações biológicas mais descritas na literatura, como potente vasoconstritor agindo periféricamente aumentando a resistência periférica total, bem como sua ação significativa na modulação cardiovascular agindo no sistema nervoso central (DOS-SANTOS et al., 2022; GROBE; XU; SIGMUND, 2008; NASIMI et al., 2021; PACZWA et al., 1999; SZCZEPAŃSKA-SADOWSKA, 1996; YANG; WANG; JU, 1997). Recentemente foi demonstrado que o bloqueio central dos receptores AT<sub>1</sub> com Losartan via intracerebroventricular (ICV), prejudica a secreção de vasopressina em resposta à hemorragia, sugerindo que a Ang II aumenta a secreção de AVP em resposta à hipovolemia induzida por hemorragia abrupta (15 mL/kg de peso corporal, 25% do volume sanguíneo em 1 min) através de receptores AT<sub>1</sub> centrais (DOS-SANTOS et al., 2022). Como a hemorragia é um estímulo estressor complexo, não podemos descartar alguns fatores antes de discutir nossos dados. Um fato importante é que até o momento os estudos que avaliam a ação endógena da Ang II usam protocolos de remoção abrupta do sangue, avaliando assim sua ação somente na fase de recuperação. Como a resposta central para estabilizar a pressão arterial varia de acordo com a intensidade e duração da hemorragia (EVANS et al., 1991; SCHADT; LUDBROOK, 1991; TROY et al., 2003), este peptídeo pode participar ou ter ações diferentes em outras fases da hemorragia dependendo de sua intensidade.

Em nosso trabalho foi observado que a microinjeção bilateral de Losartan no PVN atenua a queda da pressão arterial durante a fase descompensada da hemorragia. De forma semelhante ao que observamos, estudo anterior do laboratório (LIMA et al., 1999) mostrou que a microinjeção de Losartan na área bulbar ventrolateral rostral também reduz a hipotensão hemorrágica, sugerindo um papel inibitório da Ang II endógena nessa região durante a hemorragia. Uma possibilidade para explicar esse efeito da Losartan seria o fato de que este antagonista, quando administrado centralmente, pode promover efeito pressor de forma dose dependente.

Estudos anteriores (DE LUCA JÚNIOR et al., 1994; DE LUCA et al., 1996) demonstraram que a administração ICV de Losartan em doses relativamente altas produz aumento persistente da pressão arterial. Esse efeito pressor do Losartan não parece ser decorrente de efeito agonista sobre receptores da Ang II (DE LUCA; SUGAWARA; MENANI, 2000). Estudos anteriores mostraram que o Losartan produz simpatoexcitação e aumento da pressão arterial quando microinjetado na área bulbar ventrolateral rostral e caudal (FONTES et al., 1997; MURATANI; FERRARIO; AVERILL, 1993). Interessantemente, o efeito pressor induzido pela injeção ICV de Losartan é reduzido pela injeção i.v. de Losartan, Captopril ou Prazosin, sugerindo ser dependente de ativação angiotensinérgica e  $\alpha$ 1-adrenérgica (SUGAWARA et al., 2002). Apesar do mecanismo do efeito pressor do Losartan não estar totalmente esclarecido, também é possível que esteja relacionado ao efeito hipotensor da Ang II. Esta possibilidade não pode ser descartada já que alguns estudos em ratos anestesiados demonstram ação hipotensora da Ang II quando injetada no ventrículo lateral, na CVLM e na porção medial do NTS, agindo em receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (FOW; AVERILL; BARNES, 1994; NICOLAIDIS et al., 1983). É importante destacar que a injeção central de Ang II induziu efeito dose dependente onde doses inferiores a 100ng levaram a hipotensão enquanto doses superiores levaram a hipertensão (DE LUCA et al., 1996; FOW; AVERILL; BARNES, 1994; MURATANI; FERRARIO; AVERILL, 1993; NICOLAIDIS et al., 1983). Sendo assim, seria interessante investigar as concentrações desse peptídeo no PVN em nosso modelo de hemorragia, já que é possível que o aumento da Ang II durante a fase compensada da hemorragia possa atingir valores inferiores a 100ng, resultando, portanto, em resposta hipotensora. Outra possibilidade seria que, devido ao bloqueio dos receptores AT<sub>1</sub>, a ligação da Ang II em receptores AT<sub>2</sub> seria mais preponderante, levando a atenuação da queda de pressão na fase descompensada, facilitando o retorno da PA na fase de recuperação através de um efeito pressor. Essa hipótese corrobora achados anteriores em um modelo de hemorragia induzida por remoção abrupta do sangue, onde foi observado que a Ang II endógena atuando através de receptores AT<sub>2</sub> localizados no PVN está envolvida no retorno da pressão arterial aos valores basais durante a fase de recuperação (KHANMORADI; NASIMI, 2017). Para confirmar essa hipótese estudos adicionais são necessários avaliando-se o efeito do bloqueio simultâneo de receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no PVN sobre as alterações cardiovasculares

induzidas pela hemorragia. Como a maioria dos estudos de hemorragia em animais não anestesiados utilizaram modelos com remoção abrupta de sangue, de acordo com o nosso conhecimento da literatura, o nosso trabalho seria um dos primeiros a sugerir o efeito endógeno da Ang II através do receptor AT<sub>1</sub> na fase compensada em modelo de hemorragia progressiva com taxa fixa.

As ações da Ang-(1-7) no PVN sobre as modulações cardiovasculares que ocorrem na resposta trifásica da hemorragia foi o foco do presente estudo, por este peptídeo realizar várias ações no SNC, onde apresenta efeitos complexos, específicos da área ou grupamento neural e dependente da condição fisiológica do indivíduo. No SNC, assim como de forma sistêmica, a Ang-(1-7) apresenta efeitos sobre a PA, na maioria das vezes, contrários aos da Ang II. Mesmo quando a Ang-(1-7) produz efeitos cardiovasculares semelhantes aos promovidos pela Ang II, isso se dá através de diferentes mecanismos efetores e de sinalização (CAMPAGNOLE-SANTOS et al., 1989; LIMA et al., 1999; SANTOS et al., 2003, 2018; SILVA et al., 1993). Alguns dos efeitos centrais da Ang-(1-7) sugerem que esse peptídeo também tem potencial para exercer modulação da pressão arterial durante a hipotensão hemorrágica (LIMA et al., 1999), uma vez que a hemorragia aumenta significativamente a magnitude e duração do efeito pressor da Ang-(1-7) microinjetada na área bulbar ventrolateral rostral. A Ang-(1-7) promove redução da pressão arterial quando microinjetada em diversas áreas do SNC, tais como no núcleo do núcleo trato solitário, área bulbar ventrolateral caudal, núcleo paraventricular ou área hipotalâmica anterior (GIRONACCI et al., 2013). Esse efeito simpatoinibitório da Ang-(1-7) parece estar relacionado à inibição da liberação de noradrenalina de núcleos hipotalâmicos, através de mecanismo dependente do NO (GIRONACCI et al., 2004). Nossos dados sugerem que a ação da Ang-(1-7) endógena através do receptor Mas no PVN pode estar relacionada com a queda progressiva da pressão arterial durante a fase descompensada, uma vez que a microinjeção bilateral de A779 atenuou a hipotensão na fase descompensada da hemorragia. Esse efeito parece estar relacionado à atividade da vasopressina plasmática, já que o tratamento simultâneo de A779 e do antagonista de receptor V<sub>1</sub> intravenoso, aboliu o efeito do A779, levando a uma hipotensão de maior magnitude na fase descompensada e prejuízo da fase de recuperação da PA. A redução da magnitude da hipotensão hemorrágica induzida pelo A779 também pode estar relacionada ao efeito cronotrópico positivo observado na fase descompensada e na

maior parte da recuperação. Efeito modulatório da Ang-(1-7) sobre a frequência cardíaca já foi sugerido em estudo anterior do laboratório, no qual foi observado que a injeção central de Ang-(1-7) atenua a taquicardia evocada pelo estresse agudo (OSCAR et al., 2015).

Para nossa surpresa a microinjeção de Ang-(1-7) no PVN em ratos não anestesiados, submetidos ao protocolo de hemorragia em uma taxa fixa, resultou em atraso da queda da pressão sustentado até metade da fase compensada, porém, diferente do A779, a microinjeção de Ang-(1-7) não atenuou o pico da queda da PA na fase descompensada, nem apresentou a recuperação acelerada. Infelizmente devido à complexidade das cirurgias e dificuldade de gerar uma hemorragia com uma taxa fixa sem interrupções, além de localização precisa da microinjeção no PVN, não realizamos uma curva dose resposta, sendo a concentração utilizada dos antagonistas baseadas em estudo progresso realizado em nosso laboratório (GOMES DA SILVA et al., 2012). Consideramos que essa foi uma das limitações de nosso trabalho, pois, assim como a Ang II, a Ang-(1-7) pode ter um efeito completamente diferente, dependendo da concentração utilizada do peptídeo (SAMPAIO; NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Não pode ser descartada a hipótese de que o bloqueio do receptor Mas pelo A779, poderia aumentar a probabilidade de ligação da Ang-(1-7) com o receptor AT<sub>2</sub>, já que a interação desse peptídeo com o receptor AT<sub>2</sub> foi demonstrada em estudos realizados inclusive no SNC. (CAMPAGNOLE-SANTOS et al., 1992; JAISWAL et al., 1991, 1992; ROWE et al., 1995; SANTOS et al., 1994, 2018). Uma maneira simples de responder essa questão seria repetir o protocolo utilizando microinjeção bilateral de A779 com um antagonista seletivo do receptor AT<sub>2</sub>. Outro motivo que poderia explicar a resposta semelhante do A779 e da Ang-(1-7), seria que apesar dessas drogas terem sido injetadas no PVN em pequenos volumes (na escala de nanolitros), enquanto o A779 promove bloqueio da ação da Ang-(1-7) endógena, a micro injeção de Ang-(1-7) poderia promover o espalhamento da solução, que por sua vez poderia atingir regiões que não necessariamente estariam envolvidas nas vias neurais recrutadas pela hemorragia.

Até a presente data, somente um estudo avaliou o efeito modulatório central da Ang-(1-7) sobre a secreção de vasopressina induzida pela hemorragia em animais não anestesiados, porém, foi realizado em um modelo com intoxicação aguda por etanol (WHITAKER; MOLINA, 2013). Nessa condição experimental a Ang-(1-7)

endógena tem efeito inibitório sobre a liberação de vasopressina, concomitante ao aumento da atividade da óxido nítrico sintase (NOS) e da produção de Óxido Nítrico (NO) no PVN, sendo esses efeitos abolidos pelo tratamento com A779 (WHITAKER; MOLINA, 2013). Anteriormente, esse mesmo grupo demonstrou que o NO no PVN tem efeito inibitório sobre a vasopressina (WHITAKER; SULZER; MOLINA, 2011). Em conjunto, esses estudos sugerem que a Ang-(1-7) no PVN, através de mecanismo dependente do NO, inibe a liberação de vasopressina durante o choque hemorrágico em ratos intoxicados por etanol. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram ainda que o NO exerce um papel inibitório em neurônios pré autonômicos do PVN que se projetam para a RVLM, além de promover resposta inibitória em neurônios magnocelulares (STERN; LI; ZHANG, 2003; STERN; ZHANG, 2005). Entretanto é importante ressaltar que apesar do papel do NO ser amplamente estudado seu papel no SNC ainda é controverso. Por exemplo, já foi demonstrado que o NO também exerce um papel excitatório em neurônios parvocelulares (BAINS; FERGUSON, 1997). É importante salientar que o papel da Ang-(1-7) central sobre os níveis de vasopressina plasmática só foi estudado em ratos submetidos a hipotensão hipovolêmica com intoxicação por etanol. Em nosso estudo, avaliamos de forma indireta se o NO participa dos efeitos produzidos pelo A779 microinjetado no PVN, através da análise da atividade da enzima NO sintase (NOS) no PVN. Nesse protocolo, os animais foram eutanasiados no fim da hemorragia e o cérebro removido para análise, portanto não foi possível fazer a avaliação do padrão de expressão do NO nas diferentes fases da hemorragia. Esses dados, ainda que preliminares, sugerem que o A779 não atua através de mecanismos nitrérgicos no PVN na modulação das respostas cardiovasculares durante a hemorragia. Estudos adicionais, com metodologias mais específicas, são ainda necessários. Após estudos recentes demonstrarem que nesse mesmo modelo de hemorragia ocorre um aumento da vasopressina circulante em ratos na fase de recuperação (BUSNARDO et al., 2021), seria relevante avaliar a expressão da NOS também em outras fases, em particular na fase de recuperação já que nosso estudo também demonstrou que o bloqueio do receptor Mas no PVN somado ao bloqueio de receptor  $V_1$  intravenoso prejudica a recuperação da pressão arterial nessa fase.

A análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo mostrou que os ratos do grupo Salina apresentaram maior valor da média do intervalo de pulso e maiores valores do desvio padrão, no período final da hemorragia quando

comparado ao período basal. O que indica maior variação da frequência cardíaca nesse período, que por sua vez retornaram aos valores basais no período de recuperação. O índice RMSSD que representa a atividade parassimpática (AUBERT; SEPS; BECKERS, 2003; KLEIGER; STEIN; BIGGER, 2005; PUMPRLA et al., 2002; SHAFFER; MCCRATY; ZERR, 2014), apresentou um padrão semelhante, onde a variação da frequência cardíaca no período final da hemorragia foi maior em relação ao período basal e retornou aos valores basais no período de recuperação apenas no grupo Salina. Entretanto, ao analisar o índice RMSSD foi observado diferença significativa entre os grupos A779 e Salina no período fim da hemorragia, que não ocorreu no desvio padrão. Esses dados sugerem um aumento do tônus vagal durante o fim da hemorragia, que por sua vez pode ser abolido pela microinjeção de A779 no PVN, que por sua vez impediu a resposta de bradicardia durante a fase descompensada. Essa interpretação corrobora nossos achados sobre a  $\Delta FC$ , onde nessa mesma fase o grupo tratado com A779 apresentou valores de frequência cardíaca superiores ao grupo Salina. A análise do domínio da frequência do espectro da FC, demonstrou que ocorre aumento tanto dos componentes de BF quanto de AF, porém, apenas no grupo Salina e no fim da hemorragia, retornando ao nível basal após a recuperação. Estudos sugerem que o componente de BF, seria um indicador misto da modulação autonômica, ou seja, representa tanto alterações no tônus simpático quanto parassimpático. Isso é sugerido devido ao fato de que tanto o bloqueio simpático quanto parassimpático reduzem o número de ondas de baixa frequência (DWORKIN; DWORKIN; TANG, 2000; GOLDSTEIN et al., 2011). Já o componente de AF tem forte relação com a atividade parassimpática, um dos dados que reforçam essa ideia é o fato do bloqueio vagal abolir as oscilações de alta frequência (MALLIANI et al., 1991; POMERANZ et al., 1985; SHAFFER; MCCRATY; ZERR, 2014). O aumento nas Bandas de AF e BF no grupo Salina no fim da hemorragia apresentado em nosso estudo, reforça a ideia de ocorrer um aumento do tônus vagal no fim da hemorragia, que por sua vez é abolido pela microinjeção bilateral de A779 no PVN. O fato de não ter ocorrido diferença significativa na razão BF/AF entre os grupos pode indicar pouca alteração do componente simpático (WAKI et al., 2006) e reforça a ideia de um maior controle por parte do eixo vagal na fase descompensada da hemorragia pela microinjeção de A779. Essa seria uma das possíveis explicações da atenuação da queda da pressão arterial vista nesse grupo

durante no final da hemorragia, o que na condição de hipovolemia seria uma resposta benéfica para reestabelecer os níveis de PA.

A influência da microinjeção de A779 no PVN sobre a densidade espectral da pressão sistólica também foi avaliada antes, durante e após a hemorragia. Ao analisar a média de pressão sistólica foi possível observar um padrão similar ao efeito sobre a  $\Delta$ PAM entre os grupos Salina e A779, onde a pressão sistólica média do grupo Salina apresentou uma queda já no período inicial e que foi acentuada no fim da hemorragia, retornando a valores próximo aos basais no período de recuperação. Por sua vez, o grupo A779 apresentou queda somente no período final da hemorragia e um ligeiro aumento da pressão sistólica que também não foi capaz de retornar aos valores basais na recuperação. Ao analisar o desvio padrão, o grupo Salina apresentou maior oscilação da pressão arterial durante toda a hemorragia, normalizando na fase de recuperação. O Grupo A779 também apresentou um padrão similar de maior labilidade durante o período de hemorragia, porém, significativamente menor que o grupo Salina no período inicial da hemorragia. Quanto a análise da pressão sistólica no domínio da frequência não houve alteração significativa de ambos os grupos antes durante e após a hemorragia no componente de BF. Porém o grupo Salina apresentou um aumento no componente de AF no período inicial da hemorragia em relação ao período basal, componente este que está relacionado com atividade simpática cardíaca e ventilatória (WAKI et al., 2006; YOSHIMOTO et al., 2011), durante a fase compensada. O conjunto desses dados reforça a teoria de que a microinjeção de A779 no PVN atenuou o tônus vagal no fim da hemorragia e durante a recuperação, porém, também sugere que o bloqueio do receptor Mas reduziu a labilidade da PA que ocorre durante a hemorragia.



## 6. CONCLUSÃO

Em conclusão nossos dados sugerem um papel importante do PVN na modulação da pressão arterial em ratos submetidos a hemorragia, durante as fases compensada e recuperação, através da ação dos peptídeos do sistema renina angiotensina. Dentre esses peptídeos destacamos a Ang-(1-7) que agindo no PVN poderia modular as respostas cardiovasculares através de sua ação na síntese/liberação de vasopressina periférica e atenuação do tônus vagal. Entretanto, estudos futuros são necessários para aprimorar entendimento sobre os mecanismos que estão envolvidos nos efeitos produzidos pela ação endógena da Ang-(1-7) no PVN em todas as fases da hemorragia. Os achados desse estudo podem ser um pequeno passo para o melhor entendimento das respostas durante as fases descompensada e de recuperação, reforçando importante papel do sistema nervoso central na resposta a hemorragia.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AICHER, S. A. et al. Anatomical substrates for baroreflex sympathoinhibition in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 51, n. 2, p. 107–110, jan. 2000.

ALLEN, A. M. et al. Angiotensin II receptors in the human brain. **Regulatory Peptides**, v. 79, n. 1, p. 1–7, jan. 1999.

ARNOLD, A. C. et al. Modulation of Reflex Function by Endogenous Angiotensins in Older Transgenic Rats With Low Glial Angiotensinogen. **Hypertension**, v. 51, n. 5, p. 1326–1331, maio 2008.

AUBERT, A. E.; SEPS, B.; BECKERS, F. Heart Rate Variability in Athletes: **Sports Medicine**, v. 33, n. 12, p. 889–919, 2003.

BADOER, E. et al. A comparison of hypotensive and non-hypotensive hemorrhage on Fos expression in spinally projecting neurons of the paraventricular nucleus and rostral ventrolateral medulla. **Brain Research**, v. 610, n. 2, p. 216–223, maio 1993.

BADOER, E. Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society Symposium: The Hypothalamus HYPOTHALAMIC PARAVENTRICULAR NUCLEUS AND CARDIOVASCULAR REGULATION. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 1–2, p. 95–99, jan. 2001.

BADOER, E.; MEROLLI, J. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that project to the rostral ventrolateral medulla are activated by haemorrhage. **Brain Research**, v. 791, n. 1–2, p. 317–320, abr. 1998.

BAINS, J. S.; FERGUSON, A. V. Nitric oxide depolarizes Type II paraventricular nucleus neurons in vitro. **Neuroscience**, v. 79, n. 1, p. 149–159, abr. 1997.

BARCROFT, H. et al. POSTHÆMORRHAGIC FAINTING. **The Lancet**, v. 243, n. 6294, p. 489–491, abr. 1944.

BARCROFT, H.; EDHOLM, O. G. On the vasodilatation in human skeletal muscle during post-haemorrhagic fainting. **The Journal of Physiology**, v. 104, n. 2, p. 161–175, 15 out. 1945.

BECKER, L. K. et al. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 3, p. H1416–H1424, set. 2007.

BIANCARDI, V. C. et al. Circulating Angiotensin II Gains Access to the Hypothalamus and Brain Stem During Hypertension via Breakdown of the Blood–Brain Barrier. **Hypertension**, v. 63, n. 3, p. 572–579, mar. 2014.

BIANCARDI, V. C.; STERN, J. E. Compromised blood-brain barrier permeability: novel mechanism by which circulating angiotensin II signals to sympathoexcitatory centres

during hypertension: AngII-mediated BBB breakdown. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 6, p. 1591–1600, 15 mar. 2016.

BILLMAN, G. E. Heart Rate Variability? A Historical Perspective. **Frontiers in Physiology**, v. 2, 2011.

BOTELHO, L. M. O. et al. Plasma angiotensin(1–7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. **Peptides**, v. 15, n. 4, p. 723–729, jan. 1994.

BURKE, S. L.; DORWARD, P. K. Influence of endogenous opiates and cardiac afferents on renal nerve activity during haemorrhage in conscious rabbits. **The Journal of Physiology**, v. 402, n. 1, p. 9–27, 1 ago. 1988.

BUSNARDO, C. et al. NMDA and non-NMDA glutamate receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulate different stages of hemorrhage-evoked cardiovascular responses in rats. **Neuroscience**, v. 320, p. 149–159, abr. 2016.

BUSNARDO, C. et al. N-Methyl-D-aspartate Glutamate Receptor Modulates Cardiovascular and Neuroendocrine Responses Evoked by Hemorrhagic Shock in Rats. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1–11, 13 ago. 2021.

BUSNARDO, C.; TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A. Role of N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors in the cardiovascular effects of L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus of unanesthetized rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 9, p. 2066–2077, jul. 2009.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. et al. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 1 jul. 1989.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. et al. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 263, n. 1, p. R89–R94, 1 jul. 1992.

CERUTTI, C.; BARRES, C.; PAULTRE, C. Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. **The American Journal of Physiology**, v. 266, n. 5 Pt 2, p. H1993-2000, maio 1994.

CHAVES, G. Z. et al. Modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin-(1–7) at the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats: **Journal of Hypertension**, v. 18, n. 12, p. 1841–1848, dez. 2000.

CHIEN, S. Role of the sympathetic nervous system in hemorrhage. **Physiological Reviews**, v. 47, n. 2, p. 214–288, abr. 1967.

DA SILVA, A. Q. G.; FONTES, M. A. P.; KANAGY, N. L. Chronic infusion of angiotensin receptor antagonists in the hypothalamic paraventricular nucleus prevents

hypertension in a rat model of sleep apnea. **Brain Research**, v. 1368, p. 231–238, jan. 2011.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 2, p. 323–364, 1 abr. 1994.

DARLINGTON, D. N.; SHINSAKO, J.; DALLMAN, M. F. Responses of ACTH, epinephrine, norepinephrine, and cardiovascular system to hemorrhage. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 251, n. 3, p. H612–H618, 1 set. 1986.

DE ANDRADE, O. et al. Involvement of the paraventricular nucleus (PVN) of hypothalamus in the cardiovascular alterations to head up tilt in conscious rats. **Neuroscience Research**, v. 72, n. 3, p. 270–274, mar. 2012.

DE LUCA JÚNIOR, L. A. et al. Different effects on rat arterial pressure and heart rate when losartan is injected into the third or fourth ventricle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 27, n. 11, p. 2681–2687, nov. 1994.

DE LUCA, L. A. et al. Effects of intracerebroventricular injections of losartan or PD123319 on arterial pressure and heart rate of sodium replete and sodium deplete rats. **Regulatory Peptides**, v. 66, n. 1–2, p. 31–35, out. 1996.

DE LUCA, L. A.; SUGAWARA, A. M.; MENANI, J. V. Brain Versus Peripheral Angiotensin II Receptors In Hypovolaemia: Behavioural And Cardiovascular Implications. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 5–6, p. 437–442, maio 2000.

DIZ, D. I. et al. Angiotensin peptides and central autonomic regulation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 131–137, abr. 2011.

DOS-SANTOS, R. C. et al. AMPA and angiotensin type 1 receptors are necessary for hemorrhage-induced vasopressin secretion. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 55, p. e11635, 2022.

DWORKIN, B. R.; DWORKIN, S.; TANG, X. Carotid and aortic baroreflexes of the rat: I. Open-loop steady-state properties and blood pressure variability. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 5, p. R1910-1921, nov. 2000.

ENGELAND, W. C. et al. The Adrenal Medullary Response to Graded Hemorrhage in Awake Dogs. **Endocrinology**, v. 109, n. 5, p. 1539–1544, nov. 1981.

EVANS, R. G. et al. Influence of higher brain centres and vasopressin on the haemodynamic response to acute central hypovolaemia in rabbits. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 35, n. 1, p. 1–14, jul. 1991.

EVANS, R. G. et al. John Ludbrook APPS Symposium Neural Mechanisms In The Cardiovascular Responses To Acute Central Hypovolaemia. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 5–6, p. 479–487, maio 2001.

EVANS, R. G.; LUDBROOK, J.; POTOČNIK, S. J. Intracisternal naloxone and cardiac nerve blockade prevent vasodilatation during simulated haemorrhage in awake rabbits. **The Journal of Physiology**, v. 409, n. 1, p. 1–14, 1 fev. 1989.

EVANS, R. G.; LUDBROOK, J.; VENTURA, S. Role of vagal afferents in the haemodynamic response to acute central hypovolaemia in unanaesthetized rabbits. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 46, n. 3, p. 251–260, mar. 1994.

FEJES-TOTH, G.; BRINCK-JOHNSEN, T.; NARAY-FEJES-TOTH, A. Cardiovascular and hormonal response to hemorrhage in conscious rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 254, n. 5, p. H947–H953, 1 maio 1988.

FERRARIO CARLOS M. et al. Counterregulatory Actions of Angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 535–541, 1 set. 1997.

FONTES, M. A. P. et al. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. **Brain Research**, v. 750, n. 1–2, p. 305–310, mar. 1997.

FORSYTH, R. P.; HOFFBRAND, B. I.; MELMON, K. L. Redistribution of Cardiac Output during Hemorrhage in the Unanesthetized Monkey. **Circulation Research**, v. 27, n. 3, p. 311–320, set. 1970.

FOW, J. E.; AVERILL, D. B.; BARNES, K. L. Mechanisms of angiotensin-induced hypotension and bradycardia in the medial solitary tract nucleus. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 267, n. 1, p. H259–H266, 1 jul. 1994.

G. PAXINOS et al. **Atlas of the Developing Mouse Brain**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2007.

GIRONACCI, M. M. et al. Angiotensin-(1–7) inhibits the angiotensin II-enhanced norepinephrine release in coarcted hypertensive rats. **Regulatory Peptides**, v. 118, n. 1–2, p. 45–49, abr. 2004.

GIRONACCI, M. M. et al. Neuromodulatory role of angiotensin-(1–7) in the central nervous system. **Clinical Science**, v. 125, n. 2, p. 57–65, 1 jul. 2013.

GOETZ, K. L.; BOND, G. C.; SMITH, W. E. Effect of Moderate Hemorrhage in Humans on Plasma ADH and Renin. **Experimental Biology and Medicine**, v. 145, n. 1, p. 277–280, 1 jan. 1974.

GOLDSTEIN, D. S. et al. Low-frequency power of heart rate variability is not a measure of cardiac sympathetic tone but may be a measure of modulation of cardiac autonomic

outflows by baroreflexes. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 12, p. 1255–1261, dez. 2011.

GOMES DA SILVA, A. Q. et al. Cardiovascular responses evoked by activation or blockade of GABAA receptors in the hypothalamic PVN are attenuated in transgenic rats with low brain angiotensinogen. **Brain Research**, v. 1448, p. 101–110, abr. 2012.

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, ago. 2008.

GUIMARAES, P. S. et al. Increasing Angiotensin-(1–7) Levels in the Brain Attenuates Metabolic Syndrome–Related Risks in Fructose-Fed Rats. **Hypertension**, v. 63, n. 5, p. 1078–1085, maio 2014.

HAGGENDAL, J. On the patterns of blood pressure, heart rate, and blood levels of noradrenaline and adrenaline during haemorrhage in the rat. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 127, n. 4, p. 513–522, ago. 1986.

HAN, Y. et al. Angiotensin-(1–7) in Paraventricular Nucleus Modulates Sympathetic Activity and Cardiac Sympathetic Afferent Reflex in Renovascular Hypertensive Rats. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. e48966, 5 nov. 2012.

HERINGER-WALTHER, S. et al. Baroreflex Improvement in SHR After ACE Inhibition Involves Angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 37, n. 5, p. 1309–1314, maio 2001.

HESLOP, D. J.; KEAY, K. A.; BANDLER, R. Haemorrhage-evoked compensation and decompensation are mediated by distinct caudal midline medullary regions in the urethane-anaesthetised rat. **Neuroscience**, v. 113, n. 3, p. 555–567, set. 2002.

HINOVA-PALOVA, D. V. et al. Topographical distribution and morphology of NADPH-diaphorase-stained neurons in the human claustrum. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 8, 27 maio 2014.

HOPE, B. T. et al. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 7, p. 2811–2814, 1 abr. 1991.

JAISWAL, N. et al. Characterization of angiotensin receptors mediating prostaglandin synthesis in C6 glioma cells. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 260, n. 5, p. R1000–R1006, 1 maio 1991.

JAISWAL, N. et al. Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. Characterization of receptors. **Hypertension**, v. 19, n. 2\_supplement, fev. 1992.

JESKE, I.; REIS, D. J.; MILNER, T. A. Neurons in the barosensory area of the caudal ventrolateral medulla project monosynaptically on to sympathoexcitatory bulbospinal

neurons in the rostral ventrolateral medulla. **Neuroscience**, v. 65, n. 2, p. 343–353, mar. 1995.

JOHNSON, J. V.; BENNETT, G. W.; HATTON, R. Central and Systemic Effects of a Vasopressin V1 Antagonist on MAP Recovery After Haemorrhage in Rats: **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 12, n. 4, p. 405–412, out. 1988.

KAR, S.; GAO, L.; ZUCKER, I. H. Exercise training normalizes ACE and ACE2 in the brain of rabbits with pacing-induced heart failure. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 4, p. 923–932, abr. 2010.

KHANMORADI, M.; NASIMI, A. Endogenous angiotensin II in the paraventricular nucleus regulates arterial pressure during hypotension in rat, a single-unit study. **Neuroscience Research**, v. 114, p. 35–42, jan. 2017.

KLEIGER, R. E.; STEIN, P. K.; BIGGER, J. T. Heart Rate Variability: Measurement and Clinical Utility. **Annals of Noninvasive Electrocardiology**, v. 10, n. 1, p. 88–101, jan. 2005.

KORNER, P. I. et al. Autonomic, hormonal, and local circulatory effects of hemorrhage in conscious rabbits. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 258, n. 1, p. H229–H239, 1 jan. 1990.

KRUKOFF, T. L.; MACTAVISH, D.; JHAMANDAS, J. H. Activation by hypotension of neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that project to the brainstem. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 385, n. 2, p. 285–296, 25 ago. 1997.

LEE, H. B.; BLAUFOX, M. D. Blood volume in the rat. **Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 26, n. 1, p. 72–76, jan. 1985.

LI, P. et al. Superoxide anions modulate the effects of angiotensin-(1–7) in the rostral ventrolateral medulla on cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activity in rats. **Neuroscience**, v. 223, p. 388–398, out. 2012.

LI, P. et al. Angiotensin-(1–7) in the Rostral Ventrolateral Medulla Modulates Enhanced Cardiac Sympathetic Afferent Reflex and Sympathetic Activation in Renovascular Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 61, n. 4, p. 820–827, abr. 2013.

LI, Y. W. et al. Neurons in rabbit caudal ventrolateral medulla inhibit bulbospinal barosensitive neurons in rostral medulla. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 261, n. 1, p. R44–R51, 1 jul. 1991.

LI, Y.-F.; PATEL, K. P. Paraventricular nucleus of the hypothalamus and elevated sympathetic activity in heart failure: the altered inhibitory mechanisms. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 177, n. 1, p. 17–26, jan. 2003.

LI, Y.-W.; DAMPNEY, R. A. L. Expression of fos-like protein in brain following sustained hypertension and hypotension in conscious rabbits. **Neuroscience**, v. 61, n. 3, p. 613–634, ago. 1994.

LIARD, J. F. V1 vs. combined V1+V2 vasopressin blockade after hemorrhage in conscious dogs. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 255, n. 6, p. H1325–H1329, 1 dez. 1988.

LIMA, D. X. et al. Haemorrhage increases the pressor effect of angiotensin-(1–7) but not of angiotensin II at the rat rostral ventrolateral medulla: **Journal of Hypertension**, v. 17, n. 8, p. 1145–1152, ago. 1999.

LUDBROOK, J.; GRAHAM, W. F. The role of cardiac receptor and arterial baroreceptor reflexes in control of the circulation during acute change of blood volume in the conscious rabbit. **Circulation Research**, v. 54, n. 4, p. 424–435, abr. 1984.

LUDBROOK, J.; POTOČNIK, S. J.; WOODS, R. L. SIMULATION OF ACUTE HAEMORRHAGE IN UNANAESTHETIZED RABBITS. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 15, n. 8, p. 575–584, set. 1988.

LUDBROOK, J.; RUTTER, P. C. Effect of naloxone on haemodynamic responses to acute blood loss in unanaesthetized rabbits. **The Journal of Physiology**, v. 400, n. 1, p. 1–14, 1 jun. 1988.

MALLIANI, A. et al. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, v. 84, n. 2, p. 482–492, ago. 1991.

MCKINLEY, M. et al. INTERACTION OF CIRCULATING HORMONES WITH THE BRAIN: THE ROLES OF THE SUBFORNICAL ORGAN AND THE ORGANUM VASCULOSUM OF THE LAMINA TERMINALIS. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 25, n. S1, p. S61–S67, nov. 1998.

MENDONÇA, M. M. et al. Involvement of GABAergic and Adrenergic Neurotransmissions on Paraventricular Nucleus of Hypothalamus in the Control of Cardiac Function. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 670, 4 jun. 2018.

MORGAN, D. A. et al. Serotonergic mechanisms mediate renal sympathoinhibition during severe hemorrhage in rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 255, n. 3, p. H496–H502, 1 set. 1988.

MORITA, H. et al. Opiate receptor-mediated decrease in renal nerve activity during hypotensive hemorrhage in conscious rabbits. **Circulation Research**, v. 63, n. 1, p. 165–172, jul. 1988.

MORITA, H.; VATNER, S. F. Effects of hemorrhage on renal nerve activity in conscious dogs. **Circulation Research**, v. 57, n. 5, p. 788–793, nov. 1985.

MURATANI, H.; FERRARIO, C. M.; AVERILL, D. B. Ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats: role of angiotensin II. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 264, n. 2, p. R388–R395, 1 fev. 1993.



NASIMI, A. et al. Another controller system for arterial pressure. AngII-vasopressin neural network of the parvocellular paraventricular nucleus may regulate arterial pressure during hypotension. **Brain Research**, v. 1769, p. 147618, out. 2021.

NEUTZE, J.; WYLER, F.; RUDOLPH, A. Changes in distribution of cardiac output after hemorrhage in rabbits. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 215, n. 4, p. 857–864, 1 out. 1968.

NICOLAIDIS, S. et al. Ionophoretic investigation of identified SFO angiotensin responsive neurons firing in relation to blood pressure changes. **Brain Research Bulletin**, v. 10, n. 3, p. 357–363, mar. 1983.

ÖBERG, B.; THORÉN, P. Increased Activity in Left Ventricular Receptors during Hemorrhage or Occlusion of Caval Veins in the Cat. - A Possible Cause of the Vaso-vagal Reaction. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 85, n. 2, p. 164–173, jun. 1972.

ÖBERG, B.; THORÉN, P. Circulatory Responses to Stimulation of Left Ventricular Receptors in the Cat. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 88, n. 1, p. 8–22, maio 1973.

OLIVEIRA, R. C.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SANTOS, R. A. S. The pressor effect of angiotensin-(1-7) in the rat rostral ventrolateral medulla involves multiple peripheral mechanisms. **Clinics**, v. 68, n. 2, p. 245–252, fev. 2013.

OLIVER, J. R. et al. Reflex release of vasopressin and renin in hemorrhage is enhanced by autonomic blockade. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 258, n. 1, p. H221–H228, 1 jan. 1990.

OSCAR, C. G. et al. Angiotensin-(1–7) in the basolateral amygdala attenuates the cardiovascular response evoked by acute emotional stress. **Brain Research**, v. 1594, p. 183–189, jan. 2015.

PACZWA, P. et al. Role of central AT<sub>1</sub> and V<sub>1</sub> receptors in cardiovascular adaptation to hemorrhage in SD and renin TGR rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 276, n. 6, p. H1918–H1926, 1 jun. 1999.

PATEL, K. P.; SCHULTZ, H. D. Angiotensin Peptides and Nitric Oxide in Cardiovascular Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 10, p. 1121–1132, out. 2013.

PATEL, V. B. et al. Role of the ACE2/Angiotensin 1–7 Axis of the Renin–Angiotensin System in Heart Failure. **Circulation Research**, v. 118, n. 8, p. 1313–1326, 15 abr. 2016.

PETROV, T. et al. Hypotension induces fos immunoreactivity in NADPH-diaphorase positive neurons in the paraventricular and supraoptic hypothalamic nuclei of the rat. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 5, p. 509–514, maio 1995.

POMERANZ, B. et al. Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 248, n. 1, p. H151–H153, 1 jan. 1985.

PUMPRLA, J. et al. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. **International Journal of Cardiology**, v. 84, n. 1, p. 1–14, jul. 2002.

PYNER, S. Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: Implications for cardiovascular regulation. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 38, n. 3, p. 197–208, nov. 2009.

QADRI, F. et al. Sensitivity of hypothalamic paraventricular nucleus to C- and N-terminal angiotensin fragments: vasopressin release and drinking. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 10, n. 4, p. 275–281, abr. 1998.

QUAIL, A. W.; WOODS, R. L.; KORNER, P. I. Cardiac and arterial baroreceptor influences in release of vasopressin and renin during hemorrhage. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 252, n. 6, p. H1120–H1126, 1 jun. 1987.

RADAELLI, A. et al. Adrenergic origin of very low-frequency blood pressure oscillations in the unanesthetized rat. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 1, p. H357–364, jan. 2006.

ROBERTS, M. M. et al. *c-fos* Expression in Vasopressin and Oxytocin Neurons Reveals Functional Heterogeneity within Magnocellular Neurons. **Neuroendocrinology**, v. 57, n. 3, p. 388–400, 1993.

ROWE, B. P. et al. Angiotensin-(1–7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain. **Regulatory Peptides**, v. 56, n. 2–3, p. 139–146, abr. 1995.

RUTTER, P. C.; POTOČNIK, S. J.; LUDBROOK, J. Sympathoadrenal mechanisms in cardiovascular responses to naloxone after hemorrhage. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 252, n. 1, p. H40–H46, 1 jan. 1987.

SAMPAIO, W. O.; NASCIMENTO, A. A. S.; SANTOS, R. A. S. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1–7) in rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 284, n. 6, p. H1985–H1994, 1 jun. 2003.

SANTOS, R. A. S. et al. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1–7): Evidence that the actions of angiotensin-(1–7) are mediated by specific angiotensin receptors. **Brain Research Bulletin**, v. 35, n. 4, p. 293–298, jan. 1994.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 8 jul. 2003.

SANTOS, R. A. S. et al. The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, p. 505–553, 1 jan. 2018.

SCHADT, J. C. et al. Hemodynamic effects of hemorrhage and subsequent naloxone treatment in conscious rabbits. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 247, n. 3, p. R497–R505, 1 set. 1984.

SCHADT, J. C. Sympathetic and hemodynamic adjustments to hemorrhage: A possible role for endogenous opioid peptides. **Resuscitation**, v. 18, n. 2–3, p. 219–228, dez. 1989.

SCHADT, J. C.; GADDIS, R. R. Cardiovascular responses to hemorrhage and naloxone in conscious barodenervated rabbits. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 251, n. 5, p. R909–R915, 1 nov. 1986.

SCHADT, J. C.; GADDIS, R. R. Role of adrenal medulla in hemodynamic response to hemorrhage and naloxone. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 254, n. 3, p. R559–R565, 1 mar. 1988.

SCHADT, J. C.; GADDIS, R. R. Renin-angiotensin system and opioids during acute hemorrhage in conscious rabbits. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 258, n. 2, p. R543–R551, 1 fev. 1990.

SCHADT, J. C.; HASSER, E. M. Interaction of vasopressin and opioids during rapid hemorrhage in conscious rabbits. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 260, n. 2, p. R373–R381, 1 fev. 1991.

SCHADT, J. C.; LUDBROOK, J. Hemodynamic and neurohumoral responses to acute hypovolemia in conscious mammals. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 260, n. 2, p. H305–H318, 1 fev. 1991.

SCHIAVONE, M. T. et al. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 11, p. 4095–4098, 1 jun. 1988.

SCHWARTZ, J.; REID, I. A. EFFECT OF VASOPRESSIN BLOCKADE ON BLOOD PRESSURE REGULATION DURING HEMORRHAGE IN CONSCIOUS DOGS. **Endocrinology**, v. 109, n. 5, p. 1778–1780, nov. 1981.

SETIADI, A. et al. The role of the blood–brain barrier in hypertension. **Experimental Physiology**, v. 103, n. 3, p. 337–342, mar. 2018.

SHAFFER, F.; GINSBERG, J. P. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. **Frontiers in Public Health**, v. 5, p. 258, 28 set. 2017.

SHAFFER, F.; MCCRATY, R.; ZERR, C. L. A healthy heart is not a metronome: an integrative review of the heart's anatomy and heart rate variability. **Frontiers in Psychology**, v. 5, 30 set. 2014.

SHANKS, J.; RAMCHANDRA, R. Angiotensin II and the Cardiac Parasympathetic Nervous System in Hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12305, 14 nov. 2021.

SHEN, Y. T.; COWLEY, A. W.; VATNER, S. F. Relative roles of cardiac and arterial baroreceptors in vasopressin regulation during hemorrhage in conscious dogs. **Circulation Research**, v. 68, n. 5, p. 1422–1436, maio 1991.

SILVA, L. C. S. et al. Cardiovascular effects produced by micro-injection of angiotensin-(1–7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. **Brain Research**, v. 613, n. 2, p. 321–325, jun. 1993.

SILVEIRA, S. A. et al. The hypothalamic paraventricular nucleus and carotid receptors modulate hyperglycemia induced by hemorrhage. **Brain Research**, v. 993, n. 1–2, p. 183–191, dez. 2003.

SKOOG, P.; MÅNSSON, J.; THORÉN, P. Changes in renal sympathetic outflow during hypotensive haemorrhage in rats. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 125, n. 4, p. 655–660, dez. 1985.

SPYER, K. M. Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. **The Journal of Physiology**, v. 474, n. 1, p. 1–19, 1 jan. 1994.

STERN, J. E.; LI, Y.; ZHANG, W. Nitric oxide: a local signalling molecule controlling the activity of pre-autonomic neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 177, n. 1, p. 37–42, jan. 2003.

STERN, J. E.; ZHANG, W. Cellular sources, targets and actions of constitutive nitric oxide in the magnocellular neurosecretory system of the rat: Functional constitutive NO signalling in the SON. **The Journal of Physiology**, v. 562, n. 3, p. 725–744, fev. 2005.

STUESSE, S. L. Origins of cardiac vagal preganglionic fibers: A retrograde transport study. **Brain Research**, v. 236, n. 1, p. 15–25, mar. 1982.

SUGAWARA, A. M. et al. Dissociation between the circulating renin-angiotensin system and angiotensin II receptors in central losartan-induced hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 9, p. 1069–1074, set. 2002.

SUN, H.-J. et al. Angiotensin II and Angiotensin-(1-7) in Paraventricular Nucleus Modulate Cardiac Sympathetic Afferent Reflex in Renovascular Hypertensive Rats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e52557, 20 dez. 2012.

SZCZEPAŃSKA-SADOWSKA, E. Interaction of vasopressin and angiotensin II in central control of blood pressure and thirst. **Regulatory Peptides**, v. 66, n. 1–2, p. 65–71, out. 1996.

THORÉN, P. Role of cardiac vagal c-fibers in cardiovascular control. Em: ADRIAN, R. H. et al. (Eds.). **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 86**. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1979. v. 86p. 1–94.

TROY, B. P. et al. Haemodynamic response to haemorrhage: distinct contributions of midbrain and forebrain structures. **Autonomic Neuroscience**, v. 108, n. 1–2, p. 1–11, out. 2003.

TROY, B. P.; HOPKINS, D. A.; KEAY, K. A. The Hemodynamic Response to Blood Loss in the Conscious Rat: Contributions of Cardiac Vagal and Cardiac Spinal Signals. **Shock**, v. 41, n. 4, p. 282–291, abr. 2014.

VICTOR, R. G. et al. Differential control of adrenal and renal sympathetic nerve activity during hemorrhagic hypotension in rats. **Circulation Research**, v. 64, n. 4, p. 686–694, abr. 1989.

WAKI, H. et al. Automation of analysis of cardiovascular autonomic function from chronic measurements of arterial pressure in conscious rats. **Experimental Physiology**, v. 91, n. 1, p. 201–213, jan. 2006.

WANG, B. C. et al. Vasopressin and renin responses to hemorrhage in conscious, cardiac-denervated dogs. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 245, n. 3, p. H399–H405, 1 set. 1983.

WANG, B. C. et al. Ventricular receptors stimulate vasopressin release during hemorrhage. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 254, n. 2, p. R204–R211, 1 fev. 1988.

WARREN, J. V. et al. THE EFFECT OF VENESECTION AND THE POOLING OF BLOOD IN THE EXTREMITIES ON THE ATRIAL PRESSURE AND CARDIAC OUTPUT IN NORMAL SUBJECTS WITH OBSERVATIONS ON ACUTE CIRCULATORY COLLAPSE IN THREE INSTANCES 1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 24, n. 3, p. 337–344, 1 maio 1945.

WATKINS, N. D.; CORK, S. C.; PYNER, S. An immunohistochemical investigation of the relationship between neuronal nitric oxide synthase, GABA and presympathetic paraventricular neurons in the hypothalamus. **Neuroscience**, v. 159, n. 3, p. 1079–1088, mar. 2009.

WHITAKER, A. M.; MOLINA, P. E. Angiotensin (1-7) contributes to nitric oxide tonic inhibition of vasopressin release during hemorrhagic shock in acute ethanol intoxicated rodents. **Life Sciences**, v. 93, n. 17, p. 623–629, out. 2013.

WHITAKER, A. M.; SULZER, J. K.; MOLINA, P. E. Augmented central nitric oxide production inhibits vasopressin release during hemorrhage in acute alcohol-intoxicated rodents. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 5, p. R1529–R1539, nov. 2011.

XIA, H. et al. ACE2-Mediated Reduction of Oxidative Stress in the Central Nervous System Is Associated with Improvement of Autonomic Function. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22682, 27 jul. 2011.

YAMAZATO, M. et al. Overexpression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in the Rostral Ventrolateral Medulla Causes Long-Term Decrease in Blood Pressure in the Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 49, n. 4, p. 926–931, abr. 2007.

YANG, H.; WANG, L.; JU, G. Evidence for Hypothalamic Paraventricular Nucleus as an Integrative Center of Neuroimmunomodulation. **Neuroimmunomodulation**, v. 4, n. 3, p. 120–127, 1997.

YAO, S. T.; MAY, C. N. Intra-carotid angiotensin II activates tyrosine hydroxylase-expressing rostral ventrolateral medulla neurons following blood–brain barrier disruption in rats. **Neuroscience**, v. 245, p. 148–156, ago. 2013.

YOSHIMOTO, T. et al. Frequency components of systolic blood pressure variability reflect vasomotor and cardiac sympathetic functions in conscious rats. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 61, n. 5, p. 373–383, 2011.

ZHENG, H. et al. Exercise training improves endogenous nitric oxide mechanisms within the paraventricular nucleus in rats with heart failure. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 5, p. H2332–H2341, maio 2005.

ZHENG, H.; LIU, X.; PATEL, K. P. Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression improves central nitric oxide-mediated sympathetic outflow in chronic heart failure. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 6, p. H2402–H2412, dez. 2011.

ZHOU, L.-M. et al. Angiotensin-(1–7) and angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla modulate the cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activity in rats. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 459, n. 5, p. 681–688, abr. 2010.

## 8. ANEXOS

### ANEXO 1: PRINCIPAIS DIFERENÇAS DA RESPOSTA A HEMORRAGIA ENTRE ESPÉCIES


As principais diferenças entre os modelos animais ocorrem durante a fase compensada, a primeira grande diferença das respostas a hemorragia está nos estudos que abordam ação dos barorreceptores modulando a FC nessa fase. As principais evidências que reforçam a hipótese de que os barorreceptores arteriais desempenham um papel fundamental sobre as respostas hemodinâmicas na fase compensada vêm de estudos dos efeitos da desnervação sinoaórtica (DSA), que remove a informação aferente dos barorreceptores, em animais submetidos a hemorragia aguda. Em coelhos não anestesiados, por exemplo, a resposta à perda de sangue menor que 30% do volume sanguíneo total, leva ao aumento progressivo da frequência cardíaca e da resistência vascular, bem como aumento da resistência vascular nos membros e na região esplâncnica, mantendo assim a pressão arterial em seus níveis normais (LUDBROOK; GRAHAM, 1984; SCHADT et al., 1984). Porém, após a DSA, esses animais apresentam queda progressiva da resistência vascular sistêmica, pressão arterial, atenuação do aumento normal da concentração plasmática de norepinefrina e na maioria das vezes manutenção dos valores da frequência cardíaca (SCHADT; GADDIS, 1986). Já cães não anestesiados submetidos a hemorragia aguda, apresentam queda da pressão arterial e ausência do aumento da resistência periférica, após a SAD (SHEN; COWLEY; VATNER, 1991).

Outros fatores também contribuem para a manutenção da pressão arterial durante a fase compensada e apresentam diferença entre espécies, é a resposta hormonal nessa fase. Estudos utilizando coelhos e cães acordados demonstraram que a atividade simpática do nervo renal aumenta progressivamente nessa fase (BURKE; DORWARD, 1988; MORITA et al., 1988; MORITA; VATNER, 1985; SCHADT; LUDBROOK, 1991). A concentração plasmática de Norepinefrina (NE) parece exercer ações hemodinâmicas relevantes durante a fase compensada, porém, seu aumento pode variar de acordo com o modelo animal utilizado. Em coelhos, por exemplo, foi demonstrado aumento da concentração plasmática de NE durante a hemorragia não hipotensiva. Em ratos esse aumento foi observado somente após o início da hipotensão, que é a principal característica da fase descompensada da hemorragia (DARLINGTON; SHINSAKO; DALLMAN, 1986; FORSYTH;

HOFFBRAND; MELMON, 1970; HAGGENDAL, 1986; SCHADT, 1989). Apesar destas respostas variarem de acordo com a espécie estudada, estes dados reforçam os achados de que os mecanismos responsáveis por manter a pressão arterial em seus níveis basais, apesar da queda do débito cardíaco que ocorre durante a fase compensada, não acontecem apenas pela retirada vagal, mas também ocorre devido ao aumento da atividade simpática cardíaca, que contribui com o aumento da contratilidade do músculo cardíaco, mantendo assim os níveis de pressão normais apesar da queda do débito cardíaco. Apesar de cães, coelhos e macacos apresentarem taquicardia durante a fase compensada essa resposta não é visualizada em todos os modelos animais de laboratório. Ratos não anestesiados, por exemplo, provavelmente por já apresentarem taquicardia mesmo no estado basal, geralmente não apresentam aumento significativo da frequência cardíaca em hemorragias leves, ou seja, que não são capazes de causar hipotensão (DARLINGTON; SHINSAKO; DALLMAN, 1986; FEJES-TOTH; BRINCK-JOHNSEN; NARAY-FEJES-TOTH, 1988; SCHADT; LUDBROOK, 1991; TROY et al., 2003). A concentração plasmática de vasopressina aumenta consideravelmente em animais submetidos a modelos de hemorragia capazes de causar hipotensão, porém, em somente em mamíferos de grande porte o aumento da concentração de vasopressina parece contribuir de maneira significativa na manutenção da pressão arterial durante a fase compensada. Estudos realizados em cães e coelhos demonstraram que a hemorragia não hipotensiva pode causar aumento da concentração plasmática de vasopressina (QUAIL; WOODS; KORNER, 1987; WANG et al., 1983, 1988). Entretanto, o bloqueio do receptor  $V_1$  durante a fase compensada em coelhos e ratos, não demonstrou efeitos significativos nos valores de pressão arterial, portanto, mesmo com o aumento da concentração plasmática desse peptídeo aparentemente não tem ação relevante na fase compensada nesses animais (BUSNARDO et al., 2016; KORNER et al., 1990; SCHADT; HASSER, 1991). No entanto em cães não anestesiados submetidos a hemorragia leve, o bloqueio sistêmico do receptor  $V_1$  gerou queda abrupta da pressão arterial, o que sugere ação relevante no controle da PA exercida por esse peptídeo durante essa fase (SCHWARTZ; REID, 1981). Essas são as principais diferenças entre as espécies fornecidas pela literatura atualmente.



## ANEXO 2: DILIGÊNCIA - PROTOCOLO CEUA: 111/2018



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 111/2018  
**Título do projeto:** Papel da ang- (1-7) no núcleo paraventricular do hipotálamo na regulação da pressão arterial em animais com hipotensão hipovolêmica  
**Finalidade:** Pesquisa  
**Pesquisador responsável:** Andrea Siqueira Haibara  
**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas  
**Departamento:** Departamento de Fisiologia e Biofísica

**Situação atual:** [Decisão da CEUA - Diligência](#)

Após análise de seu projeto a CEUA decidiu solicitar de V. Sa. as seguintes informações. Tendo em vista que o prazo para resposta à diligência é de 60 dias, se a mesma não for respondida até 06/07/2018, informamos que o projeto será arquivado e não terá a aprovação da CEUA. Seu projeto foi julgado na reunião do dia 07/05/2018. Prezada Pesquisadora, o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve, somente poderemos aprovar os projetos que estiverem devidamente cadastrados e credenciados. Diligências: 1. Cálculo amostral: Na indicação de grupos de animais, a pesquisadora tem seis grupos com cinco animais em cada grupo. Porém, o cálculo amostral resultou em 18 e em 11 animais por grupo, dependendo da variável. Por favor, corrigir as informações e número de animais a serem usados. 2. Item 05, Procedimentos: A pesquisadora se refere ao artigo de Troy et al., 2003 em vários momentos nos experimentos descritos. Por favor, anexar o artigo publicado por Troy e colaboradores em 2003. Também, foi anexado o artigo de Khanmoradi et al., 2016, como 'article in press'. Por favor, providenciar a versão final do artigo publicado em janeiro de 2017. A aba 11- Documentos- Outros Anexos será liberada. 3. Item 05, Procedimentos: Favor indicar as concentrações e volumes de drogas a serem aplicadas. 4. Em algum momento (Material e Métodos) a pesquisadora menciona a manutenção dos animais até 5-7 dias após hemorragia com eutanásia no final do experimento e cortes histológicos das regiões do cérebro. Por favor, descrever mais claro e detalhado como os animais serão mantidos durante esse período e como o bem estar dos animais será garantido após as intervenções experimentais descritas. 5. Item 0.6, Biossegurança e Descarte de Material Biológico: O SLU não é mais responsável pelo recolhimento e descarte do material biológico e está sendo feito por uma empresa especializada. Por favor, procurar saber os procedimentos corretos adotados pelo ICB (Gerência de Resíduos). \*Informamos que a aba 11- Documentos foi liberada somente para anexar os documentos solicitados. A resposta à diligência deve ser enviada após anexar clicando na Situação Resposta à Diligência. Belo Horizonte, 07/05/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)  
 Universidade Federal de Minas Gerais  
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
 Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

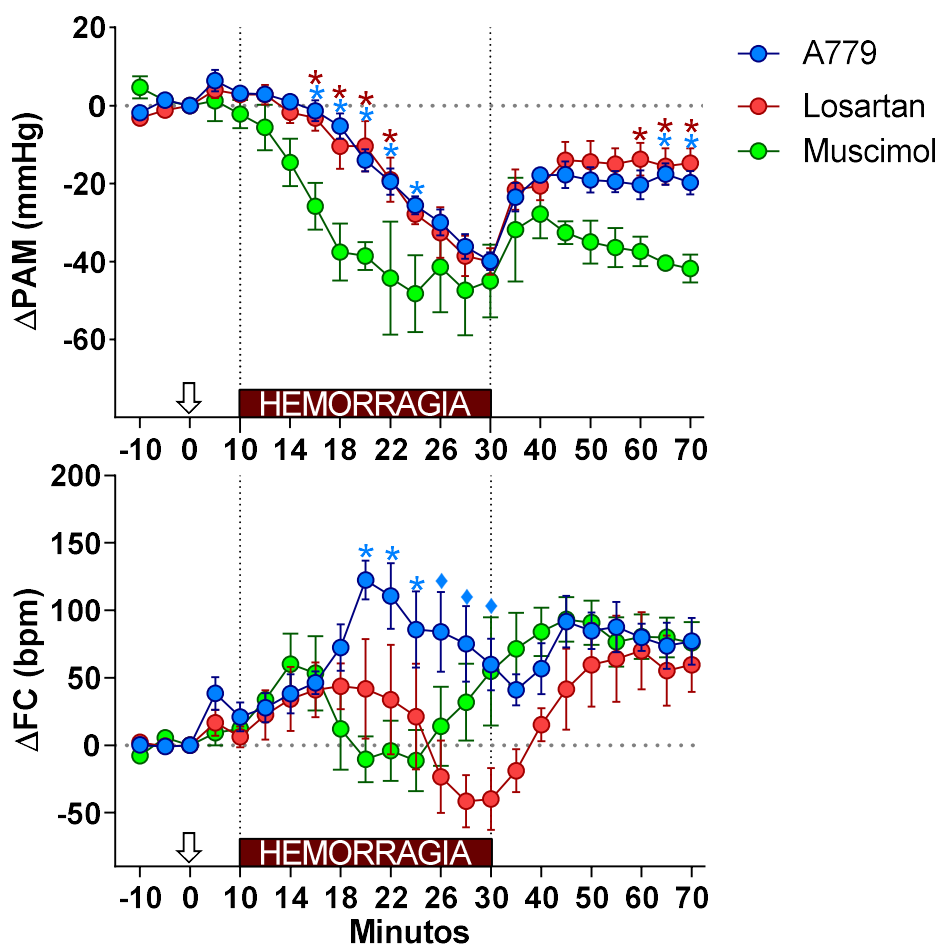
**Anexo 2. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – UFMG**

## ANEXO 3:TABELA DE VALORES ABSOLUTOS

Microinjeção	Peso (g)	Volume de sangue removido (ml)	PA 10 min antes da hemorragia (mmHg)	PA após 20 min de hemorragia (mmHg)
Salina	300	7,25	109	50
	325	7,5	134	74
	325	7,5	102	43
	320	7,5	111	50
	320	7	125	66
	315	7	121	56
	300	6,75	124	56
	345	8	124	59
Muscimol	285	6,5	124	80
	305	7	120	63
	305	7	124	77
	345	7,5	122	91
	355	8	120	74
A779	290	6,75	122	88
	320	7,5	122	84
	300	7,25	112	68
	270	6	121	75
	300	7	134	105
	320	7	136	106
	320	7,5	120	82
	300	6,5	117	67
Losartan	290	6,5	127	93
	325	7,5	115	75
	310	7	118	70
	340	7,75	117	86
	330	7,5	126	79
Ang-(1-7)	315	7	119	67
	310	7	123	65
	345	7,75	131	76
	375	8,5	125	85
Salina+dTyr	345	8	131	58
	320	7,25	135	80
	315	7	133	63
	320	7,5	112	53
	305	7,25	126	65
A779+dTyr	365	8	125	58
	330	7,5	115	74
	330	7,5	115	50
	310	6,75	123	54
	285	6,5	122	76

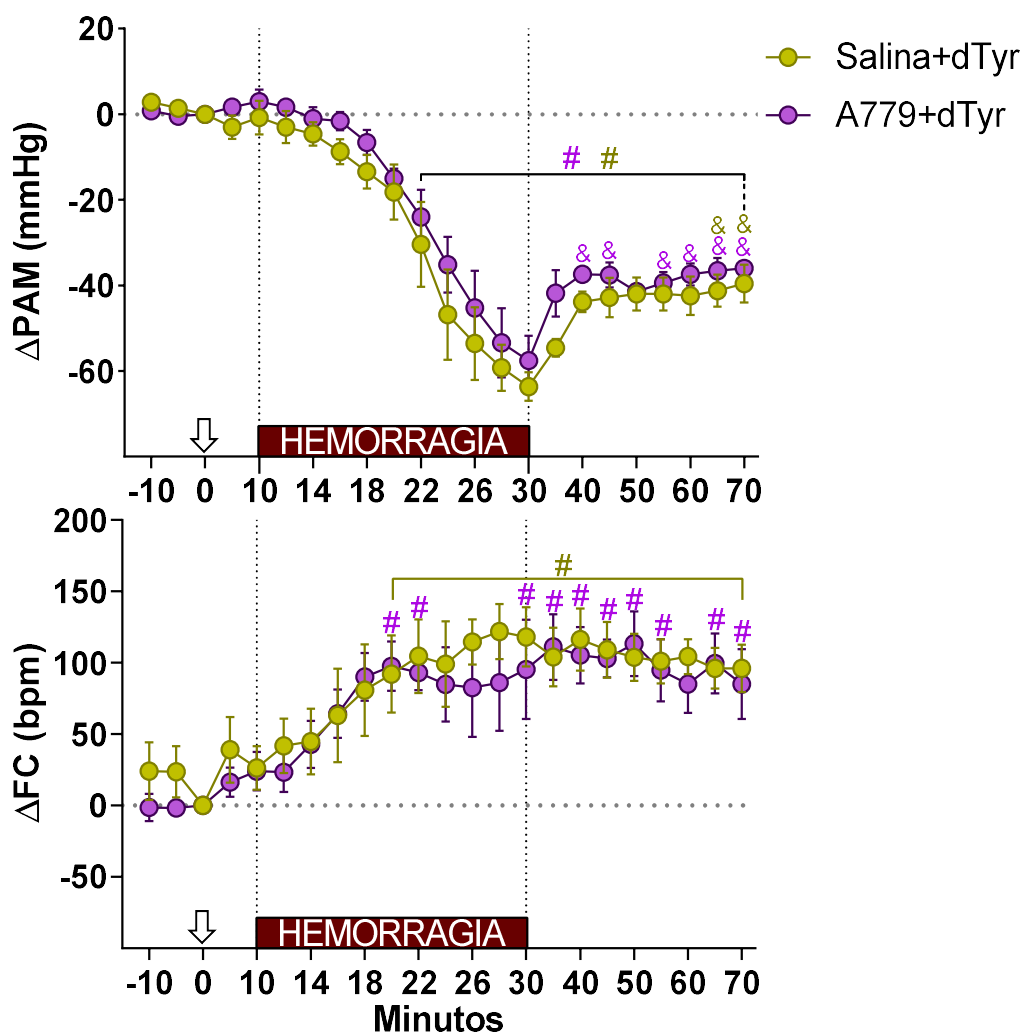
**Anexo 3.** Valores de peso corporal (g), volume total de sangue removido (ml) e valores absolutos da PAM (mmHg) antes e ao final da hemorragia de todos os grupos experimentais.

## ANEXO 4: MUSCIMOL VS LOSARTAN VS A779



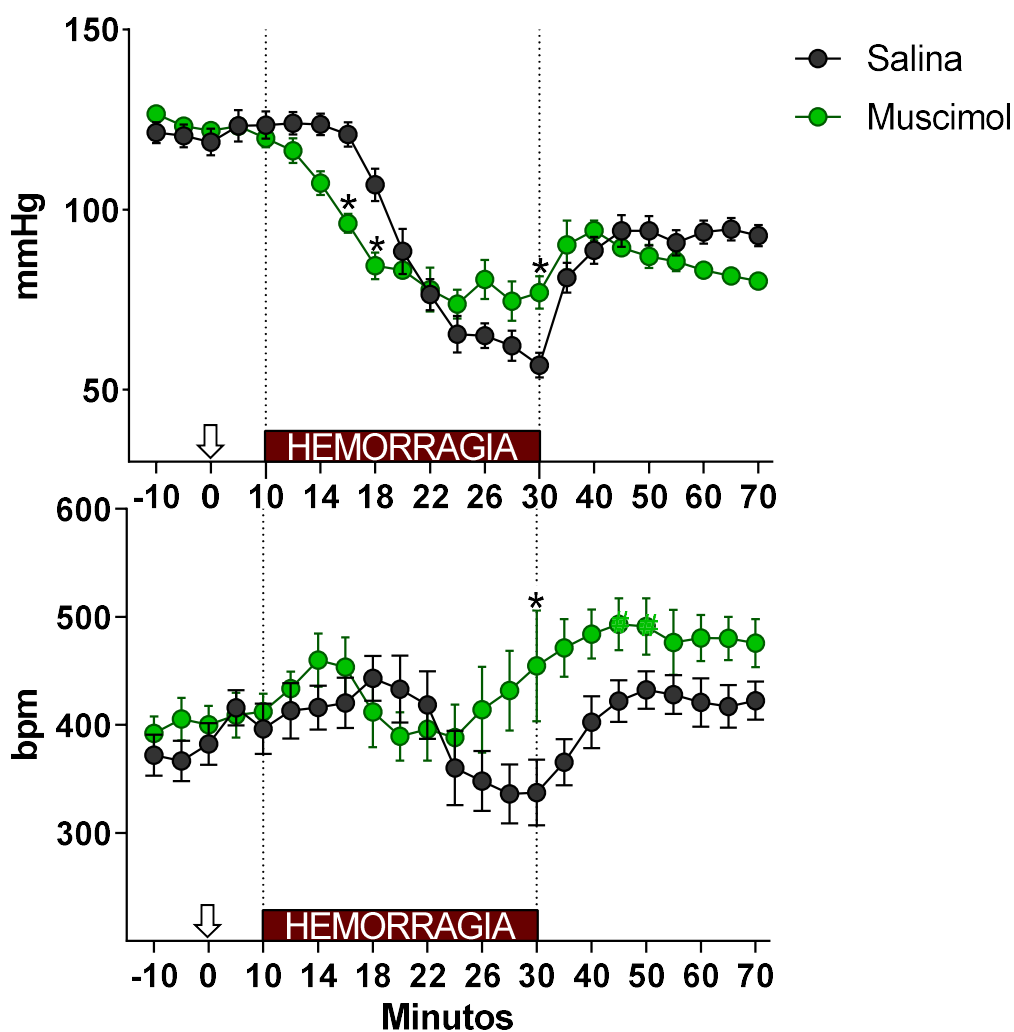
**Anexo 4.** Efeito da microinjeção bilateral de A779 no PVN junto da injeção i.v. do antagonista de receptor  $V_1$  sobre as alterações da PAM (mmHg) e FC (bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em ratos não anestesiados. A seta representa o momento da microinjeção de A779 (1 nmol, n = 8), Losartan (1 nmol, n = 5) ou Muscimol (1 nmol, n = 5); \* e ♦ Diferença significativa do respectivo grupo em relação ao grupo Muscimol, e ♦ diferença significativa do grupo A779 em relação grupo Losartan p<0,05 (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni);

## ANEXO 5: SALINA+DTYR VS A779+DTYR



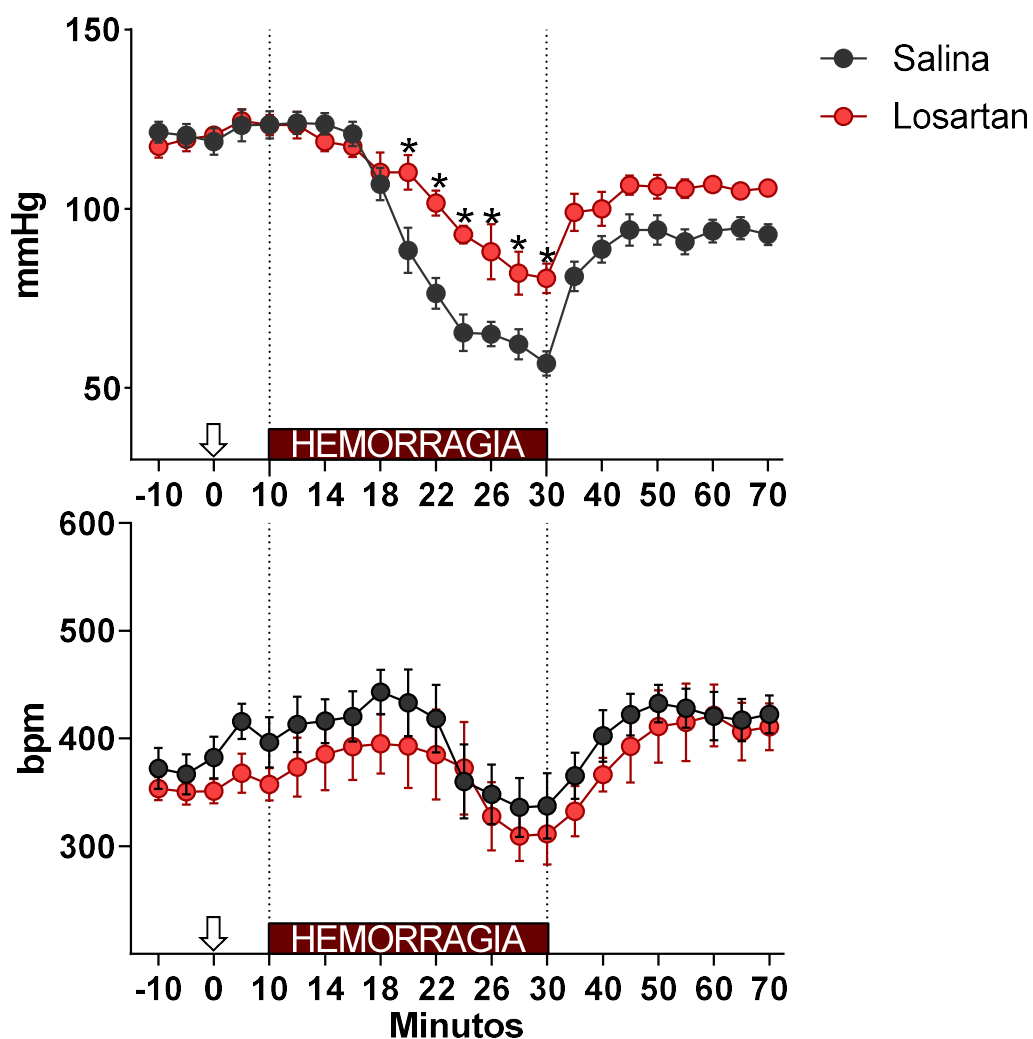
**Anexo 5.** Comparação do efeito da microinjeção bilateral de Salina e A779 no PVN junto da injeção i.v. do antagonista de receptor  $V_1$  sobre as alterações da PAM (mmHg) e FC (bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em ratos não anestesiados. A seta representa o momento da microinjeção de Salina+dTyr (NaCl 0,9% e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{kg}$ ,  $n = 5$ ) ou A779+dTyr (1 nmol e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{kg}$ ,  $n = 5$ ); # e # Diferença significativa em relação ao minuto 0 do respectivo grupo,  $p < 0,05$ ; & e & Diferença significativa em relação ao minuto 30 do respectivo grupo,  $p < 0,05$  (One-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

## ANEXO 6: VALORES ABSOLUTOS MUSCIMOL VS SALINA



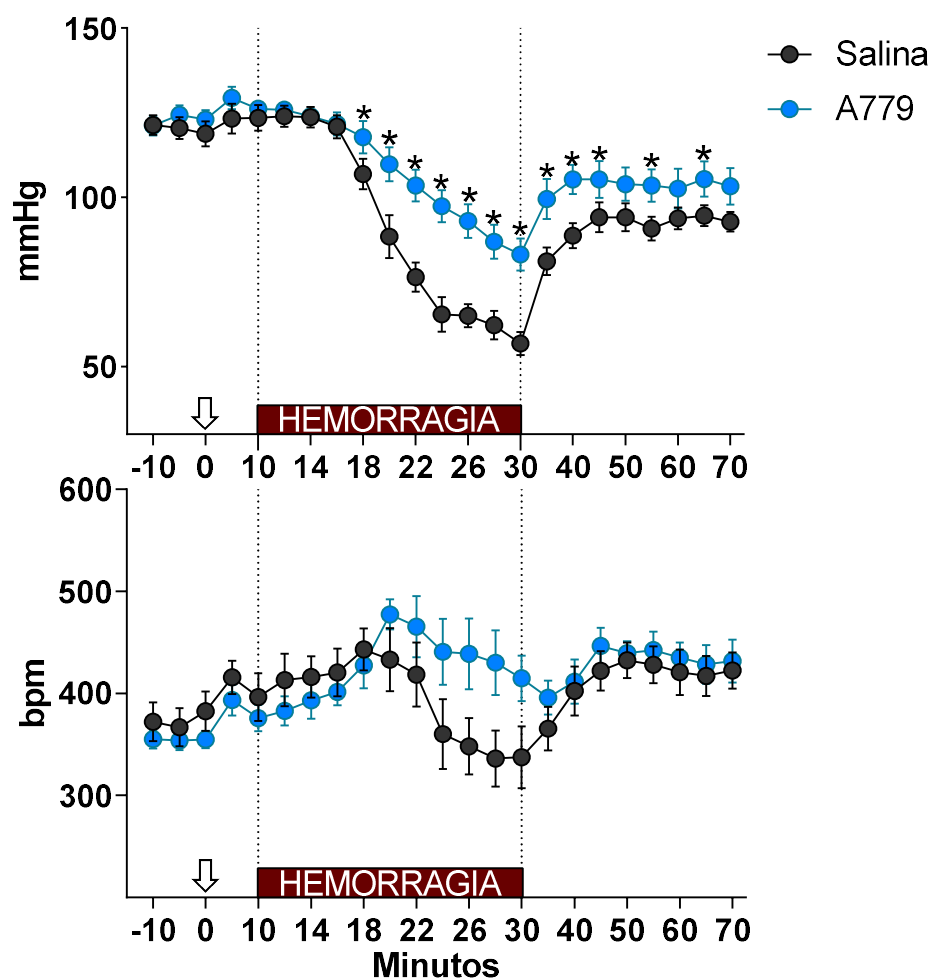
**Anexo 6.** Efeito da microinjeção bilateral de Muscimol no PVN sobre os valores absolutos da PAM (mmHg) e FC (bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em ratos não anestesiados. A seta representa o momento da microinjeção de Salina (NaCl 0,9%, n= 8) ou Muscimol (1 nmol, n= 5); \* Diferença significativa em relação ao grupo Salina,  $p < 0,05$  (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

## ANEXO 7: VALORES ABSOLUTOS LOSARTAN VS SALINA



**Anexo 6.** Efeito da microinjeção bilateral de Losartan no PVN sobre os valores absolutos da PAM (mmHg) e FC (bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em ratos não anestesiados. A seta representa o momento da microinjeção de salina (NaCl 0,9%, n = 8) ou Losartan (1 nmol, n= 5); \* Diferença significativa em relação ao mesmo período do grupo Salina,  $p < 0,05$ . (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).

## ANEXO 8: VALORES ABSOLUTOS A779 VS SALINA



**Anexo 7.** Efeito da microinjeção bilateral de A779 no PVN sobre os valores absolutos da PAM (mmHg) e FC (bpm) nos períodos antes, durante e após a hemorragia em ratos não anestesiados. A seta representa o momento da microinjeção de salina (NaCl 0,9%, n = 8) ou A779 (1 nmol, n = 8); \* Diferença significativa em relação ao mesmo período do grupo Salina,  $p < 0,05$ . (Two-way ANOVA multiple comparisons test seguido de pós-teste de Bonferroni).