

MARINA MATOS DE MOURA

**REFLEXOS CARDIOVASCULARES EM CAMUNDONGOS
COM ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DA
ANGIOTENSINA-(1-7), MAS**



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

043 Moura, Marina Matos de.
M929 Reflexos cardiovasculares em camundongos com alteração na expressão do receptor da Angiotensina-(1-7), MAS [manuscrito] / Marina Matos de Moura. – 2007.

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

Orientadora : Andréa Siqueira Haibara.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Instituto de Ciências Biológicas.

1. Fisiologia – Teses. 2. Angiotensina – Teses. 3. Sistema renina-angiotensina – Teses. 4. Sistema cardiovascular – Tese. 5. Camundongo como animal de laboratório – Teses. I. Haibara, Andréa Siqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

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

**REFLEXOS CARDIOVASCULARES EM CAMUNDONGOS COM
ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DA
ANGIOTENSINA-(1-7), MAS**

Pós-graduanda: MARINA MATOS DE MOURA

Orientadora: Prof^a Dr^a Andréa Siqueira Haibara
Co-orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos

**BELO HORIZONTE
2007**

REFLEXOS CARDIOVASCULARES EM CAMUNDONGOS
COM ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DA
ANGIOTENSINA-(1-7), MAS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais
para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Apoio Financeiro

Fapemig (EDT 2033/03 e CBB-981/05)

Capes

CNPq

À minha família, meu orgulho, meu exemplo, meu chão. Amo vocês...

*Ao meu amor e companheiro, Demerval Rezende, pela cumplicidade, pelo respeito e
imenso carinho. Eu te amo!*

Agradecimentos

À Deus, luz do meu caminho, minha fortaleza.

À minha avó Nadir, pelo carinho e pelas orações.

À Dona Maria, grande incentivadora, que se fez eterna no meu coração.

Ao Mateus, por transformar em alegria os meus dias.

À Dalva pela confiança e amizade.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia.

Ao Zezé, pelo auxílio em todos os momentos, pelo carinho e pela amizade.

À Celinha, pela eficiência e constante ajuda.

À professora Adelina, pela seriedade com que conduz nossa pós-graduação.

Aos professores e colegas do Laboratório de Hipertensão pela convivência e pelo aprendizado diário.

Ao irreverente Mihail Todiras, pela convivência e pelos ensinamentos durante a temporada na Alemanha.

Aos doutores Michael Bader e Natália Alenina, pela confiança e oportunidade.

Ao professor Robson, por todo o aprendizado e pela oportunidade.

Aos irmãos da família Haibara, Gisele, Tatiane, Guilherme, Edson, Shirley e Marcos, pela convivência agradável, pela amizade e pelo respeito.

À amiga Ana Paula Nadu, companheira de momentos difíceis e muito ricos, exemplo de dignidade.

Às amigas Betinha e Sordaini, que mesmo de longe continuam a me incentivar e cuidar.

Às amigas Gisele e Tatiane, que se transformaram em verdadeiras cúmplices. Crescemos, sorrimos e choramos juntas.

À minha grande amiga e orientadora, professora Andréa Haibara por tudo. Pela confiança, pelo carinho, pelos exemplos, pelo incentivo e principalmente, por não me deixar desistir dos meus sonhos e de minhas convicções.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|--|
| μg | Microgramas |
| μl | Microlitros |
| μm | Micrômetros |
| A-779 | Antagonista seletivo para angiotensina-(1-7) |
| Ang | Angiotensinas |
| Ang I | Angiotensina I |
| Ang II | Angiotensina II |
| Ang III | Angiotensina-(2-8) |
| Ang IV | Angiotensina-(3-8) |
| Ang-(1-7) | Angiotensina-(1-7) |
| Ang-(1-9) | Angiotensina-(1-9) |
| $\text{AT}_{(1-7)}$ | Receptor de angiotensina-(1-7) |
| AT_1 | Receptor angiotensinérgico subtipo 1 |
| AT_2 | Receptor angiotensinérgico subtipo 2 |
| AT_4 | Receptor angiotensinérgico subtipo 4 |
| Bpm | Batimentos por minuto |
| CEBIO | Centro de bioterismo |
| CVLM | Região caudal ventrolateral do bulbo |
| ECA | Enzima conversora de angiotensinas |
| ECA2 | Enzima conversora de angiotensina 2 |
| EPM | Erro padrão da média |
| FB | Fenilbiguanida |
| FC | Frequência cardíaca |

| | |
|--------------------|--|
| FE | Fenilefrina |
| GABA | Ácido γ aminobutírico |
| Hz | Hertz |
| i.v. | Intravenosa |
| ICV | Intracerebroventricular |
| IP | Intervalo de pulso |
| IRAP | Aminopectidase insulina-regulada |
| KCN | Cianeto de potássio |
| Kg | Quilogramas |
| KO | Camundongo Knockout |
| KO-AT ₁ | Camundongos Knockout para o receptor AT ₁ |
| KO-AT ₂ | Camundongos Knockout para o receptor AT ₂ |
| KO-Mas | Camundongos Knockout para o receptor Mas |
| mg | Miligramas |
| min. | Minutos |
| ml | Mililitros |
| mmHg | Milímetros de mercúrio |
| mRNA | Ácido ribonucléico (mensageiro) |
| ms | Milisegundos |
| NA | Núcleo ambíguo |
| NEP | Protil endopeptidase |
| ng | Nanogramas |
| nl | Nanolitros |

| | |
|----------|--|
| nmol | Nanomol |
| NPS | Nitroprussiato de sódio |
| NSE | Neuron specific enolase |
| NSE-Mas | Camundongo com superexpressão do receptor Mas no cérebro |
| NTS | Núcleo do trato solitário |
| PA | Pressão arterial |
| PAM | Pressão arterial média |
| PAP | Pressão arterial pulsátil |
| PCR | Reação em cadeia pela polimerase |
| pg | Picogramas |
| pH | Concentração hidrogeniônica |
| RVLM | Região rostral ventrolateral do bulbo |
| RVMM | Região rostral ventromedial do bulbo |
| SD | Sprague-Dawley |
| SHR | Rato espontaneamente hipertenso |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SRA | Sistema renina-angiotensina |
| Vs | Versus |
| Δ | Delta de variação |

“As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias que precisam, e quando não as encontram, as criam”.

(Wiston Spencer Churchill)

RESUMO

Várias substâncias podem modular a atividade cardiovascular reflexa, entre elas os peptídeos do SRA. O SRA tecidual está envolvido na regulação da estrutura e função cardiovascular e, conseqüentemente no controle a longo prazo da PA, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento e manutenção da alta resistência periférica e hiper-reatividade vascular encontradas em várias formas de hipertensão essencial e experimental. Os estudos sobre a influência do SRA sobre o controle neural da PA demonstram que a Ang II diminui a sensibilidade do barorreflexo, diminui a sensibilidade do reflexo de Bezold-Jarisch e facilita a resposta quimiorreflexa. Sabendo-se que várias ações da Ang-(1-7) são opostas às observadas pela Ang II, principalmente no que se refere aos seus efeitos sobre o controle cardíaco e vascular, bem como sobre a sensibilidade barorreflexa, é razoável supor que o heptapeptídeo Ang-(1-7), agindo em seu receptor Mas, também participe da regulação do reflexo Bezold-Jarisch e do quimiorreflexo. Com a possibilidade de utilizar animais geneticamente modificados quanto à expressão do receptor Mas, avaliamos a hipótese de que a Ang-(1-7), via receptor Mas, contribui para a modulação das respostas cardiovasculares reflexas, em camundongos com deleção do receptor Mas ou com superexpressão deste receptor no cérebro. Na seqüência, considerando as evidências de ações contra-regulatórias entre Ang II/Ang-(1-7), e a possibilidade de interação dos receptores Mas/AT₁, também avaliamos em nosso estudo a hipótese de a deleção do receptor Mas alterar os efeitos mediados pela Ang II, em decorrência da ausência dos efeitos contra-regulatórios mediados pela Ang-(1-7), via receptor Mas. Utilizamos camundongos controle (Wild Type) e com alterações da expressão do receptor da Ang-(1-7), receptor Mas: com deleção do receptor da Ang-(1-7)

Mas (KO-Mas) e com superexpressão deste receptor no cérebro (NSE-Mas), de duas linhagens diferentes (C57BL6J e FVBN). Demonstramos neste estudo, através da utilização de camundongos submetidos à manipulação da expressão gênica do receptor Mas, a efetiva participação da Ang-(1-7) via receptor Mas na manutenção e controle das variáveis cardiovasculares. Camundongos com deleção do receptor Mas da linhagem FVBN não anestesiados apresentam valores de PAM basais elevados em relação aos animais controle (118 ± 1 vs. 109 ± 2 mmHg, $p < 0.01$), mas não apresentam alterações significativas nos valores basais de FC (615 ± 30 vs. 648 ± 13 bpm). A deleção do receptor Mas atenua a bradicardia barorreflexa (0.78 ± 0.44 vs. 1.3 ± 0.14 ms/mmHg, $p < 0.05$), facilita a taquicardia barorreflexa (1.63 ± 0.4 vs. 0.80 ± 0.13 ms/mmHg, $p < 0.05$), atenua as respostas hipotensora e bradicárdica que constituem o reflexo de Bezold-Jarisch (-17 ± 5 vs. -45 ± 6 Δ PAM, mmHg, e -212 ± 36 vs. -391 ± 29 Δ FC, bpm, FB $0.5\mu\text{g}/5\mu\text{l}$, $p < 0.01$) e facilita as respostas reflexas observadas após estimulação do quimiorreflexo (20 ± 3 vs. 12 ± 0.8 Δ PAM, mmHg, e -250 ± 74 vs. -52 ± 26 Δ FC, bpm, KCN $2.5\mu\text{g}/5\mu\text{l}$, $p < 0.05$) em camundongos da linhagem FVBN, não anestesiados. Em acordo com as alterações descritas, observamos que a deleção do receptor Mas reduz o efeito taquicárdico promovido pela administração de metilatropina (23 ± 4 vs. 70 ± 19 Δ FC, bpm, $p < 0.05$) e aumenta o efeito bradicárdico promovido pela administração de atenolol (-181 ± 10 vs. -115 ± 23 Δ FC, bpm, $p < 0.05$). Utilizando camundongos transgênicos que superexpressam o receptor Mas no cérebro (NSE-Mas), observamos que a Ang-(1-7), agindo no SNC, participa do controle das variáveis cardiovasculares basais e reflexas. A superexpressão do receptor Mas no cérebro induz elevação dos valores basais de PAM (116 ± 3 vs. 109 ± 2 mmHg, $p < 0.05$) e não altera os valores basais de FC (641 ± 18 vs. 648 ± 13 bpm). Com

relação à resposta barorreflexa, observamos que a superexpressão do receptor Mas no cérebro promove facilitação da bradicardia barorreflexa (2.03 ± 0.33 vs. 1.3 ± 0.14 ms/mmHg, $p < 0.05$). Para avaliar a contribuição da Ang-(1-7) endógena, administramos ICV o antagonista da Ang-(1-7), A-779, e apesar de não observarmos alterações significativas nos valores de PAM e FC basais dos camundongos NSE-Mas e controle, observamos que as respostas bradicárdica (1.17 ± 0.14 vs. 1.92 ± 0.37 ms/mmHg, $p < 0.05$), e taquicárdica (0.49 ± 0.11 vs. 0.94 ± 0.32 ms/mmHg, $p < 0.01$), barorreflexas foram significativamente reduzidas nos camundongos controle. Considerando os resultados do presente estudo, destacamos a importância da interação Ang-(1-7)/Mas contrabalanceando as ações clássicas da Ang II/AT₁ para a manutenção da atividade autonômica cardíaca, assim como na modulação das respostas cardiovasculares reflexas e na manutenção dos valores basais de PA. Estes resultados associados aos dados da literatura, corroboram a relevância fisiológica da Ang-(1-7), agindo via receptor Mas, no controle da função cardiovascular.

ABSTRACT

Several substances may modulate reflex cardiovascular activity, such renin-angiotensin system peptides. The renin-angiotensin system is involved in regulation of cardiovascular structures and functions and, consequently in long-term blood pressure control, contributing in a significant way to maintenance and development of high peripheral resistance and vascular hypereactivity found in the essential and experimental hypertension. Studies about the renin-angiotensin influences on neural control of BP show that Ang II reduces baroreflex sensitivity, reduces the Bezold-Jarisch reflex sensitivity and increases the chemoreflex responses. Because known that several Ang-(1-7) actions are opposite to Ang II actions, mainly about cardiac and vascular control, as well baroreflex sensitivity, it is reasonable to suppose that the heptapeptide Ang-(1-7) acting on Ang-(1-7)'s Mas receptor, also to take part of the Bezold-Jarisch reflex and the chemoreflex. To have the opportunity to use genetic change animals as for Mas receptor expression, we assess the hypothesis that Ang-(1-7), via Mas receptor, to contribute for the reflex cardiovascular modulation, in mice with Mas receptor deletion or Mas receptor overexpression at brain. In sequence, considering the evidences of counter-regulatory actions between Ang II/Ang-(1-7), and the possibility to interaction between Mas/AT₁ receptors, we also to assess the hypothesis that Mas receptor deletion to change the Ang II effects, because the absence to counter-regulatory effects to Ang-(1-7), via Mas receptor. We use control (Wild-Type) and Mas receptor expression changes mice, Knockout Mas receptor mice (KO-Mas) and overexpression in brain Mas receptor (NSE-Mas), with background C57BL6J and FVBN. We showed in this study, through genetic manipulation of the Mas receptor expression, the effective participation of Angiotensin-(1-7) in the

cardiovascular control. Mas knockout mice (FVBN background) awake show high basal MAP values in comparison with control mice (118 ± 1 vs. 109 ± 2 mmHg, $p < 0.01$), but not show significant changes in basal HR values (615 ± 30 vs. 648 ± 13 bpm). The deletion of Mas receptor decreases baroreflex bradycardia (0.78 ± 0.44 vs. 1.3 ± 0.14 ms/mmHg, $p < 0.05$), increases baroreflex tachycardia (1.63 ± 0.4 vs. 0.80 ± 0.13 ms/mmHg, $p < 0.05$), decreases the bradycardic and hypotensive response of Bezold-Jarisch reflex (-17 ± 5 vs. -45 ± 6 mmHg e -212 ± 36 vs. -391 ± 29 bpm, FB $0.5\mu\text{g}/5\mu\text{l}$, $p < 0.01$) and increases the reflex responses observed by chemoreflex stimulation (20 ± 3 vs. 12 ± 0.8 mmHg e -250 ± 74 vs. -52 ± 26 bpm, KCN $2.5\mu\text{g}/5\mu\text{l}$, $p < 0.05$) in awake FVBN background mice. In accordance with changes describe, we showed that Mas knockout receptor mice had reduce tachycardic effect produce by methilatropine administration (23 ± 4 vs. 70 ± 19 bpm, $p < 0.05$) and increase bradycardic effect induced by atenolol administration (-181 ± 10 vs. -115 ± 23 bpm, $p < 0.05$). When we measure transgenic mice with overexpression of Mas receptor in brain (NSE-Mas), demonstrate that Ang-(1-7), acting in CNS, participate of basal and reflex cardiovascular variables control. The Mas receptor overexpression in brain mice induces increases of basal MAP (116 ± 3 vs. 109 ± 2 mmHg, $p < 0.05$) and not change basal HR values (641 ± 18 vs. 648 ± 13 bpm). About bradycardic barorefelx response, we showed that Mas receptor overexpression in brain promotes increase this response (2.03 ± 0.33 vs. 1.3 ± 0.14 ms/mmHg, $p < 0.05$). After A-779, Ang-(1-7) antagonist, ICV administration, despite did not show significant changes in MAP and HR basal values in NSE-Mas and control mice, we show that bradycardic (1.17 ± 0.14 vs. 1.92 ± 0.37 ms/mmHg, $p < 0.05$), and tachycardic (0.49 ± 0.11 vs. 0.94 ± 0.32 ms/mmHg, $p < 0.01$), baroreflex responses were significantly decrease only in control FVBN background awake mice. In this study, we highlight the important interaction Ang-(1-7)/Mas

couter-balancing the classic actions of Ang II/AT₁ in the cardiac autonomic activity maintenance, as reflexes and basal cardiovascular responses control. These results join with literature reports, contribute to physiologic relevancy of Ang-(1-7), acting on the Mas receptor, in the cardiovascular function control.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| Lista de abreviaturas | Vi |
| Resumo | X |
| Abstract | Xiii |
| 1 – INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 – Regulação Neural da Pressão Arterial | 17 |
| 1.1.1 – Reflexos Cardiovasculares | 19 |
| 1.2 – Sistema Renina-Angiotensina | 26 |
| 1.2.1 – Receptor Mas | 33 |
| 1.3 – Sistema Renina-Angiotensina e Sistema Nervoso Central | 36 |
| 1.3.1 – Sistema Renina-Angiotensina e Reflexos cardiovasculares | 39 |
| 1.4 – Hipótese | 42 |
| 2 – OBJETIVO | 43 |
| 2.1 – Objetivo Geral | 43 |
| 2.2 – Objetivos Específicos | 43 |
| 3 – MATERIAL E MÉTODOS | 44 |
| 3.1 – Animais | 44 |
| 3.1.1 – Camundongos geneticamente modificados para o gene <i>Mas</i> | 44 |
| 3.1.1.1 – Camundongos com deleção do receptor Mas | 44 |
| 3.1.1.2 – Camundongos com superexpressão do receptor Mas no cérebro | 46 |
| 3.2 – Anestesia | 47 |
| 3.3 – Procedimentos cirúrgicos | 48 |
| 3.3.1 – Canulação de vasos sanguíneos | 48 |
| 3.3.1.1 – Experimentos em animais anestesiados | 48 |
| 3.3.1.2 – Experimentos em animais não anestesiados | 49 |
| 3.3.2 – Canulação do ventrículo lateral | 51 |
| 3.4 – Mensuração da temperatura retal | 52 |
| 3.5 – Injeções intravenosas | 52 |

| | |
|---|-----|
| 3.6 – Microinjeções intracerebroventriculares (ICV) | 53 |
| 3.7 – Drogas | 54 |
| 3.8 – Registro das variáveis cardiovasculares | 54 |
| 3.9 – Teste de sensibilidade do controle barorreflexo da FC | 54 |
| 3.10 – Teste de avaliação do reflexo Bezold-Jarisch | 56 |
| 3.11 – Teste de avaliação do quimiorreflexo | 57 |
| 3.12 – Avaliação do tônus autonômico | 57 |
| 3.13 – Protocolos Experimentais | 58 |
| 3.14 – Genotipagem | 63 |
| 3.15 – Análise histológica | 65 |
| 3.16 – Análise de dados | 67 |
| 4 – RESULTADOS | 68 |
| <i>4.1 - Avaliação dos parâmetros cardiovasculares basais e reflexos cardiovasculares em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) anestesiados:</i> | 68 |
| <i>4.2 - Avaliação do efeito da infusão i.v. de Ang II sobre as respostas cardiovasculares à estimulação dos reflexos cardiovasculares em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) anestesiados:</i> | 74 |
| <i>4.3 - Avaliação dos parâmetros cardiovasculares basais e dos reflexos cardiovasculares em camundongos da linhagem FVBN com deleção do receptor Mas (KO-Mas) não anestesiados:</i> | 81 |
| <i>4.4 - Avaliação do efeito da infusão i.v. de Ang II sobre as respostas cardiovasculares à estimulação do barorreflexo e sobre a função autonômica cardíaca em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) não anestesiados:</i> | 90 |
| <i>4.5 - Avaliação dos parâmetros cardiovasculares basais, da sensibilidade barorreflexa e dos efeitos da infusão ICV do antagonista da Ang-(1-7), A-779 sobre estes parâmetros em camundongos da linhagem FVBN com superexpressão do receptor Mas no cérebro (NSE-Mas) não anestesiados:</i> | 104 |
| 5 – DISCUSSÃO | 111 |
| 6 – CONCLUSÕES | 151 |
| 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 153 |
| 8 – ANEXOS | 177 |

1 – INTRODUÇÃO:

1.1 - Regulação Neural da Pressão Arterial:

A manutenção da pressão arterial (PA) em níveis adequados e a integridade da composição dos fluidos corporais e do volume do líquido extracelular em mamíferos dependem da interação entre diversos mecanismos sensoriais capazes de reconhecer alterações nos parâmetros relacionados à função cardiovascular. A regulação da PA é, portanto, uma das funções fisiológicas mais complexas, que depende de ações integradas dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino (Krieger, 1964; Bristow e cols., 1969; Krieger, 1970; Kirchheim, 1976; Shepherd e Mancia, 1986; Zanchetti e Mancia, 1991).

A manutenção da PA em níveis adequados, determinando a perfusão sanguínea adequada dos tecidos, é crucial para a sobrevivência. Importantes modificações regionais de fluxo ocorrem em diferentes situações assumidas pelo indivíduo nas 24 horas do dia. Estas modificações não causam grandes alterações nos níveis de PA devido à interação dos mecanismos reguladores que mantêm a PA dentro de uma faixa relativamente estreita de variação (Krieger, 1964; Bristow e cols., 1969; Krieger, 1970; Kirchheim, 1976; Shepherd e Mancia, 1986; Zanchetti e Mancia, 1991; Michelini e Salgado, 1997; Campagnole-Santos e Haibara, 2001).

A regulação efetiva da PA é o resultado da atividade de sistemas de retroalimentação que operam a curto e longo-prazo. O principal mecanismo de controle a curto-prazo é desempenhado pelos reflexos cardiovasculares (Bristow e cols., 1969; Kirchheim, 1976; Shepherd e Mancia, 1986; Zanchetti e Mancia, 1991; Vasquez e cols., 1995; Campagnole-Santos e Haibara, 2001). Desta forma, o sistema nervoso central

(SNC) desempenha um papel crítico na manutenção do fluxo sanguíneo para os tecidos corporais e seu retorno ao coração e pulmões (Chalmers, 1975; Dampney e cols., 1982; Reis e cols., 1984; Chalmers e Pilowsky, 1991; Dampney, 1994; Pilowaky e Gooschild, 2002).

Os mecanismos neurais de controle da PA resultam em alterações apropriadas do débito cardíaco, da resistência periférica e do retorno venoso através da intervenção do SNC, que, integrando as informações provenientes de diferentes sensores do sistema cardiovascular, modula a atividade cardíaca e vascular por meio de nervos autonômicos periféricos e da liberação de diferentes hormônios. A regulação neural da PA funciona como um arco-reflexo envolvendo receptores, aferências, centros de integração, eferências e efetores, além de alças hormonais (Dampney e cols., 1982; Reis e cols., 1984; Dampney, 1994; Murphy e cols., 1994; Morrison e Cao, 2000; Pilowky e Goodchild 2002; Dampney e Horiuchi 2003).

O núcleo do trato solitário (NTS) recebe as aferências correspondentes aos receptores cardiovasculares no SNC e desempenha função importante na modulação da atividade eferente autonômica do sistema cardiovascular. Entre os principais sistemas aferentes cardiovasculares envolvidos na regulação autonômica da PA, ou seja, os aferentes dos barorreceptores aórticos e carotídeos (barorreflexo), dos quimiorreceptores carotídeos e aórticos (quimiorreflexo) e das fibras aferentes vagais cardiopulmonares (Reflexo Bezold-Jarisch), todos realizam sua primeira sinapse no NTS (Dampney, 1994; Machado e cols., 1997; Dampney e Horiuchi, 2003). As informações da periferia referentes aos níveis de PA, volume sanguíneo ou composição química dos gases sanguíneos, são processadas no NTS que promove respostas autonômicas reflexas, de acordo com os ajustes requeridos para normalização dos parâmetros fisiológicos.

1.1.1 – Reflexos Cardiovasculares:

O barorreflexo é o principal mecanismo de regulação da PA e função cardiovascular, sendo estudado intensivamente em numerosas espécies animais e em seres humanos. Participa da homeostase hemodinâmica, principalmente por controlar o tônus simpático e parassimpático para o coração e vasos (Krieger, 1970; Kirchheim 1976; Sapru e Wang, 1979; Shepherd e Mancia, 1986; Chapleau e cols., 1988).

O barorreflexo realiza estabilização rápida e eficiente da PA a cada batimento cardíaco. Isso é possível pela estratégica localização dos barorreceptores como sensores arteriais, capazes de detectar efetivamente qualquer alteração mecânica (mecanorreceptores) provocada na parede dos vasos arteriais por mudanças súbitas nos valores da PA. Esses receptores são terminações nervosas localizadas primariamente na adventícia do seio carotídeo e arco aórtico, cujos corpos neuronais estão situados nos gânglios petroso e nodoso, respectivamente. A cada sístole, o estiramento desses sensores promove despolarização dos terminais neurais e potenciais de ação são então disparados, trafegando para o SNC (via nervos vago e glossofaríngeo), realizando sinapses com os neurônios do NTS no bulbo dorsal ((Krieger, 1970; Kirchheim 1976; Sapru e Wang, 1979; Shepherd e Mancia, 1986; Chapleau e cols., 1988).

Os neurônios do NTS projetam-se para a região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM) realizando sinapses com neurônios inibitórios que por sua vez, projetam-se para a região rostral ventrolateral do bulbo (RVLM), realizando sinapses com neurônios simpatoexcitatórios bulboespinhais localizados nesta área. Estes neurônios de segunda ordem, também mantêm influência excitatória sobre neurônios pré-ganglionares parassimpáticos localizados no núcleo dorsal do vago e região rostral ventromedial do

bulbo (RVMM) e principalmente, no núcleo ambíguo (NA) (Krieger, 1970; Kirchheim 1976; Sapru e Wang, 1979; Shepherd e Mancia, 1986; Chapleau e cols., 1988; Dampney e Horiuchi, 2003). Desta forma, a estimulação dos barorreceptores resulta em inibição da atividade simpática e aumento da atividade parassimpática.

Embora o circuito descrito seja o mais importante, a modulação deste sistema não é restrita a áreas bulbares, mas é também influenciada por áreas suprabulbares. Ainda, a atividade nervosa barorreceptora é modulada por vários outros fatores, tais como atividade de canais iônicos, fatores parácrinos, além de alterações na estrutura e distensibilidade vascular em estados fisiológicos e patológicos (Krieger, 1970; Kirchheim 1976; Sapru e Wang, 1979; Shepherd e Mancia, 1986; Chapleau e cols., 1988; Dampney e Horiuchi, 2003).

É bem estabelecido na literatura que o barorreflexo tampona eficazmente as variações súbitas da PA, enquanto as variações mantidas da mesma não contam com esta eficácia (Persson e cols., 1989). Estudos realizados em humanos e animais experimentais nas três últimas décadas demonstraram que o controle reflexo neural da circulação não depende somente do barorreflexo, mas também, e em importante extensão, do reflexo cardiopulmonar. O reflexo cardiopulmonar foi descoberto há mais de um século, como importante mecanismo de controle cardiocirculatório tanto em condições fisiológicas quanto em condições patológicas (Krieger, 1970; Kirchheim 1976; Sapru e Wang, 1979; Shepherd e Mancia, 1986; Chapleau e cols., 1988; Vasquez e cols., 1997; Dampney e Horiuchi, 2003).

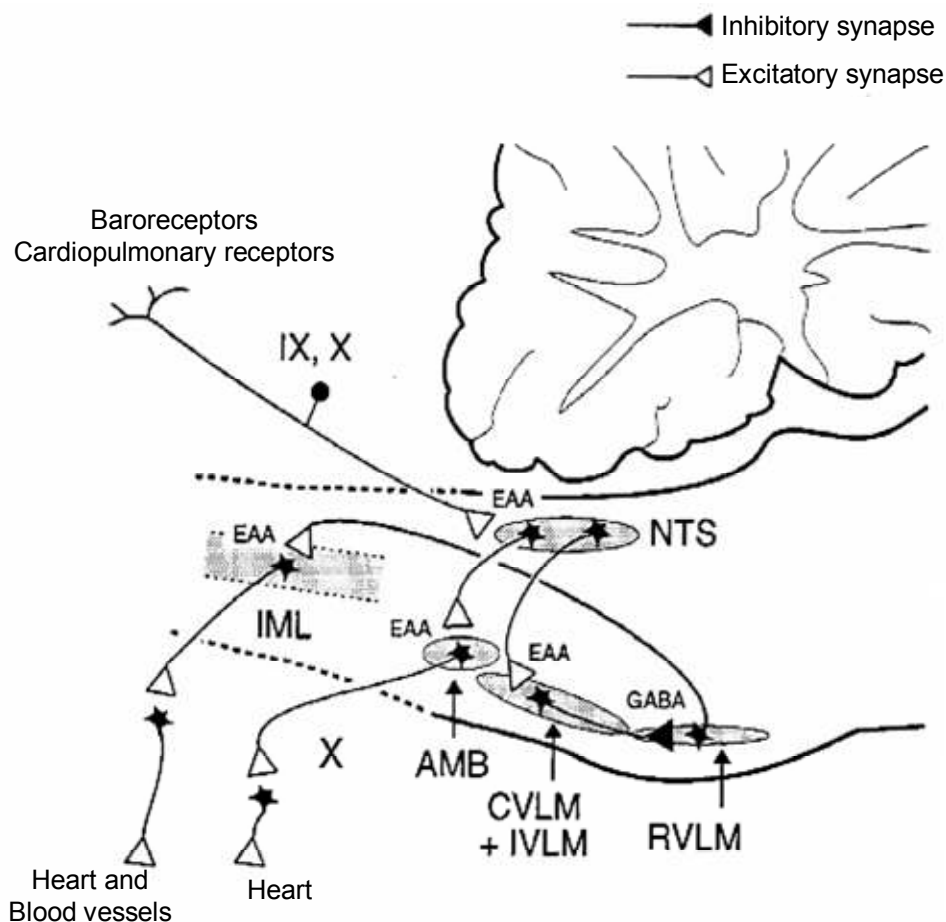


Figura I – Diagrama esquemático ilustrando as vias neurais responsáveis pela mediação das respostas cardiovasculares reflexas desencadeadas por estimulação dos barorreceptores e receptores cardiopulmonares (Adaptada: Dampney e Horiuchi, 2003).

Os receptores responsáveis pelo reflexo cardiopulmonar constituem um grupo de aferências mais heterogêneas do que os barorreceptores arteriais, apresentando padrões de disparos não tão uniformes (Persson e cols., 1989). A maioria das aferências é composta de fibras vagais amielínicas (fibras C), com baixa velocidade de condução. Elas se originam de uma rede de fibras, localizadas em regiões de baixa pressão, distribuídas pelos átrios, junções átrio-venosas e ventrículos (Coleridge e cols., 1973). Os receptores

atriais são ativados por variações de volume das câmaras atriais, enquanto os receptores ventriculares são estimulados pelas variações da pré-carga, pós-carga e contratilidade (Persson e cols., 1989).

Os efeitos da estimulação dos receptores cardiopulmonares podem incluir hipotensão, bradicardia, diminuição dos níveis plasmáticos de vasopressina e renina e aumento da diurese. Por outro lado, a desativação dos receptores cardiopulmonares no homem causa aumento da atividade simpática muscular e renal e aumento da atividade da renina e norepinefrina plasmáticas.

Em 1867, von Bezold e Hirt descreveram em animais experimentais uma tríade de respostas (bradicardia, hipotensão e apnéia) como resultado da injeção intravenosa de um extrato alcalóide de *Veratrum viride* ou *Viscum album*. Estendendo estas observações, Jarisch e Richter (1939) demonstraram que a veratridina excita receptores vagais na região cardiopulmonar e que este efeito era acompanhado de bradicardia e hipotensão. Outros investigadores, principalmente farmacologistas e fisiologistas, referiram-se à tríade descrita como respostas do reflexo de Bezold-Jarisch ou efeitos de Bezold-Jarisch (Thorén, 1979; Aviado e Aviado, 2001).

Assim, o reflexo cardiopulmonar é estimulado não somente por mudanças na pressão de enchimento cardíaco, mas também por algumas substâncias químicas, tais como a veratridina, a serotonina e a fenilbiguanida, uma vez que estes receptores são polimodais. A ativação fisiológica ou farmacológica do reflexo cardiopulmonar resulta em importante bradicardia, hipotensão e diminuição da frequência e profundidade da respiração (Vasquez e cols., 1997; Paton, 1998).

As fibras aferentes vagais do reflexo de Bezold-Jarisch projetam-se para neurônios localizados no NTS. As vias neurais bulbares do reflexo de Bezold-Jarisch parecem ser

as mesmas envolvidas nas respostas reflexas da estimulação dos barorreceptores (Herbert e cols., 1990; Verberne e Guyenet, 1992; Mifflin, 1997; Paton e cols., 2003).

Além de participar da regulação fisiológica da função cardiovascular, estudos têm descrito a participação do reflexo de Bezold-Jarisch em situações fisiopatológicas. A síncope vasovagal tem sido atribuída à ativação do Reflexo de Bezold-Jarisch (Thorén 1979; Aviado e Aviado, 2001). Esta afirmativa partiu dos estudos de Ebert e cols. (1962), que demonstraram que hemorragia em cães pode disparar uma bradicardia mediada pelo vago. O mecanismo da ativação dos receptores seria provavelmente a combinação do efeito de um aumento da atividade simpática cardíaca e uma diminuição no enchimento ventricular. Estes dois estímulos juntos induziriam uma importante contração das câmaras cardíacas, levando a um aumento da deformação do miocárdio, o que ativaria os receptores cardiopulmonares, induzindo a reação vasovagal (Thorén, 1979).

Em 1930, Heymans e Bouckaert, demonstraram pela primeira vez, através de estudos fisiológicos, que a região da bifurcação carotídea constitui-se uma área reflexogênica sensível à hipóxia, demonstrando que a composição química do sangue na bifurcação carotídea influenciava reflexamente a atividade dos centros respiratórios.

A literatura mostra evidências de que os quimiorreceptores periféricos não contribuem somente para o controle da ventilação, mas também para os mecanismos neurais envolvidos no controle da PA. O papel fisiológico dos quimiorreceptores periféricos está relacionado à promoção de ajustes ventilatórios e cardiovasculares no sentido de proporcionar a manutenção da composição química do sangue em níveis ideais, bem como uma pressão de perfusão sanguínea adequada para todos os tecidos (Guazzi e cols., 1968; Marshall, 1987; Fukuda e cols., 1989; Habeck, 1991; Franchini e Krieger, 1992; Trzebski, 1992).

Os quimiorreceptores periféricos são constituídos por células altamente especializadas, capazes de detectar alterações da pressão parcial de oxigênio, pressão parcial de dióxido de carbono e concentração hidrogeniônica (pH) do sangue. Encontram-se distribuídos em corpúsculos carotídeos e aórticos, localizados bilateralmente na bifurcação da carótida comum (quimiorreceptores carotídeos) ou em pequenos corpúsculos espalhados entre o arco aórtico e a artéria pulmonar (quimiorreceptores aórticos), sendo irrigados por sangue arterial através de pequenos ramos que se originam a partir da carótida externa e aorta, respectivamente. Uma importante característica dos quimiorreceptores refere-se ao fato de estarem intimamente associados aos capilares sanguíneos, sendo cerca de 25% do volume total do corpúsculo carotídeo ocupado por capilares e vênulas, ou seja, uma vascularização de 5 a 6 vezes maior que a do cérebro (Habeck, 1991; Trzebski, 1992).

As fibras aferentes dos quimiorreceptores associam-se a fibras dos barorreceptores para formar o nervo do seio carotídeo, um ramo do nervo glossofaríngeo. No entanto, apesar de as fibras aferentes barorreceptoras e quimiorreceptoras trafegarem juntas no mesmo nervo, essas aferências realizam sinapses em locais distintos do NTS, diferente do local central primário de confluência das aferências do barorreflexo e reflexo cardiopulmonar. As sinapses do quimiorreflexo no NTS promovem excitação de vários circuitos neurais para diferentes regiões do tronco cerebral, produzindo alterações na atividade simpática e vagal para o coração e vasos sanguíneos, e atividade frênica para o diafragma (Trzebski e cols., 1975; Marshall, 1981; Mifflin, 1993; Vasquez e cols., 1997; Dampney e Horiuchi, 2003), resultando em aumento da PA, bradicardia e taquipnéia.

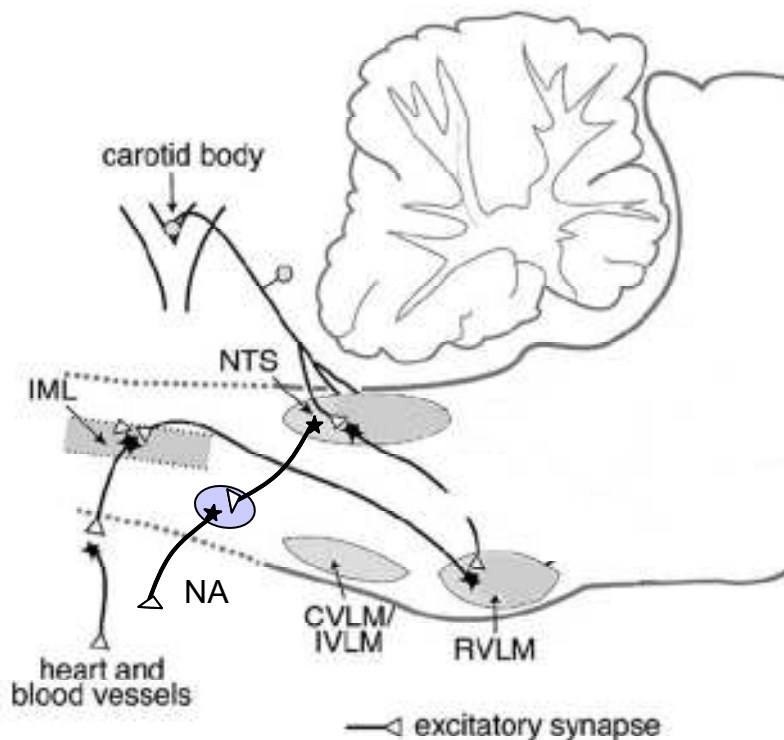


Figura II – Diagrama esquemático ilustrando as vias neurais responsáveis pela mediação das respostas cardiovasculares reflexas desencadeadas por estimulação dos quimiorreceptores (Adaptada: Dampney e Horiuchi, 2003).

Apesar dos avanços na compreensão do barorreflexo, reflexo dos receptores cardiopulmonares e quimiorreflexo, estudos adicionais são ainda necessários para melhor identificar e esclarecer a função dos componentes sensoriais aferentes, centrais e eferentes destes reflexos. Recentes descobertas genéticas, bem como o desenvolvimento de técnicas de modificação genética de animais intactos fornecem novas oportunidades para a investigação de mecanismos envolvidos no controle das funções cardiovasculares ainda pouco compreendidos (Ma, Abboud e Chapleau, 2002).

1.2 - Sistema Renina-Angiotensina:

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema hormonal amplamente estudado, cuja cascata de formação inclui interações enzima-substratos que resultam na produção de vários peptídeos biologicamente ativos. Desempenha importante papel no controle da pressão arterial, homeostase dos fluidos corporais e eletrólitos, e função celular (Ferrario e cols, 1997; Santos e cols, 2003).

Os peptídeos angiotensinérgicos são gerados a partir de uma única proteína precursora, o angiotensinogênio, pela ação da renina, enzima conversora de angiotensina, quimases e várias carboxipeptidases e aminopeptidases (Thomas e Mendelsohn, 2003).

Classicamente, angiotensinogênio, que é clivado pela protease renina, para formar o decapeptídeo angiotensina I (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰) (Ang I) na circulação (figura 01). A Ang I é hidrolisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), presente em vários locais, com altas concentrações principalmente nos pulmões, para formar o octapeptídeo Ang II (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸) (Wright e Harding, 1995; Bader e cols., 2001).

A Ang II é tradicionalmente reconhecida por suas funções endócrinas na regulação da resistência vascular, incluindo potente constrição do músculo liso vascular, retenção renal de água e sódio, efeitos diretos e indiretos nos rins, através da estimulação da síntese de aldosterona pela adrenal e interações com o sistema nervoso central (SNC) incluindo estímulo da ingestão de água, apetite ao sal e liberação do hormônio hipofisário (vasopressina), além de modular a regulação autonômica da função cardiovascular (Peach, 1977; Saavedra, 1992; Wright e Harding, 1992).

Nos últimos anos, a visão clássica de um SRA circulante e limitado às ações biológicas da Ang II sofreu várias e importantes modificações. Componentes do SRA

foram identificados por técnicas de biologia molecular e bioquímica em vários tecidos como rins, adrenal, endotélio vascular, órgãos reprodutores, coração e cérebro (Ganong, 1994), levando ao conceito de SRA tecidual ou mais apropriadamente, sistemas de formação de angiotensinas locais (Phillips e cols., 1979; Dzau, 1988; Phillips e cols., 1992; Wollert e Drexler, 1999).

Embora a Ang II seja o peptídeo efetor predominante no SRA, sabe-se agora, que outros peptídeos angiotensinérgicos são biologicamente ativos, incluindo angiotensina-(2-8) ($\text{Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8$) (Ang III), angiotensina-(1-7) ($\text{Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7$) [Ang-(1-7)] e angiotensina-(3-8) ($\text{Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8$) (Ang IV) (figura 01) (Braszko e cols., 1991; Santos e Campagnole-Santos, 1994; Santos e cols., 2000).

As ações da Ang II e dos demais peptídeos angiotensinérgicos são mediadas por múltiplos receptores localizados na membrana plasmática de suas células alvo, em diferentes espécies. A multiplicidade desses receptores foi demonstrada inicialmente com base em diferenças farmacológicas e confirmada posteriormente pela clonagem (Zhuo e cols., 1998; De Gasparo e cols., 2000; Nishimura, 2001).

Quatro tipos de receptores angiotensinérgicos já foram identificados: AT_1 , AT_2 , $\text{AT}_{(1-7)}$ e AT_4 (Ardaillou, 1999; De Gasparo, 2000). Receptores AT_1 (divididos em AT_{1a} e AT_{1b} , em roedores) e AT_2 são glicopeptídeos de 359 e 364 aminoácidos residuais respectivamente, e têm 32% de homologia em suas seqüências de aminoácidos (McKinley e cols., 1996). Ambos receptores, AT_1 e AT_2 , demonstram igual afinidade por peptídeos antagonistas tais como $[\text{Sar}^1, \text{Thr}^8]$ Ang II (sartran) ou $[\text{Sar}^1, \text{Ala}^8]$ Ang II (saralasin). No entanto, eles são distinguidos farmacologicamente por duas classes de antagonistas não-

peptídicos, losartan (antagonista de receptor AT_1) e PD123319 (antagonista de receptor AT_2) (Timmermans e cols., 1993).

Cascata do Sistema Renina-angiotensina: Visão atualizada

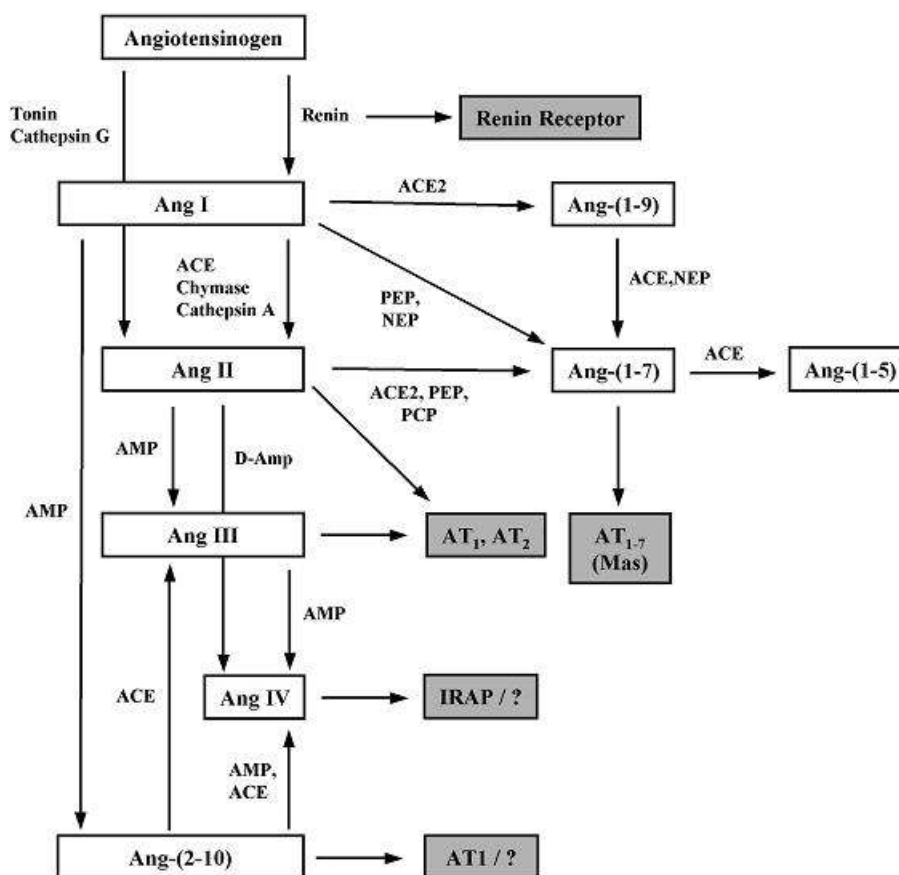


Figura III – Esquema ilustrando o circuito proteolítico para a formação de peptídeos angiotensinérgicos biologicamente ativos, e seus respectivos receptores (Ferreira e Santos, 2005).

O heptapeptídeo Ang III tem afinidade pelos subtipos de receptores AT₁ e AT₂ similar a Ang II. Por causa de sua meia-vida curta, tem sido difícil demonstrar suas funções (Harding e Felix, 1987). Estudos mostraram, que a resposta da Ang II administrada intracerebroventricularmente, depende de sua conversão em Ang III, sugerindo a possibilidade de que a Ang III possa agir em um outro receptor específico, ainda não caracterizado, nos neurônios magnocelulares hipotalâmicos (Zini e cols., 1996).

A Ang IV tem afinidade muito baixa por receptores AT₁ e AT₂. Locais específicos de acoplamento para Ang IV foram demonstrados no cérebro e em alguns tecidos periféricos, sendo designados de receptores AT₄. A função da Ang IV e de seus receptores tem sido elucidada e vários efeitos, incluindo a facilitação da memória de retenção e dilatação de vasos sanguíneos cerebrais, foram observados em resposta a aplicação de Ang IV (Allen e cols., 1998). O receptor AT₄ foi recentemente identificado através da purificação protéica e sequenciamento peptídico como uma aminopeptidase insulina-regulada (IRAP) (Albiston e cols., 2001). Estes receptores têm baixa afinidade pela Ang II e antagonistas de receptores AT₁ e AT₂, ligando-se principalmente a Ang IV e hemorfinas (Garreau e cols., 1998).

A Ang-(1-7), um heptapeptídeo com ausência da fenilalanina na posição 8 do peptídeo Ang II, é considerada atualmente um componente ativo do SRA, podendo ser gerada a partir da Ang I por via independente da ECA. A diversidade de vias enzimáticas pelas quais a Ang-(1-7) pode ser clivada a partir da Ang I sugere que a produção desse heptapeptídeo pode ser regulada em nível tecidual (Ferrario e cols., 1997). Estudos recentes propuseram que a Ang-(1-7) pode mediar alguns dos efeitos do tratamento com inibidores de ECA, a partir de observações em animais e cultura celular, de que a inibição

da ECA aumenta os níveis plasmáticos de Ang-(1-7) (Ferrario e cols., 1997; Roks e cols., 1999).

A descoberta do heptapeptídeo Ang-(1-7) foi realizada por Santos e cols., (1988) em experimentos com homogenato de cérebro de cães. Apesar de considerado, na época, um peptídeo inativo do SRA, a consistência e magnitude da produção de Ang-(1-7) e sua independência de formação da via clássica da ECA, observada em diversos estudos (Chappell e cols., 1990; Santos e cols., 1990; Kohara e cols., 1991; Welches e cols., 1991; Santos e cols., 1992) levantou a possibilidade de que a Ang-(1-7) poderia exercer efeitos centrais e periféricos seletivos. A primeira indicação de que a Ang-(1-7) é um peptídeo endógeno foi demonstrada por Block e cols., (1988) usando técnicas de imunohistoquímica. Neste estudo, imunorreatividade para Ang-(1-7) foi demonstrada em diversas áreas do SNC, inclusive no hipotálamo. Estudos subseqüentes, como o de Santos e cols. (1990), demonstraram a existência de Ang-(1-7) no plasma de diferentes espécies, inclusive em humanos (Lawrence e cols., 1990). Estes estudos demonstraram que a concentração plasmática de Ang-(1-7) não é afetada pela inibição aguda da ECA e aumenta várias vezes após a administração crônica de inibidores da ECA (Santos e Campagnole-Santos, 1994).

Estudos têm demonstrado que a Ang-(1-7) exerce efeitos fisiológicos que podem ser similares ou opostos aos da Ang II. Os primeiros estudos envolvendo Ang-(1-7) revelaram que este peptídeo estimula a atividade dos neurônios neurohipofisários-hipotalâmicos regulando a liberação de vasopressina com potência igual à Ang II (Schivone e cols., 1988). Por outro lado, enquanto a Ang II no cérebro, diminui a sensibilidade dos barorreceptores, a Ang-(1-7) facilita o barorreflexo (Campagnole-Santos e cols., 1989 e 1992; Silva e cols., 1993, Santos e cols., 2000).

Várias evidências obtidas após a disponibilização de um antagonista específico para a Ang-(1-7), o A-779 [D-Ala⁷-Ang-(1-7)], indicavam a existência de um receptor específico para este peptídeo, diferente dos receptores AT₁ e AT₂ para Ang II (Santos e cols., 1994; Ferrario e cols., 1998; Santos e cols., 2000).

Um argumento contra o estabelecimento definitivo da Ang-(1-7) como componente ativo do SRA era a não identificação de um receptor próprio para este peptídeo angiotensinérgico, apesar das várias evidências farmacológicas indicarem sua presença (Fontes e cols., 1994, 1997, 2000; Averill e Diz, 2000; Ito e Sved, 2000).

No entanto, Santos e cols. (2003) recentemente identificaram o protooncogene *Mas*, considerado até então um receptor acoplado à proteína G “órfão” (Zohn e cols., 1998), como o receptor funcional para a Ang-(1-7), apesar de estes autores não excluírem uma interação indireta entre *Mas* e a Ang II via receptor AT₁ (Jackson e cols., 1988; Ambroz e cols., 1991; von Bohlen und Halbach e cols., 2000). Estes achados demonstraram que o *Mas* se liga a Ang-(1-7) e está envolvido na mediação das ações biológicas deste peptídeo angiotensinérgico (Santos e cols., 2003).

Recentemente, uma enzima homóloga à ECA, uma carboxipeptidase denominada ECA2, foi identificada em humanos e roedores. Os domínios catalíticos da ECA e ECA2 são idênticos em 42% da seqüência de aminoácidos. A ECA2 catalisa a conversão de Ang I em Ang-(1-9) e degrada a Ang II em Ang-(1-7), sendo que sua atividade não é bloqueada pelos inibidores da ECA. Dessa forma, a ECA2 previne o acúmulo de Ang II enquanto favorece a formação de Ang-(1-7), a qual promove em contra-regulação das ações deletérias da Ang II (Donoghue e cols., 2000; Ye e cols., 2004).

A ECA2 exibe uma alta eficiência catalítica para a conversão de Ang II a Ang-(1-7), quase 500 vezes maior que para a conversão de Ang I a Ang-(1-9). A partir de um ensaio

com mais de 120 peptídeos, somente dois (dinofirina A e apelina 13) foram hidrolisados pela ECA2 com cinética comparável à conversão de Ang II a Ang-(1-7). Assim, a ECA2 converte o vasoconstritor e promotor de crescimento Ang II em Ang-(1-7), um peptídeo com propriedades vasodilatadoras e anti-proliferativas; provendo um aparente mecanismo para balancear diretamente os níveis de Ang II e Ang-(1-7), modulando os eixos pressor/mitogênico e depressor/anti-proliferativo do SRA (Gallagher e cols., 2006).

Os estudos sobre a função da Ang-(1-7) no controle da PA sugerem que o SRA possui a capacidade de limitar as ações pressoras e proliferativas da Ang II através de mecanismos que dependem da geração alternativa de Ang-(1-7). Neste contexto, a Ang-(1-7) agiria como peptídeo sinalizador da ativação do mecanismo de *feedback* negativo que limitaria ou contra-regularia os efeitos produzidos pela Ang II através da estimulação de substâncias vasodilatadoras como prostaciclina, óxido nítrico ou ambos (Ferrario e cols., 1997). Estudo de Roks e cols. (1999), mostrou que a Ang-(1-7) antagoniza a vasoconstrição induzida pela Ang II em artérias de seres humanos e inibe a ECA plasmática, cardíaca e vascular, sugerindo que a Ang-(1-7) seria um modulador do SRA cardiovascular em humanos.

É bem documentado na literatura que a Ang II e a Ang-(1-7) produzidas e agindo no cérebro, desempenham papel importante na modulação da função cardiovascular. Ainda, os efeitos benéficos do bloqueio do SRA têm sido atribuídos à inibição das propriedades vasoconstritoras e hipertróficas da Ang II. A recente identificação da proteína ECA2 no cérebro fornece evidências para um papel de tampão desempenhado por esta proteína diante de ativação do SRA. A ECA2 parece desempenhar efeito de tamponamento, uma vez que é capaz de converter o excesso de Ang II em Ang-(1-7) em núcleos cerebrais envolvidos na regulação cardiovascular e autonômica (Doobay e cols., 2007).

1.2.1 - Receptor Mas:

O protooncogene *Mas* foi detectado originalmente no DNA de linhagem de células de carcinoma epidermóide humano usando ensaios de co-transfecção e tumorigenicidade (Young e cols., 1986). O *Mas* codifica uma proteína da classe das proteínas G e, discute-se seu envolvimento nas ações da Ang II. Essa proteína possui sete domínios transmembrana hidrofóbicos, sendo que o N- e C-terminal são hidrofílicos, e pertence portanto, à classe de receptores celulares de superfície acoplados à proteína G (Jackson e cols., 1988; Ambroz e cols., 1991; Von Bohlen und Halbach e cols., 2000).

Por hibridização *in situ* Rabin e cols. (1987) mapearam o gene *Mas* humano na metade distal do cromossomo 6q (6q24-q27), dentro de uma região freqüentemente reorganizada em células malignas. Esta localização foi confirmada por estudos de *Southern blot* e hibridização *in situ* fluorescente (Al-Ubaidi e cols., 1992; Riesewijk e cols., 1996). Em camundongos, o gene *Mas* foi localizado no cromossomo 17 e em ratos no cromossomo 1 (Cebra-Thomas e cols., 1992, Al-Ubaidi e cols., 1992).

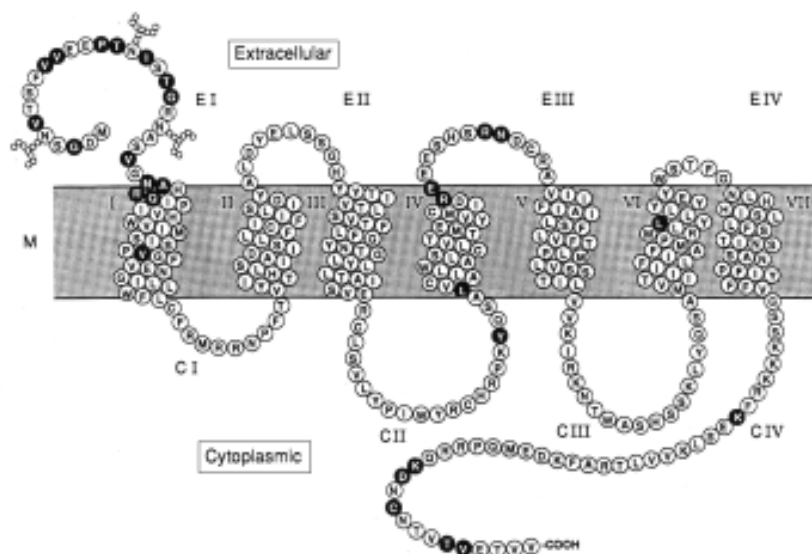


Figura IV – Seqüência de aminoácidos do gene *Mas* de rato e sua possível posição na membrana celular.

A localização celular e a distribuição do RNAm do protooncogene *Mas* no cérebro de ratos machos através da hibridização *in situ*, demonstra forte expressão no giro denteado, área CA3 e CA4 do hipocampo, amígdala, tubérculo olfatório (parte medial), córtex piriforme e bulbo olfatório, e fraca expressão por todo o neocórtex e especialmente, o lobo frontal (Bunnemann e cols., 1990; Martin e cols., 1992). Análise de *Northern blot* de células endoteliais em cultura derivadas dos vasos de resistência do cérebro de ratos, demonstrou a presença do RNAm do *Mas* (Kumar e cols., 1996), não sendo, observado em cultura de células endoteliais de outros leitos vasculares, como aorta e vasos de resistência do mesentério de ratos. Metzger e cols. (1995) demonstraram além de altos níveis de transcrição da expressão do *Mas* no cérebro, expressão nos testículos, e níveis baixos de expressão, mas detectáveis, nos rins e coração de ratos (Villar e Pedersen, 1994; Metzger e cols., 1995). De maneira similar, utilizando a técnica de RPA detectou-se transcrição do *Mas* nos testículos, cérebro, coração, rins e bulbo (Metzger e cols., 1995). Villar e Pedersen, 1994, também demonstraram com retrotranscrição seguida de reação na cadeia da polimerase (RT-PCR) a expressão do *Mas* em órgãos periféricos de camundongos, como fígado, músculo esquelético, língua, pulmões, baço e também em embriões de camundongos.

O primeiro estudo que demonstra função da proteína *Mas* foi realizado por Jackson e cols. em 1988. O gene *Mas* foi expresso em oócitos *Xenopus*, e estavelmente expresso em linhagem de células transfectadas de mamíferos. Em condições de *voltage-clamp*, os oócitos com injeção do RNA *Mas* exibiam uma corrente de entrada por indução, de forma dose-dependente, em resposta a angiotensinas (Ang I, II e III), enquanto que em células transfectadas a estimulação do *Mas* com Ang II e Ang III produzia mobilização intracelular

de Ca^{2+} e também iniciava a síntese de DNA. Desta forma, a proteína Mas foi descrita como um receptor funcional para angiotensinas. Vários outros estudos confirmaram esta sugestão (Jackson e Hanley, 1989; McGillis e cols., 1989; Poyner e cols., 1990; Andrawis e cols., 1991).

Contudo, a ativação de correntes de entrada pelas angiotensinas em oócitos com injeção do RNA *Mas* não foi inibida por antagonistas de Ang II. Assim, dúvidas surgiram sobre se o produto do gene *Mas* poderia ser realmente um receptor para Ang II, já que além disso, os mais importantes receptores de Ang II AT_1 e AT_2 apresentavam somente 8% e 19% de homologia, respectivamente, com a proteína Mas (Sasaki e cols., 1991; Mukoyama e cols., 1993). Por outro lado, Ambroz e cols. (1991) demonstraram que o Ca^{2+} intracelular aumentava em células transfectadas com *Mas* após tratamento com Ang II apenas em células que expressavam receptor AT_1 da Ang II endogenamente. Dessa forma, sugeriu-se que o Mas por si só não seria um receptor para Ang II, mas um modulador de receptor acoplado à proteína G envolvido na sinalização do receptor AT_1 . A demonstração definitiva de que o Mas é na realidade o receptor para a Ang-(1-7) veio com o trabalho pioneiro de Santos e cols. (2003), demonstrando que a deleção genética do receptor Mas abole a ligação da Ang-(1-7) em rim de camundongo e abole a ação antidiurética promovida pela Ang-(1-7) após sobrecarga hídrica em camundongos. Ainda, este estudo demonstrou que a resposta vasodilatadora promovida pela Ang-(1-7) é abolida em anéis de aorta de camundongos KO-Mas. Estes achados identificaram o receptor Mas, como um receptor funcional para a Ang-(1-7), fornecendo bases moleculares e fisiológicas claras para as ações deste heptapeptídeo biologicamente ativo (Santos e cols., 2003).

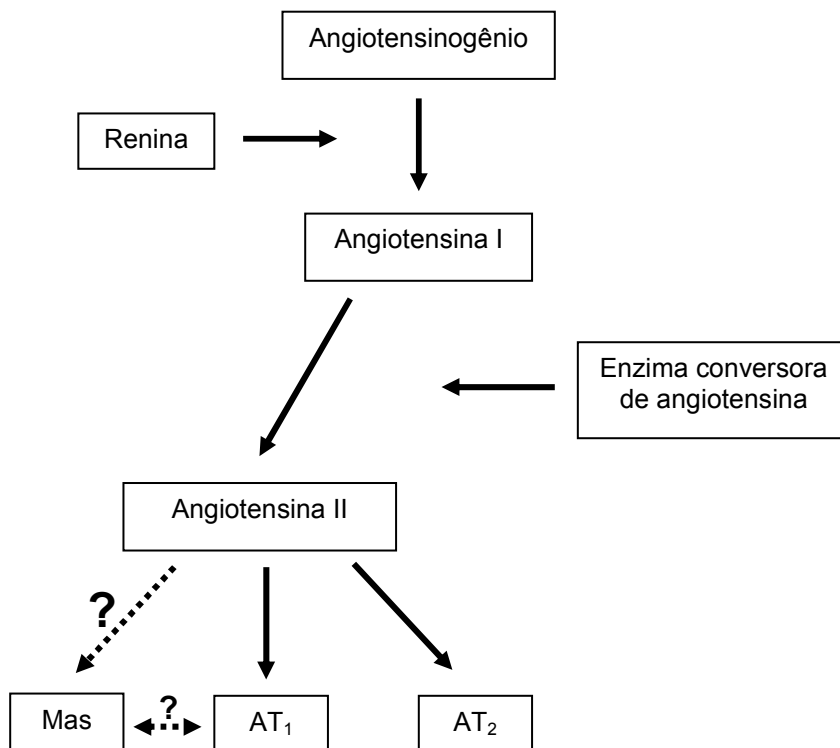


Figura V – Apresentação esquemática do sistema renina-angiotensina e da possível interação da proteína Mas com os componentes deste sistema.

1.3 - Sistema Renina-Angiotensina e Sistema Nervoso Central:

A inter-relação entre o SRA hormonal e o SNC foi demonstrada pela primeira vez por estudos de Bickerton e Buckley, em 1961. Estudos posteriores demonstraram que a Ang II interage com o sistema nervoso autônomo em vários níveis, principalmente nos terminais nervosos pós-ganglionares, gânglios simpáticos e dentro do SNC. A relação entre o SRA e o SNC recebeu novo ímpeto com os estudos do grupo do Professor Ganten, do Max-Delbrück Center (MDC) em Berlim, que relataram que a Ang II pode ser

produzida dentro do próprio cérebro e pode ter uma importante função no desenvolvimento da hipertensão (Bader e cols., 2001).

A confirmação da existência dos componentes do SRA no cérebro se deu com o avanço dos métodos moleculares para detecção do RNAm. Altos níveis de angiotensinogênio e seu RNAm foram encontrados no hipotálamo e tronco cerebral, áreas do cérebro importantes para a regulação cardiovascular central. Os astrócitos representam o principal tipo de célula sintetizadora de angiotensinogênio. A renina e a ECA também já foram detectadas no cérebro (Bader e cols., 2001).

A detecção de imunorreatividade para Ang II no cérebro após nefrectomia foi uma importante evidência de que o SRA cerebral é regulado independentemente do SRA periférico. A Ang II é distribuída no cérebro com alta densidade no hipotálamo, sistema límbico, tronco cerebral e medula espinhal. Outros peptídeos angiotensinérgicos, além da Ang II, foram também identificados no cérebro, como a Ang III, Ang IV e Ang-(1-7) (Bader e cols., 2001).

A caracterização e a detecção de receptores para Ang II no SNC foi uma importante condição para a determinação da existência do SRA cerebral (Bader e cols., 2001). Receptores angiotensinérgicos estão localizados no cérebro, particularmente em regiões que exercem importante função na regulação da PA e da homeostase dos fluidos corporais, tais como órgão circumventricular e NTS (Dampney, 1994). Em particular, estudos utilizando auto-radiografia têm demonstrado uma alta densidade de receptores na região ventral do bulbo, região de grande importância na regulação da PA nas espécies estudadas e inclusive em humanos, (Allen e cols., 1998; MacGregor e cols., 1995; Yang e cols., 1997).

A presença do protooncogene *Mas* e do *Mas*-mRNA já havia sido descrita no SNC de ratos (Bunnemann e cols., 1990; Martin e cols., 1992). No entanto, a recente identificação do receptor *Mas* em áreas específicas do SNC de ratos (Becker e cols., 2005) associada às evidências funcionais do papel da Ang-(1-7) na manutenção da atividade simpática (Oliveira e cols., 1996; Potts e cols., 2000), reforçam a possibilidade de uma contribuição definitiva deste heptapeptídeo na regulação das funções cardiovasculares.

Recentemente, Doobay e cols. (2007) demonstraram que há expressão da proteína ECA2 no cérebro de camundongos, predominantemente em áreas envolvidas na regulação central das funções cardiovasculares. Este estudo ainda demonstrou que a expressão da ECA2 está localizada preferencialmente em neurônios. Considerando as bem documentadas ações da Ang II e Ang-(1-7) centrais na modulação das funções cardiovasculares, e que os efeitos benéficos do bloqueio do SRA têm sido atribuídos à inibição das propriedades vasoconstritoras e hipertróficas da Ang II, a ECA2 parece desempenhar um efeito tampão sobre os excessos de Ang II nos núcleos centrais envolvidos com a regulação autonômica das funções cardiovasculares (Doobay e cols., 2007).

Nos últimos anos a compreensão da importância dos peptídeos angiotensinérgicos e seus receptores dentro do SNC na regulação cardiovascular evoluiu bastante. Apesar disso, os vários estudos têm demonstrado que a ação da Ang II no RVLM, CVLM e NTS parece ser dependente do estado do animal estudado e da informação aferente específica (Head e cols., 2002).

1.3.1 - Sistema Renina-Angiotensina e Reflexos Cardiovasculares:

Várias substâncias podem modular a atividade cardiovascular reflexa, entre elas os peptídeos do SRA. O SRA tecidual está envolvido na regulação da estrutura e função cardiovascular e, conseqüentemente no controle a longo prazo da PA, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento e manutenção da alta resistência periférica e hiper-reatividade vascular encontradas em várias formas de hipertensão essencial e experimental (Averill e Diz, 2000; Campagnole-Santos e Haibara, 2001).

Os barorreceptores, além das respostas autonômicas, controlam a liberação de vários hormônios (catecolaminas, angiotensina, vasopressina), que são coadjuvantes na manutenção dos níveis basais de pressão, intensificando e prolongando as respostas cardiovasculares por minutos ou até mesmo horas (controle mais efetivo da PA) (Averill e Diz, 2000).

A ação inibitória da Ang II sobre o barorreflexo tem sido bem descrita em diversos estudos utilizando diferentes modelos de hipertensão arterial em cães, coelhos e ratos, tanto após administração periférica quanto central (Dampney, 1994; Phillips e Sumners 1998; Averill e Diz 2000; Campagnole-Santos e Haibara, 2001). A Ang II estaria envolvida tanto no deslocamento da faixa de funcionamento dos barorreceptores (alteração de *set point*) quanto na redução do ganho do controle barorreflexo (Averill e Diz, 2000). Interessantemente, o efeito da Ang II sobre o barorreflexo independe da elevação da PA causada por esse peptídeo (Averill e Diz, 2000, Campagnole-Santos e Haibara, 2001). Essa observação indica que o efeito atenuador da Ang II sobre o barorreflexo deve ser exercido por ação central, como demonstrado nos estudos com administração intracerebroventricular de captopril em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Phillips e Sumners, 1998; Averill e Diz, 2000).

Como revisado por Averill e Diz (2000), vários estudos têm mostrado que a Ang-(1-7) central pode agir como um importante neuromodulador, especialmente em áreas bulbares relacionadas com o controle tônico e reflexo da PA. A infusão intracerebroventricular (ICV) de Ang-(1-7) não modifica significativamente os níveis basais da pressão arterial média (PAM) e FC, contudo, produz uma significativa facilitação do controle reflexo barorreceptor. Esta observação contrasta com a significativa atenuação do barorreflexo produzida pela infusão ICV de Ang II e Ang III (Campagnole-Santos e cols., 1992; Oliveira e cols., 1996; Britto e cols., 1997; Averill e Diz, 2000; Chaves e cols., 2000). Apesar das várias evidências do papel da Ang-(1-7) na modulação da sensibilidade barorreflexa, estudos caracterizando o papel do receptor Mas nesses efeitos da Ang-(1-7) são ainda necessários.

O papel das fibras aferentes vagais no controle da liberação de renina têm sido estudado desde a década de 60. Os estudos demonstraram que a liberação de renina renal é provavelmente devida ao aumento da atividade simpática renal, sendo aumentada durante vagotomia. Ainda, um estudo da década de 70 demonstrou uma redução de 56% na secreção de renina durante a estimulação do reflexo cardiopulmonar por distensão atrial esquerda. Outro estudo da mesma época demonstrou que a injeção intracoronariana do alcalóide veratridina inibia a liberação de renina durante hemorragia não hipotensiva (10% peso corporal). Estas respostas de alteração na liberação de renina eram todas abolidas pela vagotomia, evidenciando assim que os receptores cardiopulmonares com suas fibras aferentes vagais podem significativamente influenciar a liberação de renina (Thorén, 1979). O aumento reflexo na secreção de renina e a conseqüente ativação do SRA poderiam resultar de uma função dos receptores cardiopulmonares na regulação do volume sanguíneo (Thorén, 1979).

Estudos atuais descrevem evidências de que a Ang II pode atenuar a resposta hipotensora e bradicárdica que constitui o reflexo de Bezold-Jarisch. Por exemplo, hipotensão e bradicardia foram observadas em homens que receberam infusão de inibidores da renina e discute-se a possibilidade de essa resposta ser devida a exacerbação do reflexo de Bezold-Jarisch (Uggere e cols., 2000, Sever e cols., 2001). Apesar das evidências, poucos ainda são os estudos que relacionam o Reflexo de Bezold-Jarisch e o SRA, e, nenhum deles demonstrou ainda uma relação estreita entre os dois.

Atualmente, acredita-se que peptídeos vasoativos também participem da regulação da excitabilidade dos quimiorreceptores carotídeos, alterando a frequência de disparo das fibras aferentes. Estudos têm demonstrado que a Ang II modula a descarga aferente do nervo carotídeo no corpúsculo carotídeo, sendo essa ação claramente distinta dos efeitos vasculares e hemodinâmicas da Ang II (Leung e cols., 2003).

Recentemente, identificou-se uma alta densidade de receptores AT_1 da Ang II no corpúsculo carotídeo, e demonstrou-se que a hipóxia crônica pode aumentar a expressão e função dos receptores AT_1 da Ang II no corpúsculo carotídeo (Allen, 1998; Leung e cols., 2000). Estes estudos fornecem evidências para uma possível função da Ang II na mediação da atividade dos quimiorreceptores carotídeos (Leung e cols., 2003). Além disso, a Ang II via receptor AT_1 , também pode centralmente modular o quimiorreflexo. Estudos de Paton e Kasparov (1999) mostram que a microinjeção de Ang II no NTS potencia o componente cardiovagal deste reflexo.

1.4 – Hipótese:

Até o momento, os estudos sobre o papel do sistema renina-angiotensina sobre o controle neural da PA demonstram que a Ang II diminui a sensibilidade do barorreflexo, e ainda sugerem que esta angiotensina diminui a sensibilidade do reflexo de Bezold-Jarisch e facilita a resposta quimiorreflexa. Sabendo-se que várias ações da Ang-(1-7) são opostas às observadas pela Ang II, principalmente no que se refere aos seus efeitos sobre o controle cardíaco e vascular, bem como sobre a sensibilidade barorreflexa, é razoável supor que o heptapeptídeo Ang-(1-7), agindo em seu receptor Mas, também participe da regulação do reflexo Bezold-Jarisch e do quimiorreflexo. Com a possibilidade de utilizar animais geneticamente modificados quanto à expressão do receptor Mas, avaliamos a hipótese de que a Ang-(1-7), via receptor Mas, contribui para a modulação das respostas cardiovasculares reflexas, em camundongos com deleção do receptor Mas ou com superexpressão deste receptor no cérebro.

Ainda, considerando as evidências de ações contra-regulatórias entre Ang II/Ang-(1-7), e a possibilidade de interação dos receptores Mas/AT₁, também avaliamos em nosso estudo a hipótese de a deleção do receptor Mas alterar os efeitos mediados pela Ang II, em decorrência da ausência dos efeitos contra-regulatórios mediados pela Ang-(1-7), via receptor Mas.

2 - OBJETIVOS:

2.1 - Objetivo Geral:

- ✓ Avaliar as respostas cardiovasculares reflexas em camundongos com alterações na expressão do receptor da Angiotensina-(1-7), Mas.

2.2 - Objetivos específicos:

1. Caracterizar os parâmetros cardiovasculares basais em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) e com superexpressão deste receptor no cérebro (NSE-Mas).
2. Avaliar o efeito simpático e vagal cardíacos em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas).
3. Caracterizar as respostas reflexas à estimulação dos barorreceptores, receptores cardiopulmonares e quimiorreceptores em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas).
4. Investigar a influência dos peptídeos angiotensinérgicos, Ang II e Ang-(1-7), na modulação central e periférica das respostas cardiovasculares, em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) e com superexpressão deste receptor no cérebro (NSE-Mas).

3 - MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 - Animais:

Utilizamos camundongos controle (Wild Type, WT) e com alterações da expressão do receptor da Ang-(1-7), receptor Mas: com deleção do receptor da Ang-(1-7) Mas (KO-Mas) e com superexpressão deste receptor no cérebro (NSE-Mas), de duas linhagens diferentes (C57BL6J e FVBN). Os animais foram utilizados com idade entre 4 e 6 meses, peso entre 25 e 35 g. Os animais foram mantidos no Biotério de animais transgênicos do Laboratório de Hipertensão, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais ou no *Animal House* do Max-Delbrück Center – Berlim – Alemanha.

A partir dos avanços na manipulação genética e nas técnicas de fisiologia e biologia molecular, os camundongos se tornaram o modelo animal de escolha para o estudo das bases genéticas das doenças humanas. Os dois métodos de manipulação genética mais comumente utilizados são: superexpressão e deleção (knockout), que têm sido extremamente úteis no estabelecimento da função de um gene *in vivo*. Em nosso estudo, utilizamos os dois modelos de manipulação genética na intenção de elucidar algumas das funções do receptor da Ang-(1-7), Mas, na modulação das respostas cardiovasculares reflexas.

3.1.1 - Camundongos geneticamente modificados para o gene *Mas*:

3.1.1.1 – Camundongos com deleção do receptor *Mas*:

A interrupção direcionada do protooncogene *Mas* foi realizada através da recombinação homológica em células tronco embrionárias promovendo a deleção da região codificadora do terminal 253 dos aminoácidos do Mas incluindo seis domínios

transmembrana e a perda da expressão do *Mas* no cérebro e nos testículos (Walther, 1998). Os camundongos homozigotos com deleção do *Mas* reproduzidos a partir do cruzamento de camundongos 129 e C57BL6J são saudáveis, crescem normalmente e não apresentam nenhuma anormalidade óbvia no desenvolvimento (Walther e cols., 1998). Apesar da alta expressão de *Mas* nos testículos, os camundongos KO-*Mas* são férteis e geram número igual de filhos machos e fêmeas (Walther, 1998). Ainda, nenhuma alteração evidente foi detectada na morfologia do hipocampo e de suas sub-regiões indicando que o padrão de distribuição citoarquitetônica e os subtipos de neurônios não são afetados pela ablação do *Mas*.

Santos e cols. (2003) demonstraram que em cortes histológicos de rins dos camundongos KO-*Mas* a ligação de Ang II (principalmente aos receptores AT₁) não está alterada. Contudo, a ligação de Ang-(1-7) está ausente, indicando que o *Mas* é um receptor para Ang-(1-7). Experimentos realizados pelo mesmo grupo, demonstraram que a ação antidiurética da Ang-(1-7), classicamente conhecida em ratos com sobrecarga hídrica, está abolida em camundongos KO-*Mas*. Ainda, demonstrou-se que a ação vasodilatadora da Ang-(1-7) em anéis de aorta isolados de camundongos WT, é completamente abolida nos camundongos KO-*Mas*.

A distribuição de células com expressão de AT₁ em diferentes estruturas cerebrais em camundongos KO-*Mas* e WT foi analisada por imunohistoquímica (von Bohlen und Halbach e cols., 2000). Nenhuma alteração significativa foi encontrada entre as duas linhagens de animais. Em contraste, diferenças significativas foram observadas em experimentos de eletrofisiologia. Neurônios da amígdala que apresentam expressão do receptor *Mas* foram avaliados e observou-se que enquanto em camundongos WT a administração de Ang II induz aumento dos potenciais de campo, a Ang II reduz o número de potenciais nos neurônios da amígdala de camundongos KO-*Mas* (Alenina, 2003).

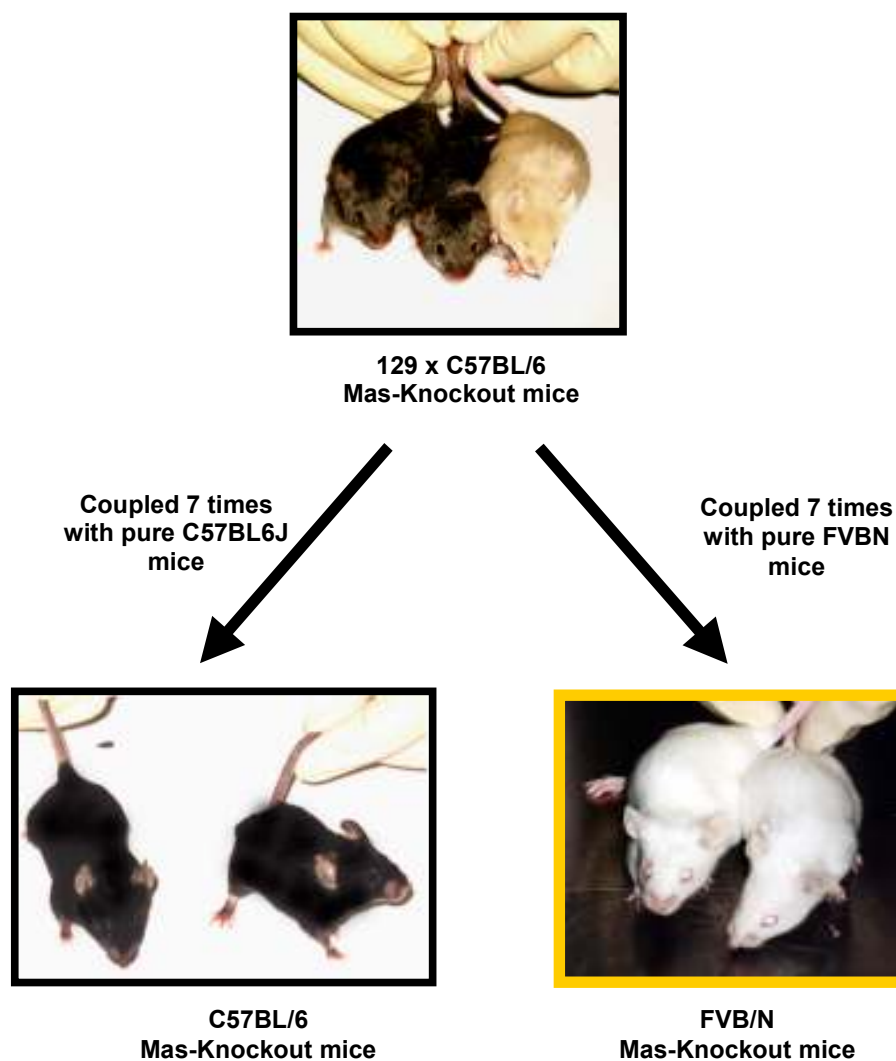


Figura VI – Estratégia de reprodução para camundongos KO-Mas e para camundongos com background genético puro (Alenina, 2003).

3.1.1.2 - Camundongos com superexpressão no cérebro do receptor Mas:

Para tentar esclarecer a função do receptor Mas, vários modelos de camundongos transgênicos com superexpressão do protooncogene Mas foram produzidos. Os camundongos transgênicos foram gerados pela microinjeção do DNA

construct dentro do pró-núcleo de oócito de camundonga fertilizada. A inserção do transgene dentro do genoma e a existência dos transgenes foi analisada utilizando PCR e *Southern blot*. A expressão do transgene foi analisada por *RNAse Protection Assay*.

A construção do camundongo transgênico com superexpressão do receptor Mas no cérebro foi realizada com a utilização do promotor NSE (*neuron-specific enolase gene*). Para distinguir entre o Mas endógeno e o Mas transgênico, e considerando que a proteína Mas do camundongo e a proteína Mas do rato são idênticas em 97% (Metzger e cols.,1995), o cDNA Mas de rato foi utilizado para clonagem. Os fragmentos NSE-Mas contidos no promotor, Mas cDNA, e a seqüência SV40 foram cortados dos plasmídios, purificados em gel de agarose, dissolvidos a concentração de 3 ng/μl, e usados para as microinjeções (Alenina, 2003).

Os camundongos transgênicos com o receptor Mas sob controle do promotor neuron-specific enolase (NSE) demonstraram alta expressão do transgene no cérebro e baixa quantidade de RNAm em outros órgãos como rins, coração, pulmão e baço (Alenina, 2003).

3.2 - Anestesia:

Nos protocolos em que utilizamos animais anestesiados, todos os procedimentos cirúrgicos e experimentais foram realizados sob efeito do anestésico Uretana (Sigma), administrado por via intraperitoneal na dose de 1.2 g/Kg.

Nos experimentos em que utilizamos os animais conscientes para registro, os procedimentos cirúrgicos foram realizados 24 horas antes sob a mistura anestésica Ketamina (4.5 mg/Kg)+ Xilazina (0.2 mg/Kg).

3.3 – Procedimentos cirúrgicos:

3.3.1 - Canulação de vasos sanguíneos:

3.3.1.1 – Experimentos em animais anestesiados:

Nos animais utilizados para protocolos experimentais sob anestesia geral, a artéria femoral esquerda e a veia jugular direita foram canuladas. Para canulação da artéria femoral utilizamos cânula confeccionada a partir da conexão de 3 a 4 cm de polietileno PE50 à 1 cm de ponta de ponteira de 5 µl (Eppendorf 5242 956.003 – Zeiss 471877), preenchida com solução fisiológica (NaCl 0.9%) contendo heparina (5.000 U.I.). Após posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica, foi realizada tricotomia da região inguinal esquerda do animal. Uma pequena incisão na pele foi realizada utilizando-se tesoura pequena. Com o auxílio de lupa, o feixe vâsculo-nervoso femoral foi localizado e a artéria femoral foi cuidadosamente isolada. A cânula foi introduzida na aorta abdominal através da artéria femoral, sendo utilizada para obtenção do registro dos parâmetros cardiovasculares.

Para canulação da veia jugular foram utilizados dois tipos diferentes de cânulas. Uma delas, utilizada para administração de drogas em bôlus, foi confeccionada com polietileno PE10, medindo de 5 a 6 cm, preenchida com solução salina (NaCl 0,9%). O tamanho desta cânula foi determinado como sendo o tamanho necessário para armazenar um volume de 5 µl, volume esse utilizado em cada injeção em bôlus.

A canulação da veia jugular direita iniciou-se com tricotomia da região anterior direita do pescoço do animal, posicionado como descrito acima. Também com auxílio de lupa, a veia jugular foi cuidadosamente isolada e canulada.

Uma segunda cânula foi inserida na mesma veia jugular, imediatamente após a introdução da primeira, nos protocolos experimentais em que foram realizadas infusões

intravenosas de drogas. Esta cânula foi confeccionada a partir da conexão de 3 a 4 cm de polietileno PE50 à 1 cm de polietileno PE10, preenchida com solução salina (NaCl 0,9%). Para conexão dos tubos de polietileno de todas as cânulas utilizamos ferro de solda e fio guia.

3.3.1.2 – Experimentos em animais não anestesiados:

Nos protocolos nos quais os experimentos foram realizados com animais conscientes, os procedimentos cirúrgicos foram realizados 24 horas antes do experimento. Para os protocolos de avaliação dos reflexos cardiovasculares e do tônus autonômico os animais foram submetidos à canulação da artéria e veia femorais esquerdas. Para os protocolos de avaliação dessas mesmas variáveis durante a infusão intravenosa de drogas, além da canulação da artéria e veia femorais, os animais também foram submetidos à canulação da veia jugular direita.

Para canulação da artéria femoral utilizamos cânula confeccionada a partir da conexão de 8 a 10 cm de polietileno PE50 à 3 - 4 cm de ponta de ponteira de 5 µl (Eppendorf 5242 956.003 – Zeiss 471877), preenchida com solução fisiológica (NaCl 0,9%) contendo heparina (5.000 U.I.). Após a conexão dos polietilenos, a cânula foi angulada a aproximadamente 90° para facilitar a manipulação e fixação. A veia femoral foi canulada com cânula confeccionada a partir da conexão de 3 a 4 cm de polietileno PE50 à 6 a 7 cm de polietileno PE10 e este à 2 cm de MRE 010 (Micro-Renathane Tubing 0.010 x 0.005) preenchidas com solução salina (NaCl 0,9%). As conexões foram todas realizadas utilizando aquecimento com ferro de solda e fio guia.

Após o posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica, foi realizada tricotomia da região inguinal esquerda do animal. Uma pequena incisão na pele foi realizada utilizando tesoura pequena. Com o auxílio de lupa, o feixe vâsculo-nervoso femoral foi localizado e a artéria e veia femorais foram cuidadosamente

isoladas. A cânula arterial foi introduzida delicadamente na aorta abdominal através da artéria femoral, sendo utilizada para obtenção do registro dos parâmetros cardiovasculares. A cânula venosa foi introduzida através da veia femoral até a veia cava inferior, utilizada para injeção de drogas.

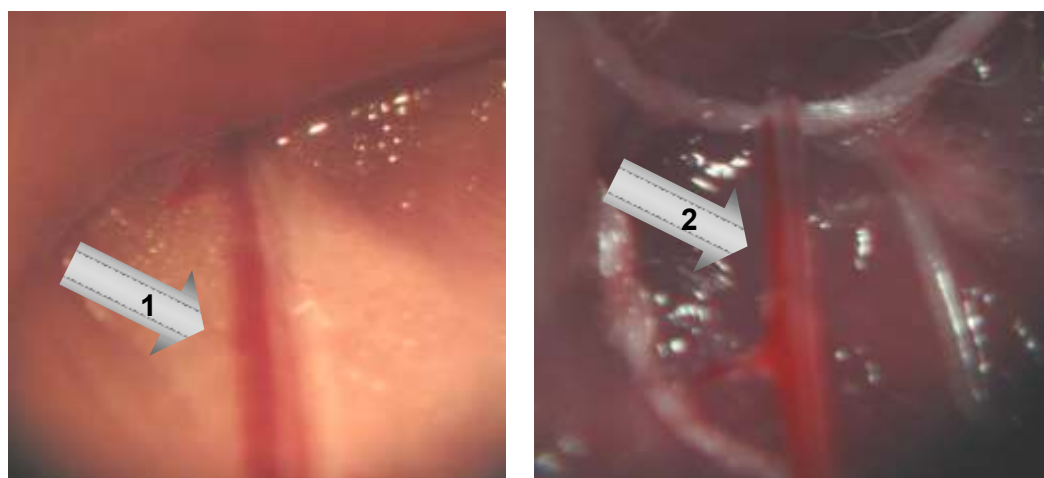


Figura VII – Foto ilustrativa do feixe vículo-nervoso femoral (seta 1) em um camundongo. A seta 2 ilustra uma veia e uma artéria femorais isoladas imediatamente antes da canulação. Estas imagens foram obtidas através de lupa cirúrgica (aumento 40 X).

Para canulação da veia jugular direita utilizamos cânula confeccionada a partir da conexão de 3 cm de polietileno PE50 à 1 cm de polietileno PE10. Após a conexão (com ferro de solda e fio guia), foi realizada angulação do PE50 à aproximadamente 90°. A canulação da veia jugular foi utilizada para infusões intravenosas de drogas. Todas as cânulas, antes de introduzidas foram preenchidas com solução salina (NaCl 0,9%) contendo heparina (5.000 U.I.)

A canulação da veia jugular direita iniciou-se com tricotomia da região anterior direita do pescoço do animal, posicionado como descrito acima. Também com auxílio de lupa, a veia jugular foi cuidadosamente isolada e canulada.

Após todas as canulações, os cateteres foram muito bem fixados e exteriorizados subcutaneamente, em direção ao dorso do animal na região cervical. As incisões foram então suturadas cuidadosamente e os animais colocados em caixas individuais, com livre acesso à água e ração por pelo menos 24 horas.

3.3.2 - Canulação do Ventrículo Lateral:

A cirurgia estereotáxica para canulação do ventrículo lateral foi realizada 7 dias antes do protocolo experimental. Para isso o animal foi anestesiado com a mistura Ketamina (4.5 mg/Kg) + Xilazina (0.2 mg/Kg) e posicionado em decúbito ventral, em um aparelho estereotáxico para pequenos animais (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) com a cabeça em posição horizontal (0 mm da linha interaural). Após tricotomia de cabeça, o osso parietal foi exposto na região do bregma através de uma pequena incisão na pele. Uma pequena abertura no osso parietal foi realizada, de acordo com as seguintes coordenadas: 0,5 mm posterior ao bregma, 1,1 mm lateral à linha mediana (Paxinos e Franklin, 2001). Uma cânula guia (agulha hipodérmica 25 x 6 mm, tamanho: 9 mm) fixada ao suporte do estereotáxico foi introduzida na abertura do osso parietal 1,0 mm abaixo da superfície do osso (Paxinos e Franklin, 2001). Essa cânula guia foi fixada ao crânio do animal utilizando resina acrílica odontológica autopolimerizável com auxílio de pequenos parafusos de aço inoxidável previamente fixados ao crânio do animal. Após fixação, mandril de aço inoxidável foi introduzido na cânula para evitar a obstrução da mesma. Em seguida, os animais foram colocados em caixas coletivas, com água e ração à vontade, por um período de 7 dias, a fim de se recuperarem da cirurgia.

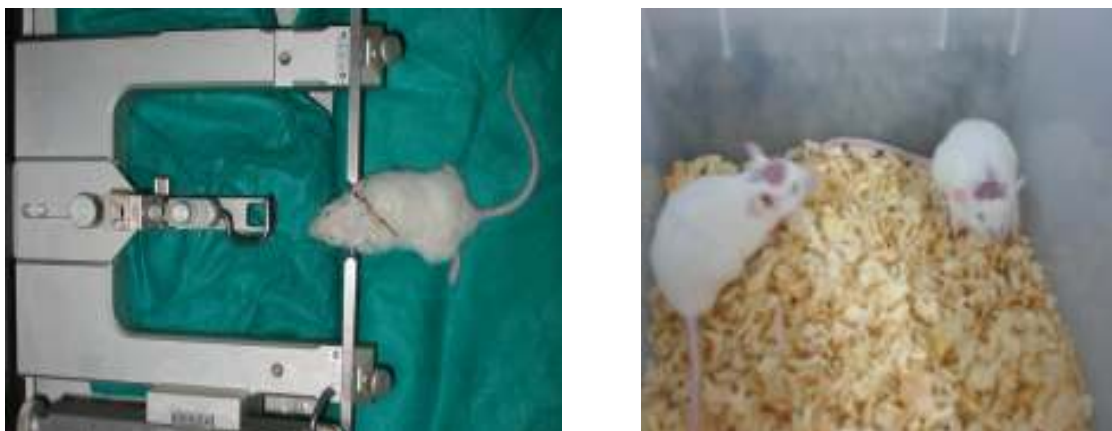


Figura VIII – A) Foto ilustrativa de um camundongo posicionado no aparelho estereotáxico imediatamente antes da canulação do ventrículo lateral. **B)** Foto ilustrativa de dois camundongos com cânulas já posicionadas no ventrículo lateral, em fase de recuperação.

3.4 - Mensuração da temperatura retal:

Nos experimentos utilizando camundongos anestesiados, a mensuração contínua da temperatura corporal é fundamental (Rao e Verkman, 2000; Peotta e cols., 2001). Para isso utilizamos colchão aquecido ou lâmpada incandescente durante todos os protocolos experimentais para manutenção da temperatura interna do animal em níveis adequados. A mensuração da temperatura foi realizada através de um multímetro digital (Minipa – ET 2042) conectado ao reto do animal. A temperatura foi mantida entre 36 e 38° C durante todo o protocolo experimental.

3.5 - Injeções intravenosas:

As injeções intravenosas foram realizadas em bôlus com seringa Hamilton de 50 µl (diâmetro: 1.03 mm, série #705, Reno, Nevada, USA), fixadas a um suporte especial, projetado pelo Prof. Dr. Pedro Guertzenstein (desenvolvido nas oficinas da UFMG), que permite a infusão precisa dos volumes desejados. A seringa foi conectada à cânula inserida na veia jugular (para animais anestesiados) e foram realizadas injeções no volume de 5 µl. Nos experimentos com animais não anestesiados, uma seringa Hamilton de 50 µl foi utilizada para preenchimento do polietileno com a droga e as injeções em bôlus foram realizadas com auxílio de uma seringa de 1 ml, injetando aproximadamente 30 µl por vez, na veia femoral.

Para infusão de drogas durante todo o protocolo experimental, tanto em animais anestesiados quanto em animais acordados, utilizamos seringas de 1 ml, posicionadas em bomba de infusão. As diferentes drogas ou solução salina foram administradas no volume de 5 µl por minuto ou 300 µl por hora, através de bomba de infusão (Pump 11 – Harvard Apparatus – Holliston, MA – 01746 – serial nº B02877).

3.6 - Microinjeções intracerebroventriculares (ICV):

No dia do experimento, após a retirada do mandril, uma cânula injetora (10,4 mm), confeccionada a partir de um tubo de aço inoxidável (33G, Hypo Tube – Small Parts) foi conectada a um tubo de silicone (diâmetro semelhante ao PE10) e introduzida no ventrículo lateral. A cânula injetora foi preenchida previamente com solução salina (NaCl 0,9%) estéril ou com a droga utilizada no protocolo experimental e o tubo de silicone conectado à seringa Hamilton de 10 µl (diâmetro: 0.46 mm; série 701 - Reno, Nevada, USA) posicionada em uma bomba de infusão (Pump 11 – Harvard Apparatus – Holliston, MA – 01746 – serial nº B02877). O volume utilizado para infusão ICV foi de 2µl por hora.

Ao final de cada experimento, foi microinjetado 0,5µl do corante Alcian Blue (5% em tampão acetato, 0,1M, pH 3,0) para permitir a identificação dos sítios de cada microinjeção para posterior verificação histológica.

3.7 - Drogas:

As drogas utilizadas foram dissolvidas em solução salina (NaCl 0,9%) nas concentrações devidas e aliqüotadas (10 µl), em tubos eppendorf mantidos à -20° C (solução estoque). No dia do experimento, as soluções foram preparadas a partir da solução estoque pela adição de solução salina (NaCl 0,9%). Cada alíquota foi utilizada uma única vez.

3.8 - Registro das variáveis cardiovasculares:

A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada por um sinal enviado a um transdutor conectado à cânula inserida na aorta abdominal pela artéria femoral, através do sistema de aquisição de dados (Biopac System, modelo MP100, serial 96122386 ou Power Lab System 4/20 – ADInstruments). As oscilações de pressão captadas foram amplificadas e convertidas através de placa de conversão analógico/digital em sinais que alimentam a placa de aquisição de dados. Através do software de leitura da placa, Acqknowledge v.3.5.7 (Biopac System) ou Chart 4 for Windows (Power Lab System), a pressão arterial pulsátil foi coletada continuamente com uma frequência de amostragem de 2000-4000 Hz. Os valores de PAM e FC foram calculados a partir de pulsos de pressão arterial e registrados pelo sistema. Estas três variáveis foram apresentadas simultaneamente em canais diferentes no monitor e armazenadas em disco rígido.

3.9 - Teste de sensibilidade do controle barorreflexo da FC:

Em 1969 Smyth e cols. descreveram o método mais antigo e que ainda hoje é o mais utilizado para estimulação do barorreflexo. Este método consiste na injeção intravenosa de doses crescentes de substâncias vasoconstritoras (fenilefrina, agonista α -adrenérgico) e substância vasodilatadora (nitroprussiato de sódio, doador de óxido nítrico), o que produz aumento ou da PA respectivamente, que por sua vez aumenta ou diminui a atividade dos barorreceptores arteriais, e reflexamente induz alterações da FC (bradicardia barorreflexa ou taquicardia barorreflexa).

Doses crescentes de fenilefrina (FE) (0.25 μ g e 0.5 μ g) e de nitroprussiato de sódio (NPS) (0.25 μ g e 0.5 μ g) foram injetadas em bôlus por via intravenosa. Através deste procedimento, procuramos obter respostas pressoras de até 40 mmHg. As doses foram injetadas respeitando-se um volume fixo de 5 μ l para animais anestesiados (via veia jugular) e 30 μ l para animais conscientes (via veia femoral). Um intervalo mínimo de 2 minutos entre as injeções foi respeitado para retorno da PAM e FC aos valores basais.

A sensibilidade do barorreflexo foi avaliada relacionando-se as alterações reflexas de FC induzidas por alterações transitórias da PAM. As alterações máximas de FC foram convertidas em intervalo de pulso (IP) através da fórmula: IP (em milissegundos, ms) = 60.000/FC. A sensibilidade do barorreflexo foi estimada pela média aritmética das razões entre as alterações de IP (ms) e alterações da PAM (mmHg) para cada dose de FE e NPS utilizadas (Δ IP/ Δ PAM, ms/mmHg), denominado índice de sensibilidade barorreflexa (Campagnole-Santos e cols., 1988).

Em alguns protocolos, a bradicardia barorreflexa foi avaliada considerando-se a variação da FC pela variação do tempo, ou seja, Δ FC/ Δ t (bpm, seg). Para isso a resposta bradicárdica foi dividida em dois componentes: um componente rápido (1º componente) e um componente lento (2º componente), conforme demonstrado na figura abaixo:

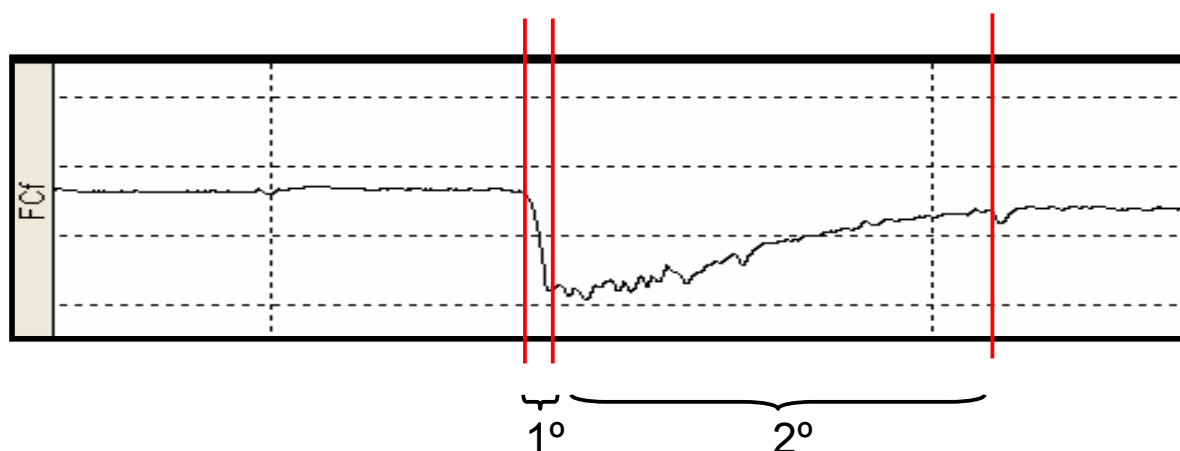


Figura IX – Traçado de registro representativo da FC, ilustrando a resposta bradicárdica barorreflexa induzida pela administração i.v. de fenilefrina, em um camundongo. As barras vermelhas indicam a separação desta resposta entre os componentes (1º componente e 2º componente), conforme descrito por Coleman e cols., 1980.

Foi realizada então a análise da inclinação (slope) dos dois componentes separadamente. De acordo com estudos de Coleman e cols., (1980), o 1º componente, denominado de componente rápido da bradicardia barorreflexa, parece estar mais relacionado à modulação da resposta barorreflexa pelo sistema nervoso autônomo parassimpático (ativação vagal), enquanto que o 2º componente, denominado componente lento da bradicardia barorreflexa, parece estar mais relacionado à modulação pelo sistema nervoso autônomo simpático, ou seja, representaria a simpatoinibição.

3.10 - Teste de avaliação do reflexo Bezold-Jarisch:

O reflexo Bezold-Jarisch foi avaliado através da injeção de fenilbiguanida, um agonista serotoninérgico seletivo para os receptores 5-HT₃. Trabalhos na literatura (Coleridge e Coleridge, 1984; Vasquez e cols., 1995; Paton, 1998; Paton e Butcher, 1998; Aviado e Aviado, 2001) mostram que a estimulação dos receptores 5-HT₃ ativa seletivamente o reflexo de Bezold-Jarisch. Doses crescentes de fenilbiguanida (FB) (0.5 µg e 1.0 µg) foram injetadas em bôlus por via intravenosa. As alterações máximas de PAM e FC foram avaliadas e os deltas calculados. As doses foram injetadas respeitando-se um volume fixo de 5 µl para animais anestesiados (via veia jugular) e 30 µl para animais conscientes (via veia femoral). Um intervalo mínimo de 2 minutos entre as injeções foi respeitado para retorno da PAM e FC aos valores basais.

3.11 - Teste de avaliação do Quimiorreflexo:

O cianeto de potássio (KCN) é descrito na literatura como um potente estímulo para os quimiorreceptores periféricos (Biscoe e Duchon, 1990; Franchini e Krieger, 1993) por inibir a enzima citocromo-oxidase. Como consequência, ocorre déficit energético celular associado à indisponibilidade de oxigênio, promovendo hipóxia citotóxica, o que leva a estimulação das células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo.

Doses crescentes de KCN (10 µg e 20 µg, para animais anestesiados; 2.5 µg e 5 µg, para animais conscientes) foram injetadas em bôlus por via intravenosa. As alterações máximas de PAM e FC foram avaliadas e os deltas calculados. As doses foram injetadas respeitando-se um volume fixo de 5 µl para animais anestesiados (via veia jugular) e 30 µl para animais conscientes (via veia femoral). Um intervalo mínimo de 2 minutos entre as injeções foi respeitado para retorno da PAM e FC aos valores basais.

3.12 - Avaliação do tônus autonômico:

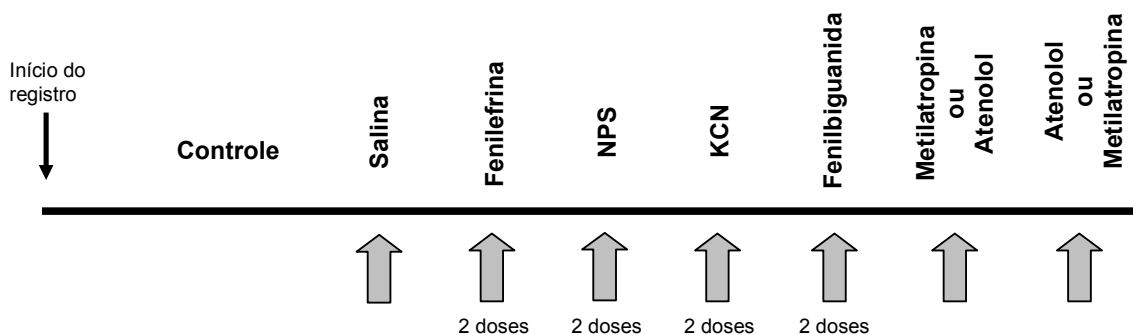
O tônus vagal e simpático foram avaliados pela determinação das alterações na FC induzidas pela injeção intravenosa (i.v.) de metilatropina (1 mg/kg) ou atenolol (1 mg/kg), respectivamente. A FC basal foi considerada como o valor de FC imediatamente antes da realização de qualquer dos bloqueios (parassimpático ou simpático). O efeito vagal foi avaliado como a diferença entre a FC máxima após injeção de metilatropina e a FC basal ou controle. A avaliação do efeito simpático foi realizada através da diferença entre a FC basal e a FC mínima após injeção de atenolol. O tônus vagal foi calculado como a diferença entre a FC intrínseca e a FC mínima, enquanto o tônus simpático foi calculado como a diferença entre a FC máxima e a FC intrínseca. A FC intrínseca foi avaliada após o duplo bloqueio com metilatropina e atenolol. (Negrão e cols., 1992; Angelis e cols., 2004).

3.13 - Protocolos Experimentais:

1) Avaliação dos parâmetros cardiovasculares basais, do tônus autonômico e reflexos cardiovasculares em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) anestesiados:

Inicialmente avaliamos os parâmetros cardiovasculares basais de PAM, FC e tônus autonômico simpático e parassimpático, além de FC intrínseca em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) e controles (C57BL6J-WT) anestesiados. Para isso, após procedimentos cirúrgicos para canulação da artéria e veia femoral, a cânula arterial foi conectada ao transdutor de pressão, sendo iniciado o registro. Após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares, a PAM e FC basais foram avaliadas por um período de pelo menos 20 minutos. Realizamos injeções i.v. de doses

crescentes de FE (0.25 μ g, 0.5 μ g) e NPS (0.25 μ g, 0.5 μ g), para avaliação do barorreflexo; fenilbiguanida (FB) (0.5 μ g, 1.0 μ g) para avaliação do reflexo de Bezold-Jarisch; e KCN (10 μ g, 20 μ g), para avaliação da resposta à estimulação quimiorreflexa. O tônus autonômico foi avaliado pela injeção i.v. de metilatropina (1 mg/kg) e atenolol (1 mg/kg), ou vice-versa. Todas as injeções foram realizadas em volume fixo de 5 μ l e o tempo entre as injeções foi de aproximadamente 3-4 minutos, tempo este, suficiente para o retorno completo das variáveis cardiovasculares aos valores basais.

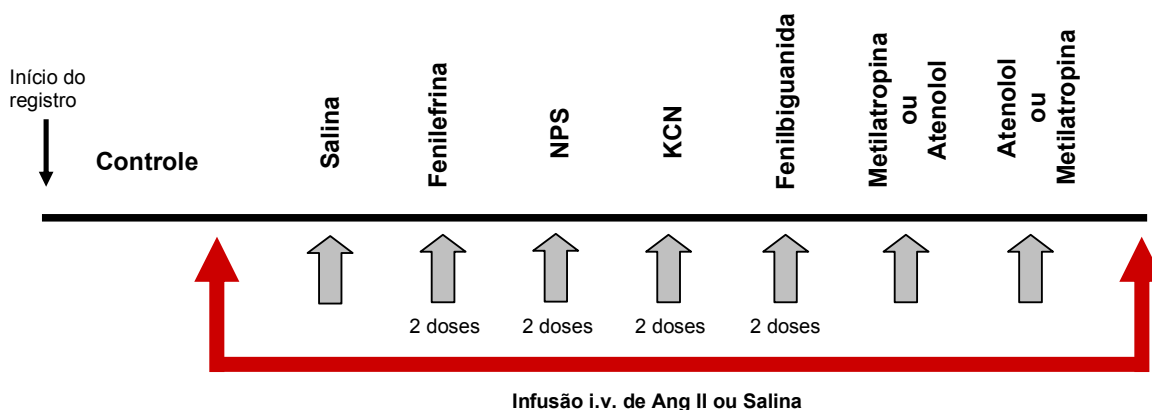


2) *Avaliação do efeito da infusão i.v. de Ang II sobre as respostas cardiovasculares à estimulação do barorreflexo, reflexo Bezold-Jarisch e quimiorreflexo, além do tônus simpático e vagal em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) anestesiados:*

Considerando as evidências da literatura sobre as ações contra-regulatórias da Ang II/Ang-(1-7), avaliamos os efeitos da infusão i.v. de Ang II (6 μ g/300 μ l/hora) em animais com deleção do receptor Mas.

Neste protocolo posicionamos duas cânulas na veia jugular direita: uma para infusão contínua de Ang II ou salina e outra para estimulação dos reflexos cardiovasculares e avaliação do tônus autonômico.

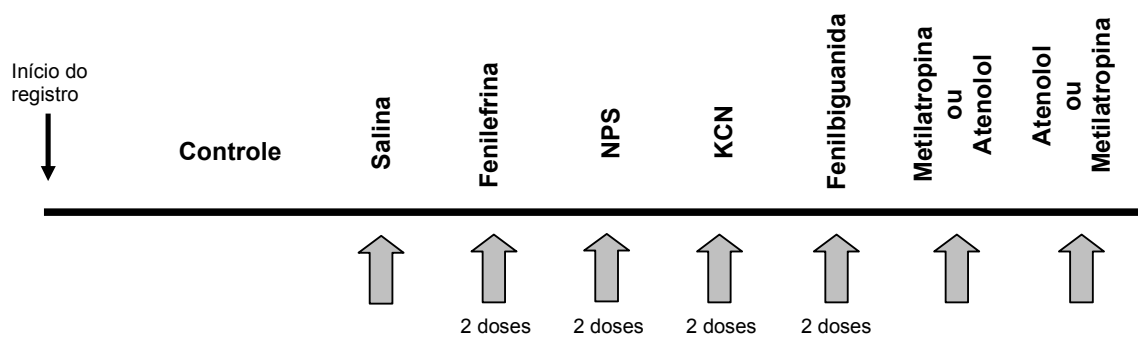
Realizamos injeções em bôlus de duas doses, previamente definidas como as que promoveram a resposta mais adequada, de cada uma das drogas citadas no protocolo anterior. O tônus autonômico foi avaliado pela injeção i.v. de metilatropina (1 mg/kg) e atenolol (1 mg/kg), ou vice-versa. Realizamos injeções i.v. de doses crescentes de FE (0.25 µg, 0.5 µg) e NPS (0.25 µg, 0.5 µg), para avaliação do barorreflexo; FB (0.5 µg, 1.0 µg) para avaliação do reflexo de Bezold-Jarisch; e KCN (10 µg, 20 µg), para avaliação da resposta à estimulação quimiorreflexa. Todas as injeções foram realizadas em volume fixo de 5 µl e o tempo entre as injeções foi de aproximadamente 3-4 minutos, tempo este, suficiente para o retorno completo das variáveis cardiovasculares aos valores basais.



3) Avaliação dos parâmetros cardiovasculares basais, do tônus autonômico e reflexos cardiovasculares em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) não anestesiados:

Considerando que a anestesia pode influenciar as respostas dos reflexos cardiovasculares (Zimpfer e cols., 1991; Franchini e Krieger, 1993) e o balanço do tônus autonômico, neste protocolo utilizamos não anestesiados, evitando portanto uma possível interferência dos anestésicos sobre o processamento das respostas cardiovasculares.

Inicialmente, avaliamos os parâmetros cardiovasculares basais de PAM e FC, tônus autonômico simpático e parassimpático e FC intrínseca nos camundongos não anestesiados. Após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares, a PAM e FC basais foram avaliadas por um período de pelo menos 30 minutos. Após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares, o barorreflexo, o reflexo de Bezold-Jarisch e o quimiorreflexo foram avaliados por injeções i.v. de doses crescentes de FE (0.25 µg, 0.5 µg) e NPS (0.25 µg, 0.5 µg), FB (0.5 µg, 1.0 µg) e KCN (2.5 µg, 5 µg). O tônus autonômico parassimpático e simpático foi avaliado pela injeção i.v. de metilatropina (1 mg/kg) e atenolol (1 mg/kg), respectivamente. Todas as injeções foram realizadas em volume aproximado de 30 µl e o tempo entre as injeções foi de aproximadamente 3-4 minutos, tempo este, suficiente para o retorno completo das variáveis cardiovasculares aos valores basais.

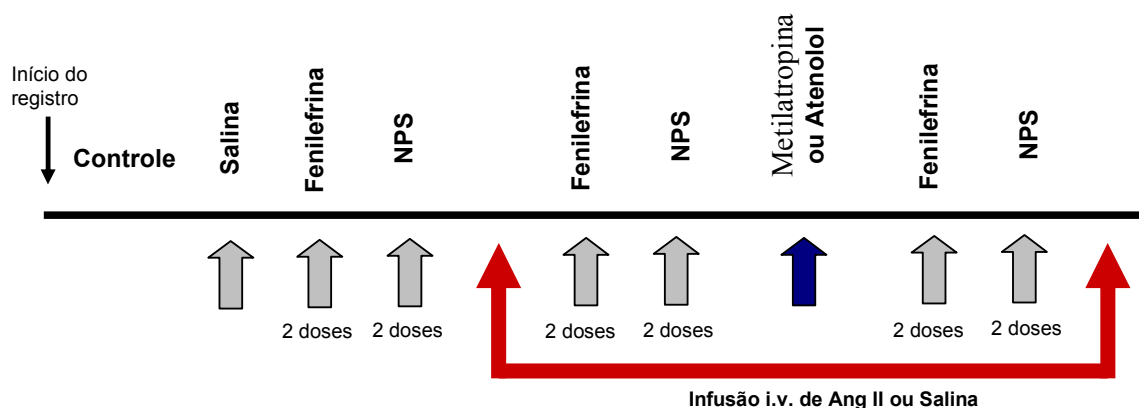


4) Avaliação do efeito da infusão i.v. de Ang II sobre as respostas cardiovasculares à estimulação do barorreflexo, e do tônus simpático e vagal em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) não anestesiados:

Na sequência, considerando as evidências sobre as ações contra-regulatórias da Ang II/Ang-(1-7), avaliamos os efeitos da infusão i.v. de Ang II (6µg/300µl/hora) em animais com deleção do receptor Mas não anestesiados, uma vez que a anestesia pode comprometer as respostas reflexas e o tônus autonômico.

Neste protocolo posicionamos, além de cânulas na artéria e veia femorais, uma cânula na veia jugular direita. Na veia femoral realizamos injeção intravenosa para estimulação do barorreflexo e avaliação do tônus autonômico, enquanto, na veia jugular realizamos infusão i.v. contínua de Ang II (6µg/300µl/hora) ou salina (300µl/hora).

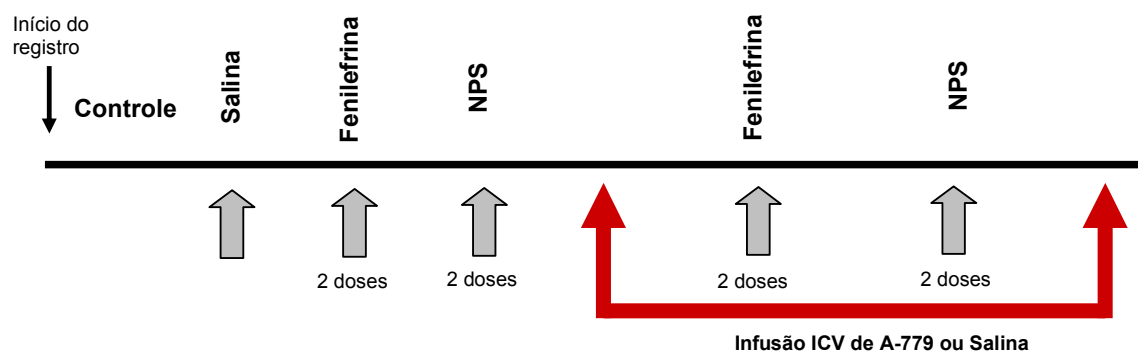
Realizamos injeções em bôlus de duas doses, previamente definidas como as que promoveram a resposta mais adequada, de cada uma das drogas citadas no protocolo anterior.



5) Avaliação do efeito da infusão ICV do antagonista da Ang-(1-7) sobre os parâmetros cardiovasculares basais e sensibilidade barorreflexa em camundongos com superexpressão do receptor Mas no cérebro (NSE-Mas) não anestesiados:

Inicialmente, avaliamos os parâmetros cardiovasculares basais, PAM e FC e sensibilidade barorreflexa nos camundongos NSE-Mas não anestesiados.

Para avaliar se as alterações observadas nos camundongos que superexpressam o receptor Mas no cérebro são decorrentes do efeito da Ang-(1-7), neste protocolo experimental verificamos o efeito da infusão ICV contínua do antagonista da Ang-(1-7), A-779 ou salina sobre as respostas à estimulação do barorreflexo, como descrito nos protocolos anteriores.



3.14 – Genotipagem:

Após finalização dos protocolos experimentais os animais foram sacrificados por overdose anestésica ou tração cervical, e coletado uma amostra da cauda do animal para posterior confirmação da alteração genética através da técnica de amplificação do DNA (*Polymerase Chain Reaction* – PCR).

Amostras das caudas dos camundongos com deleção do receptor Mas foram coletadas ao final do período experimental para confirmar a deleção. A PCR foi realizada com 2 µl do DNA dos camundongos utilizados nos experimentos em um volume final de 50 µl de reação contendo 1 µM dos óligos sense e anti-sense correspondente ao gene do receptor Mas, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 U de Taq polimerase, 2 mM de MgCl₂ e 5 µl de 10x PCR Buffer minus Mg. A reação de PCR foi realizada em quatro etapas, a saber: primeiro, 95° C durante 4 minutos; segundo, 30 ciclos de 30 segundos a 95° C, 30 segundos a 56° C na 1 minuto a 72° C; terceiro, 7 minutos 72° C e quarto, 4° C infinito. A localização do oligo foi definida de modo que o produto da amplificação foi uma seqüência característica e única. Para excluir a possibilidade de contaminação, foram realizados controles negativos para cada reação. Na PCR foi utilizando água ao invés de DNA genômico. Após a reação de PCR 10 µl de cada amostra dos camundongos controles e com deleção do receptor Mas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Esse gel foi preparado com tampão de eletroforese TAE 1x acrescido de brometo de etídio. O brometo de etídio se liga a moléculas de DNA e quando ativado pela luz ultravioleta emite fluorescência. A leitura do gel foi realizada em aparelho sob luz ultravioleta.

Tabela I – Óligos utilizados na PCR

| | Seqüência de nucleotídeos | | |
|----------------------------------|--|----------------------|--------|
| Receptor MAS | Sense 5' ACT GTC GGG CGG TCA TCA TC 3' Antisense 5' GGT GGA GAA AAG CAA GGA GA 3' | | |
| Temperatura de anelamento | 56° C | Tamanho do fragmento | 262 bp |

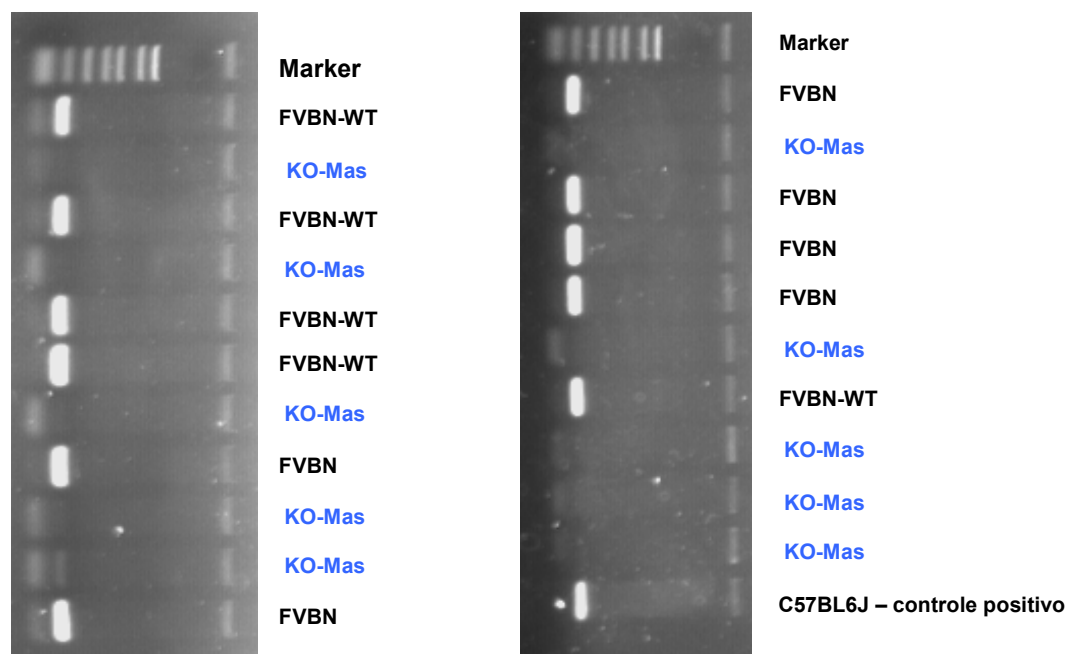
Genotipagem: Técnica de PCR**(Primer: Mas)**

Figura X - Foto ilustrativa de dois géis demonstrando o resultado de genotipagem dos camundongos utilizados no estudo.

3.15 - Análise histológica:

Ao término dos experimentos onde foi realizada infusão ICV, os animais foram sacrificados por overdose de anestésico e 500 nl de corante Alcian Blue foram microinjetados intracerebroventricularmente. Desta forma, o local de microinjeção foi marcado para posterior análise histológica.

Em seguida, uma incisão na região torácica foi realizada para exposição do coração. Este foi perfundido com solução de formaldeído (10%). Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática e a veia cava superior seccionada. O cérebro foi cuidadosamente removido e armazenado em um frasco com solução de formaldeído (10%) por no mínimo 48 horas. Após este período, os cérebros foram retirados da solução de formaldeído e armazenados em

solução de sacarose (20%) por pelo menos 24 horas antes da realização dos cortes histológicos.

Utilizando micrótomo de congelamento, as regiões cerebrais foram seccionadas em cortes seriados de 50 μm . As fatias foram posicionadas em lâminas de vidro previamente gelatinizadas e coradas através da técnica de Nissl com vermelho neutro (1%). Posteriormente, as lâminas foram analisadas com o auxílio de uma lupa e comparadas com o atlas de Paxinos e Franklin (2001).



Figura XI - Fotografia de um corte frontal do cérebro de um camundongo ilustrando os sítios de microinjeção nos ventrículos laterais.

3.16 - Análise dos dados:

Os resultados foram expressos como médias acompanhadas do respectivo erro padrão da média (EPM). Para análise estatística dos resultados, utilizamos o teste *t Student* pareado para análises pareadas; ou não-pareado para comparações entre os grupos experimentais. O nível de significância aceito foi de 95% ($p < 0.05$).

4 – RESULTADOS:

4.1 - *Avaliação dos parâmetros cardiovasculares basais e reflexos cardiovasculares em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) anestesiados:*

No primeiro protocolo investigamos a influência da deleção do receptor da Ang-(1-7), Mas, nas variáveis cardiovasculares basais e nas respostas cardiovasculares reflexas. Inicialmente, observamos que não existe diferença significativa entre os valores de PAM e FC basais entre os animais KO-Mas (93 ± 2 mmHg; 619 ± 20 bpm) e os animais controle da linhagem C57BL6J (97 ± 2 mmHg; 616 ± 15 bpm), anestesiados com uretana (figura 01, tabela 01).

A avaliação da influência da deleção do receptor Mas sobre os reflexos cardiovasculares sugere que este receptor desempenha um papel importante na regulação do barorreflexo, reflexo de Bezold-Jarisch e quimiorreflexo. A bradicardia barorreflexa induzida pela injeção i.v. de FE apresenta-se significativamente diminuída nos camundongos KO-Mas (0.23 ± 0.08 vs. 0.88 ± 0.35 , ms/mmHg, $p < 0.05$), o que condiz com os dados da literatura a respeito da influência do heptapeptídeo Ang-(1-7) sobre a bradicardia barorreflexa (figura 02, tabela 05). No entanto, observamos pela primeira vez, que a resposta taquicárdica barorreflexa induzida pela injeção i.v. de NPS encontra-se significativamente aumentada nos animais KO-Mas (0.37 ± 0.07 ms/mmHg), quando comparada à resposta observada nos animais controle (C57BL6J) (0.10 ± 0.03 , ms/mmHg) anestesiados com uretana (figura 02, tabela 05).

Quando avaliamos as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do reflexo de Bezold-Jarisch, observamos diminuição significativa tanto da resposta hipotensora (-9 ± 2 vs -30 ± 16 Δ PAM, mmHg, FB $0.5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$, $p < 0.05$; -16 ± 5 vs. $-47 \pm$

3 Δ PAM, mmHg, FB 1.0 μ g/5 μ l, $p < 0.01$), quanto da resposta bradicárdica (-17 ± 14 vs -288 ± 150 Δ FC, bpm, FB 0.5 μ g/5 μ l, $p < 0.05$; -190 ± 69 vs. -533 ± 49 Δ FC, bpm, FB 1.0 μ g/5 μ l, $p < 0.01$) nos camundongos KO-Mas em relação aos camundongos controle (C57BL6J) anestesiados com uretana (figura 03, tabelas 06 e 07).

Em relação às respostas reflexas produzidas após estimulação do quimiorreflexo, observamos uma tendência à aumento da resposta pressora, embora não tenha sido estatisticamente significativa nos animais KO-Mas (25 ± 4 vs 16 ± 4 Δ PAM, mmHg, KCN 10 μ g/5 μ l; 24 ± 3 vs. 17 ± 2 Δ PAM, mmHg, FB 1.0 μ g/5 μ l, $p = 0.0556$) (figura 04, tabela 08). Entretanto, diferente do que foi observado nos camundongos KO-Mas quando comparados aos camundongos controle, em relação a resposta de bradicardia do barorreflexo e do reflexo de Bezold-Jarisch, as quais foram atenuadas pela deleção do receptor Mas, a resposta de bradicardia do quimiorreflexo foi significativamente aumentada nos animais KO-Mas (-86 ± 18 vs. -16 ± 11 Δ FC, bpm, KCN 10 μ g/5 μ l, $p < 0.01$; -110 ± 14 vs. -43 ± 18 Δ FC, bpm, KCN 20 μ g/5 μ l, $p < 0.01$) (figura 04, tabela 09). Isso sugere que a modulação da Ang-(1-7) sobre o componente cárdio-vagal dos reflexos cardiovasculares não é inespecífica.

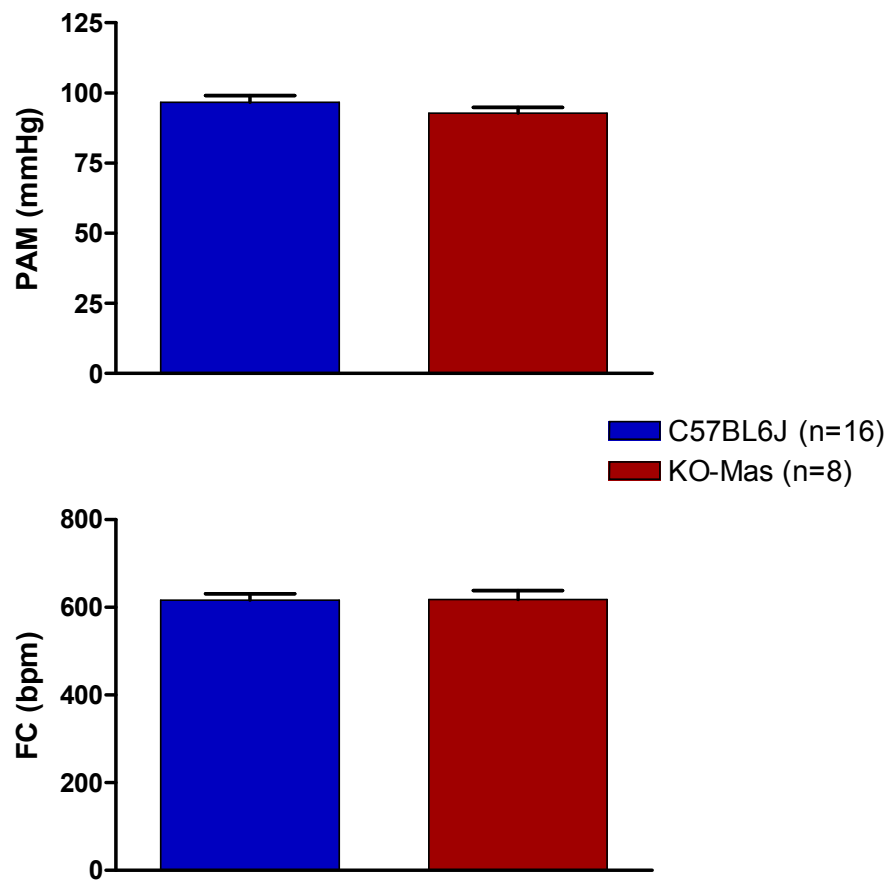
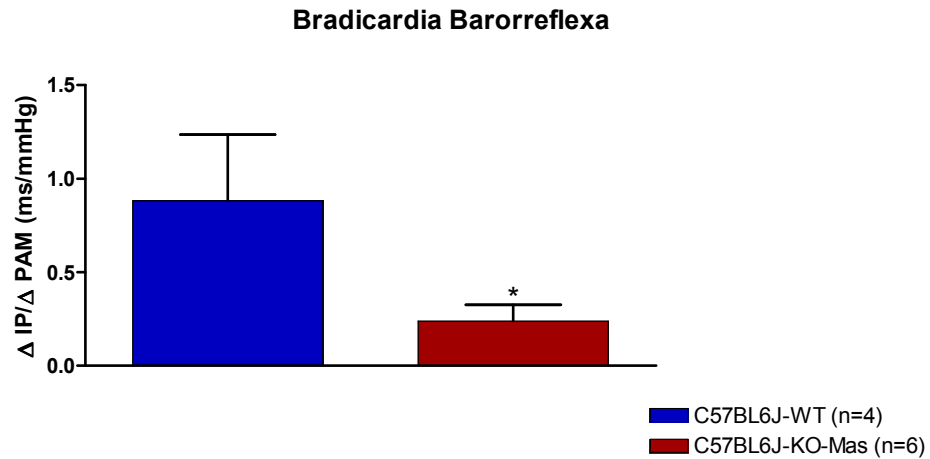


Figura 01 – Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) dos camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) e dos camundongos controle (C57BL6J) anestesiados com uretana.

A)



B)

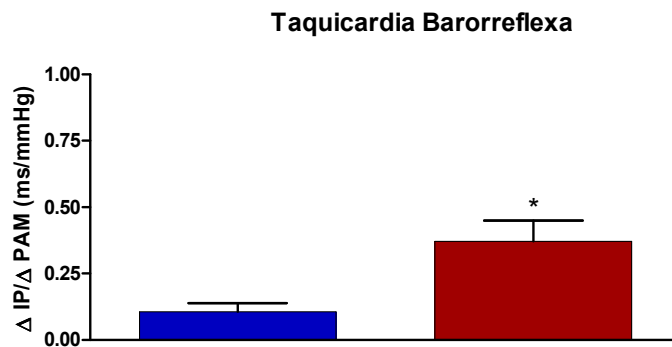


Figura 02 – Alteração na sensibilidade barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg) induzidas por injeções i.v. de FE (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) (**A**) e NPS (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) (**B**) em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) e em camundongos controle (C57BL6J) anestesiados com uretana. (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$, Teste-*t* de Student).

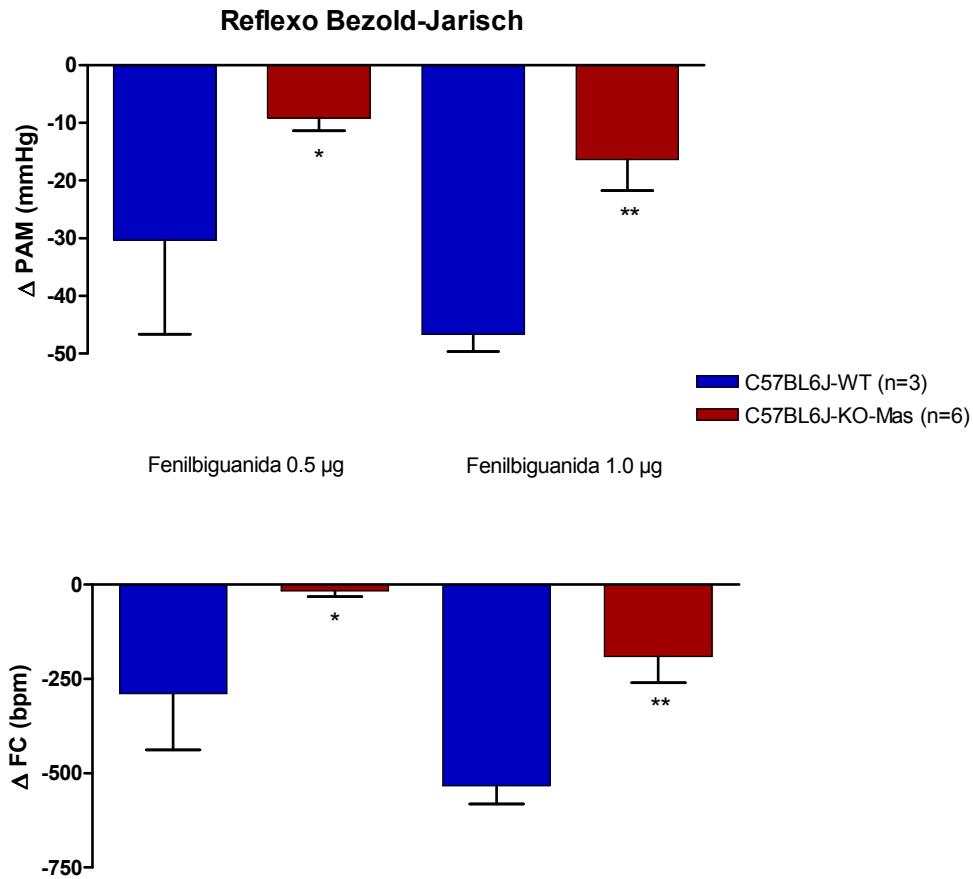


Figura 03 – Respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do reflexo Bezold-Jarisch através de injeções i.v. de FB (0.5 -1.0 µg/5 µl) em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) e em camundongos controle (C57BL6J) anestesiados com uretana. (*) e (**) Diferença significativa em relação ao seu respectivo controle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Test- t de Student).

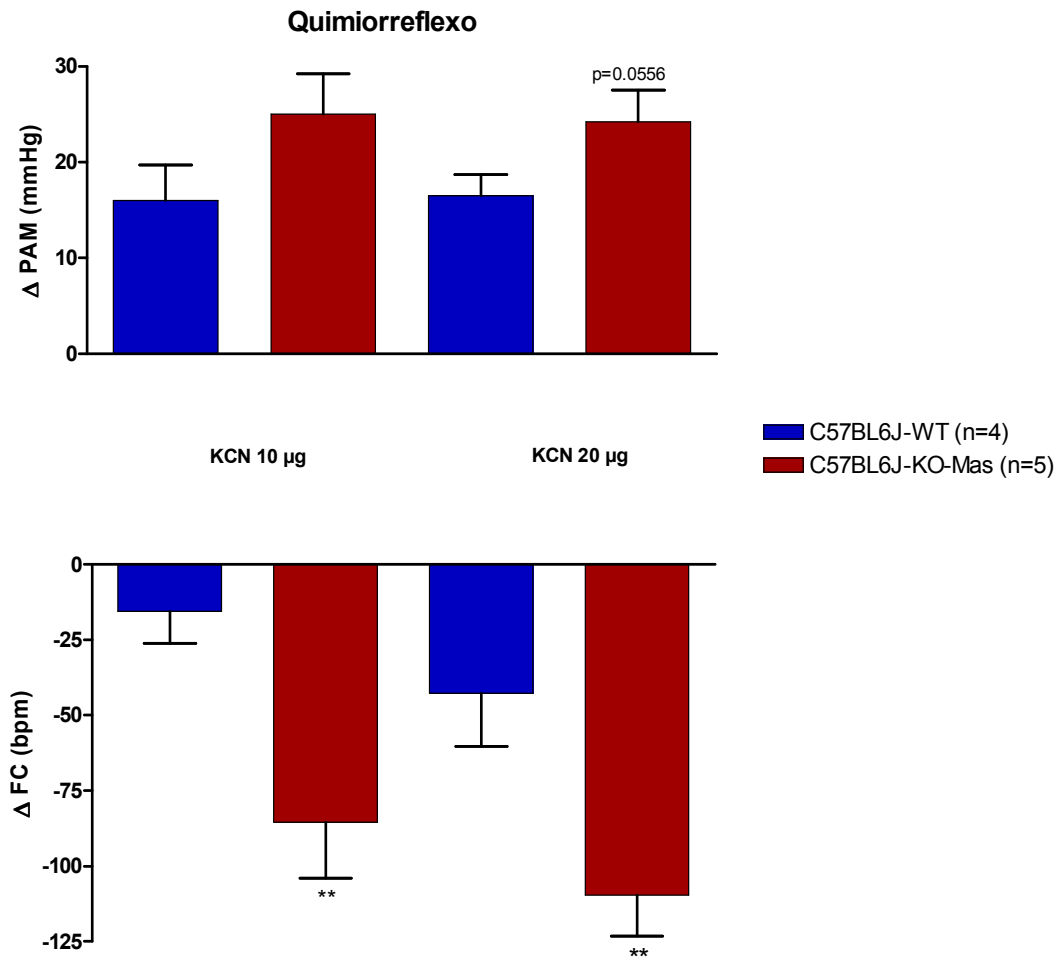


Figura 04 – Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela estimulação do quimiorreflexo através de injeções i.v. de KCN (10 – 20 μ g/5 μ l) em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) e em camundongos controle (C57BL6J) anestesiados com uretana. (**) Diferença significativa em relação ao seu respectivo controle (** $p < 0.01$, Test- t de Student).

4.2 - *Avaliação do efeito da infusão i.v. de Ang II sobre as respostas cardiovasculares à estimulação dos reflexos cardiovasculares em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) anestesiados:*

Neste protocolo experimental realizamos infusão i.v. de Ang II (6 µg/300 µl/hora) ou solução Salina (300 µl/hora). A tabela A ilustra os valores de PAM e FC basais nos grupos experimentais avaliados. Durante a infusão intravenosa de Ang II, observamos alterações tanto na PAM quanto na FC em ambos os grupos experimentais (tabela 02). No entanto, observamos alteração significativamente maior na PAM e FC nos camundongos com deleção do receptor Mas (23 ± 3 vs 15 ± 2 ΔPAM, mmHg, $p < 0.05$; 40 ± 7 vs 10 ± 3 ΔFC, bpm, $p < 0.01$) quando comparados aos camundongos controle (C57BL6J) (figura 05).

Com relação à sensibilidade barorreflexa, os camundongos KO-Mas apresentam bradicardia barorreflexa significativamente atenuada quando comparados aos animais controle durante a infusão i.v. de Salina (0.06 ± 0.01 vs. 0.20 ± 0.03 ΔIP/ΔPAM, ms/mmHg, $p < 0.01$), como já havia sido descrito no protocolo anterior, em animais sem infusão. A infusão i.v. de Ang II não alterou as respostas bradicárdica e taquicárdica barorreflexas nos camundongos controle C57BL6J (0.20 ± 0.04 ΔIP/ΔPAM, ms/mmHg) anestesiados quando comparados ao grupo com infusão i.v. de Salina (0.20 ± 0.03 ΔIP/ΔPAM, ms/mmHg) (figura 06, tabelas 10 e 11). De forma interessante, a infusão i.v. de Ang II nos camundongos KO-Mas atenua ainda mais a resposta bradicárdica barorreflexa, praticamente abolindo esta resposta reflexa induzida pela injeção i.v. de FE quando comparada ao grupo Salina (-0.009 ± 0.02 vs. 0.06 ± 0.01 ΔIP/ΔPAM, ms/mmHg, $p < 0.05$) (figura 06, tabelas 10 e 11). Quando avaliamos a taquicardia barorreflexa, observamos que a infusão i.v. de Ang II acentua significativamente a

resposta taquicárdica barorreflexa induzida pela injeção i.v. de NPS nos camundongos com deleção do receptor Mas quando comparado à infusão i.v. de Salina (0.24 ± 0.05 vs. 0.11 ± 0.02 Δ IP/ Δ PAM, ms/mmHg, $p < 0.05$) (figura 06, tabelas 10 e 11). Esses dados demonstram que o receptor Mas, está envolvido de forma importante na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pela Ang II.

Na avaliação das respostas cardiovasculares promovidas pela estimulação do reflexo de Bezold-Jarisch, continuamos observando uma redução da resposta hipotensora deste reflexo nos camundongos KO-Mas [-18.0 ± 3 Δ PAM, mmHg, (1.0 μ g/5 μ l)] quando comparados aos camundongos controle (C57BL6J) [-9.0 ± 3 Δ PAM, mmHg, (1.0 μ g/5 μ l)], durante a infusão i.v. de Salina, como havia sido descrito no protocolo anterior, onde não realizamos infusão. A infusão i.v. de Ang II não promoveu alterações nas respostas hipotensora [-9.5 ± 4 vs. -6.5 ± 3 , Δ PAM, mmHg, (0.5 μ g/5 μ l)]; -21 ± 3 vs. -18 ± 3 , Δ PAM, mmHg, (1.0 μ g/5 μ l)] e bradicárdica [-20 ± 15 vs. -14 ± 12 , Δ FC, bpm, (0.5 μ g/5 μ l)]; -271 ± 116 vs. -94 ± 36 , Δ FC, bpm, (1.0 μ g/5 μ l)] induzidas pela administração i.v. de FB nos animais controle C57BL6J anestesiados com uretana (figura 07, tabelas 12-15). Por outro lado, nos animais KO-Mas, observamos que a infusão i.v. de Ang II reduziu significativamente a resposta hipotensora nos animais KO-Mas em uma das doses avaliadas quando comparado ao grupo tratado com Salina [-2.5 ± 0.6 vs. -9.0 ± 2 , Δ PAM, mmHg, (0.5 μ g/5 μ l)] (figura 07, tabelas 12 e 13). Com relação à resposta bradicárdica, a infusão i.v. de Ang II não promoveu alterações significativas nos camundongos KO-Mas [-303 ± 175 vs. -255 ± 103 , Δ FC, bpm, (0.5 μ g/5 μ l)]; -324 ± 104 vs. -227 ± 78 , Δ FC, bpm, (1.0 μ g/5 μ l)] quando comparados ao grupo tratado com Salina (figura 07, tabelas 14 e 15).

Observamos no protocolo anterior que a deleção do receptor Mas afeta o quimiorreflexo, principalmente em relação à resposta bradicárdica. Da mesma forma, neste protocolo continuamos a observar que durante a infusão i.v. de Salina a resposta

bradicárdica do quimiorreflexo nos camundongos KO-Mas está significativamente aumentada em relação ao grupo controle (C57BL6J) [-96 ± 8 vs. -26 ± 11 , ΔFC , bpm, (10 $\mu g/5 \mu l$); -104 ± 15 vs. -42 ± 6 , ΔFC , bpm, (20 $\mu g/5 \mu l$)] (figura 08, tabela 18). Quando avaliamos o quimiorreflexo durante a infusão i.v. de Ang II, observamos que a resposta pressora do quimiorreflexo não foi significativamente alterada nos camundongos controle (C57BL6J), nem tampouco nos animais KO-Mas (figura 08, tabela 17) anestesiados com uretana. No que se refere à resposta bradicárdica, observamos que a infusão i.v. de Ang II aumentou a bradicardia observada nos camundongos controle [-26 ± 11 vs. -55 ± 8 , ΔFC , bpm, (10 $\mu g/5 \mu l$)] (figura 08, tabelas 18 e 19). Por outro lado, nos camundongos KO-Mas a infusão de Ang II não potenciou esta resposta, de tal forma que nesta situação (infusão de Ang II) a bradicardia do quimiorreflexo foi de magnitude semelhante àquela observada nos animais controle [-64 ± 12 vs. -55 ± 8 , ΔFC , bpm, (10 $\mu g/5 \mu l$); (figura 08, tabela 19).

O conjunto desses resultados mostra que os efeitos modulatórios da Ang II sobre os parâmetros cardiovasculares basais e reflexos cardiovasculares são exacerbados em camundongos com deleção do receptor Mas, o que sugere que a Ang-(1-7) possa desempenhar um papel contra-regulatório sobre as ações da Ang II.

Tabela A – Valores Basais de PAM (mmHg) e FC (bpm) em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) anestesiados com uretana, submetidos a infusão i.v. de Ang II (6µg/300µl/hora) ou Salina (300µl/hora):

| Grupo | Droga | N | PAM (mmHg) | FC (bpm) |
|----------------|--------------|----------|-------------------|-----------------|
| <i>C57BL6J</i> | Salina | n=9 | 100 ± 4 | 614 ± 25 |
| | Ang II | n=6 | 100 ± 4 | 603 ± 17 |
| <i>KO-Mas</i> | Salina | n=6 | 95 ± 6 | 648 ± 25 |
| | Ang II | n=4 | 93 ± 4 | 639 ± 35 |

Tabela B – Alterações na PAM (mmHg) e FC (bpm) em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) anestesiados com uretana, submetidos a infusão i.v. de Ang II (6µg/300µl/hora) ou Salina (300µl/hora):

| Grupo | Droga | N | Δ PAM (mmHg) | Δ FC (bpm) |
|----------------|--------------|----------|---------------------|-------------------|
| <i>C57BL6J</i> | Salina | n=6 | -3 ± 0.7 | 12 ± 3 |
| | Ang II | n=6 | 15 ± 2 *** | 10 ± 3 |
| <i>KO-Mas</i> | Salina | n=7 | -1 ± 0.3 | 25 ± 3 |
| | Ang II | n=7 | 23 ± 3 *** # | 40 ± 7 * ## |

(*) e (***) Diferença significativa em relação ao respectivo grupo tratado com Salina (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Teste-*t* de Student). (#) Diferença significativa em relação ao grupo *C57BL6J* tratado com Ang II (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, Teste-*t* de Student).

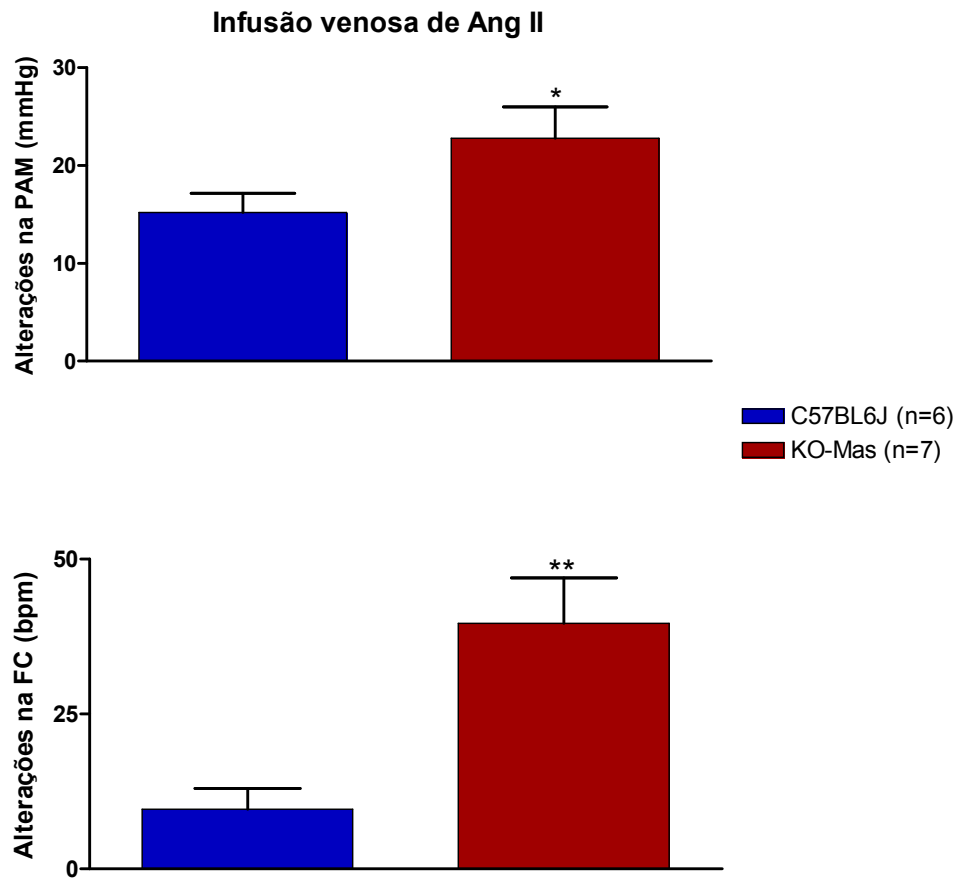


Figura 05 – Alterações máximas na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e na frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela infusão i.v. de Ang II (6 μ g/300 μ l/hora) nos camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) e nos animais controle (C57BL6J) anestesiados com uretana. (*) e (**) Diferença significativa em relação ao grupo controle (C57BL6J) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Teste- t de Student).

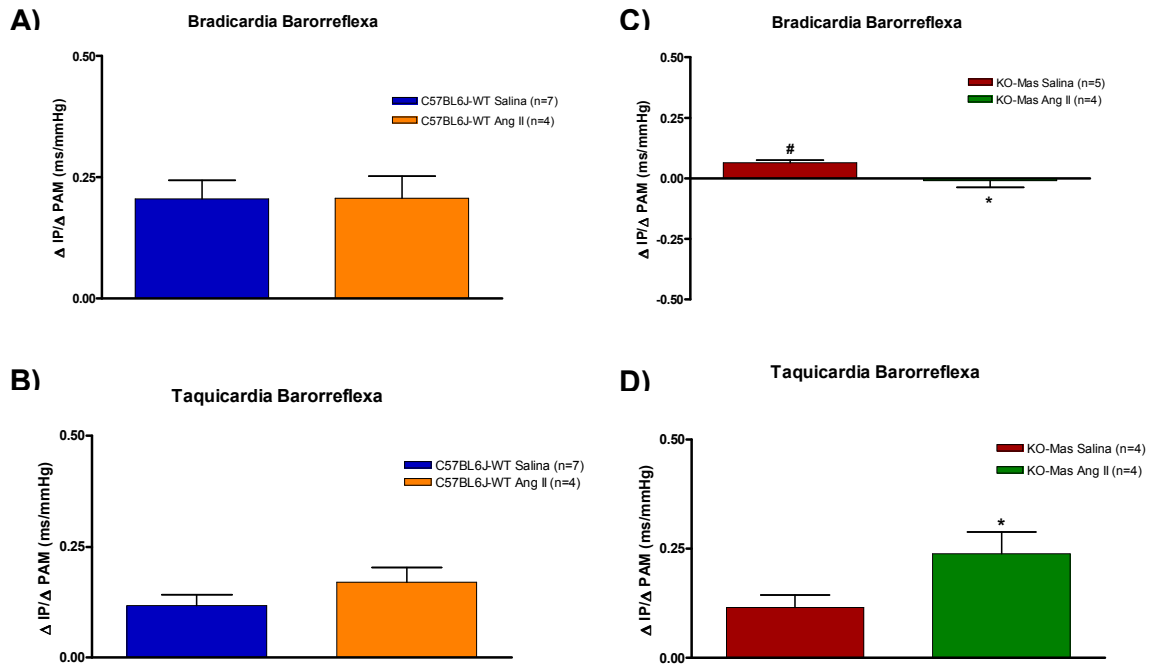


Figura 06 – Sensibilidade barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg) induzidas por injeções i.v. de FE e NPS (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) durante a infusão i.v. de Ang II (6 $\mu\text{g}/300\mu\text{l}/\text{hora}$) ou Salina (300 $\mu\text{l}/\text{hora}$) em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) (C e D) e camundongos controle (C57BL6J) (A e B) anestesiados com uretana. (*) Diferença significativa em relação ao respectivo grupo tratado com Salina (* $p < 0.05$, Teste-*t* de Student). (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle (C57BL6J) (# $p < 0.05$, Teste-*t* de Student).

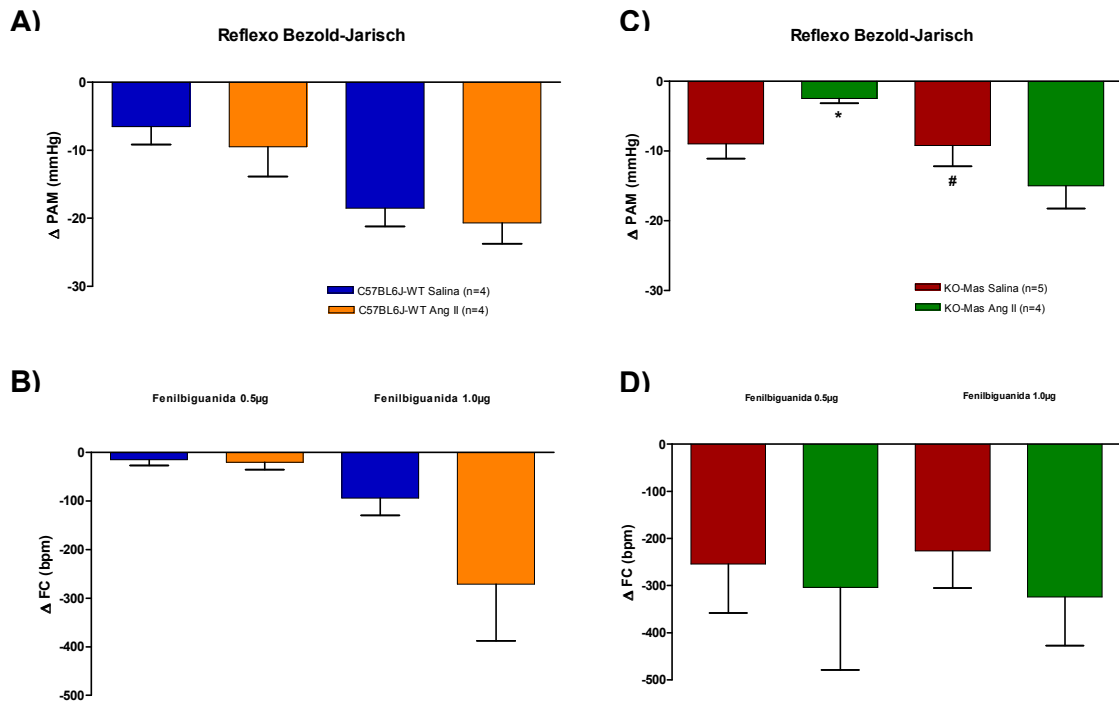


Figura 07 – Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e na frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela estimulação do reflexo de Bezold-Jarisch através de injeções i.v. de FB (0.5–1.0 μ g/5 μ l) durante a infusão i.v. de Ang II (6 μ g/300 μ l/hora) ou Salina (300 μ l/hora) em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) (**C e D**) e camundongos controle (C57BL6J) (**A e B**) anestesiados com uretana. (*) Diferença significativa em relação ao respectivo grupo tratado com Salina (* $p < 0.05$, Teste-t de Student). (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle (C57BL6J) (# $p < 0.05$, Teste-t de Student).

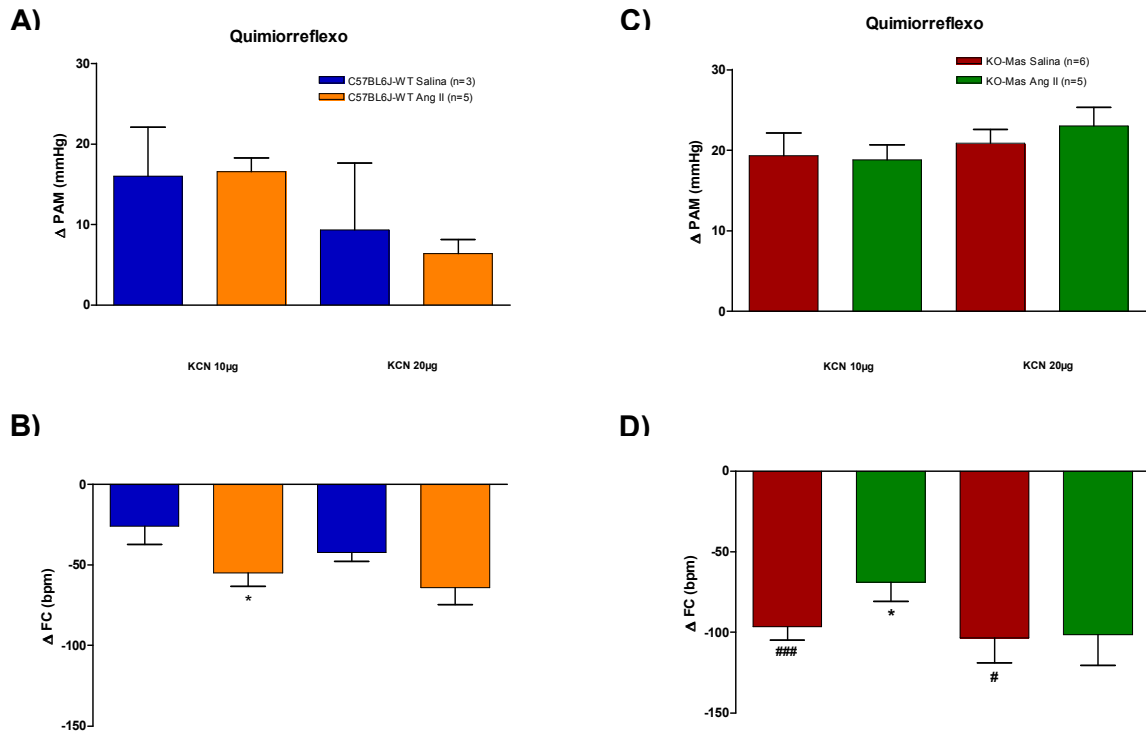


Figura 08 – Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e na frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela estimulação do quimiorreflexo através de injeções i.v. de KCN (10–20 μ g/5 μ l) durante a infusão i.v. de Ang II (6 μ g/300 μ l/hora) ou Salina (300 μ l/hora) em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) (**C e D**) e camundongos controle (C57BL6J) (**A e B**) anestesiados com uretana. (*) Diferença significativa em relação ao respectivo grupo tratado com Salina (* $p < 0.05$, Teste- t de Student). (#) e (###) Diferença significativa em relação ao grupo controle (C57BL6J) (# $p < 0.05$, $p < 0.001$, Teste- t de Student).

4.3 - Avaliação dos parâmetros cardiovasculares basais e dos reflexos cardiovasculares em camundongos da linhagem FVBN com deleção do receptor Mas (KO-Mas) não anestesiados:

Com o aprimoramento da técnica de canulação em camundongos, conseguimos investigar a influência da deleção do receptor da Ang-(1-7), Mas, nas variáveis cardiovasculares basais e nas respostas cardiovasculares reflexas e autonômicas, em animais não anestesiados, e, portanto, em condições fisiologicamente mais adequadas. Dessa forma, na próxima seqüência de experimentos avaliamos as alterações cardiovasculares em camundongos da linhagem FVBN com deleção do receptor Mas não anestesiados. Os dados demonstram que os animais com deleção do receptor Mas (KO-Mas) apresentam valores de PAM significativamente mais elevados que os observados nos animais controle da linhagem FVBN não anestesiados (118 ± 1 vs. 109 ± 2 , mmHg, $p < 0.01$). Entretanto, não existe diferença significativa entre os valores de FC entre os animais KO-Mas e os animais controle dessa linhagem (615 ± 30 vs. 648 ± 13 , bpm), não anestesiados (figura 09, tabela 20).

Em relação à função autonômica cardíaca, quando analisamos o efeito promovido pela injeção i.v. de atropina sobre a FC observamos redução significativa do efeito taquicárdico nos camundongos com deleção do receptor Mas quando comparado ao respectivo grupo controle (23 ± 4 vs. 70 ± 19 , ΔFC , bpm) (figura 10, tabela 21). Ao contrário, observamos acentuação significativa do efeito bradicárdico produzido pela injeção i.v. de atenolol nos camundongos com deleção do receptor Mas quando comparados aos animais controle (-181 ± 10 vs. -115 ± 23 , ΔFC , bpm) (figura 10, tabela 21). Com relação à FC intrínseca dos camundongos FVBN não anestesiados, após o duplo bloqueio com atropina e atenolol, observamos que os animais KO-Mas

apresentam FC intrínseca elevada em relação aos animais controle da mesma linhagem (514 ± 39 vs. 532 ± 11 , bpm) (figura 10, tabela 22).

Avaliamos na seqüência, as respostas induzidas pela estimulação dos reflexos cardiovasculares nos camundongos não anestesiados da linhagem FVBN, confirmando os dados anteriores, observados nos animais da linhagem C57BL6J anestesiados com uretana. Nos animais KO-Mas da linhagem FVBN não anestesiados, observamos que a bradicardia barorreflexa, induzida pela injeção i.v. de FE apresenta-se significativamente diminuída (0.78 ± 0.44 vs. 1.3 ± 0.14 , $\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg, $p < 0.05$) quando comparada à resposta dos camundongos controle (figura 11, tabela 23). Com relação à resposta de taquicardia reflexa, induzida pela injeção i.v. de NPS, observamos acentuação significativa (1.63 ± 0.4 vs. 0.80 ± 0.13 , $\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg, $p < 0.05$) desta resposta nos camundongos com deleção do receptor Mas em relação à resposta observada nos animais controle (FVBN) não anestesiados (figura 11, tabela 23). Esses dados confirmam a participação importante do heptapeptídeo Ang-(1-7), via receptor Mas, na regulação das respostas barorreflexas, evidenciando uma modulação central.

As respostas hipotensora e bradicárdica induzidas por estimulação do reflexo de Bezold-Jarisch apresentam-se significativamente diminuídas (para a dose de $0.5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ de fenilbiguanida) nos camundongos KO-Mas (-17 ± 5 vs. -45 ± 6 , ΔPAM , mmHg, $p < 0.01$; e -212 ± 36 vs. -391 ± 29 , ΔFC , bpm, $p < 0.01$) quando comparados aos animais controle não anestesiados, o que está de acordo com os dados descritos anteriormente para os animais anestesiados com uretana (figura 12, tabelas 24 e 25).

Em relação às respostas reflexas produzidas após estimulação do quimiorreflexo, observamos aumento significativo tanto na resposta pressora [20 ± 3 vs. 12 ± 0.8 , ΔPAM , mmHg, ($2.5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$), $p < 0.05$] quanto na resposta bradicárdica [-250 ± 74 vs. -52 ± 26 , ΔFC , bpm, ($2.5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$), $p < 0.05$] quando comparados aos animais

controle (FVBN) não anestesiados (figura 13, tabelas 26 e 27), também confirmando os dados demonstrados em animais anestesiados com uretana, na primeira seqüência experimental. Além disso, comparando as respostas cardiovasculares nessas duas linhagens (FVBN vs. C57BL6J) podemos observar que os camundongos da linhagem FVBN apresentam respostas cardiovasculares do quimiorreflexo mais pronunciadas que os camundongos C57BL6J. Doses menores de KCN nos animais FVBN (2.5 µg/5 µl) foram suficientes para induzir respostas cardiovasculares de magnitudes semelhantes àsquelas observadas nos animais C57BL6J com doses maiores de KCN (10 µg/5 µl) (figuras 4 e 13, tabelas 66 e 67).

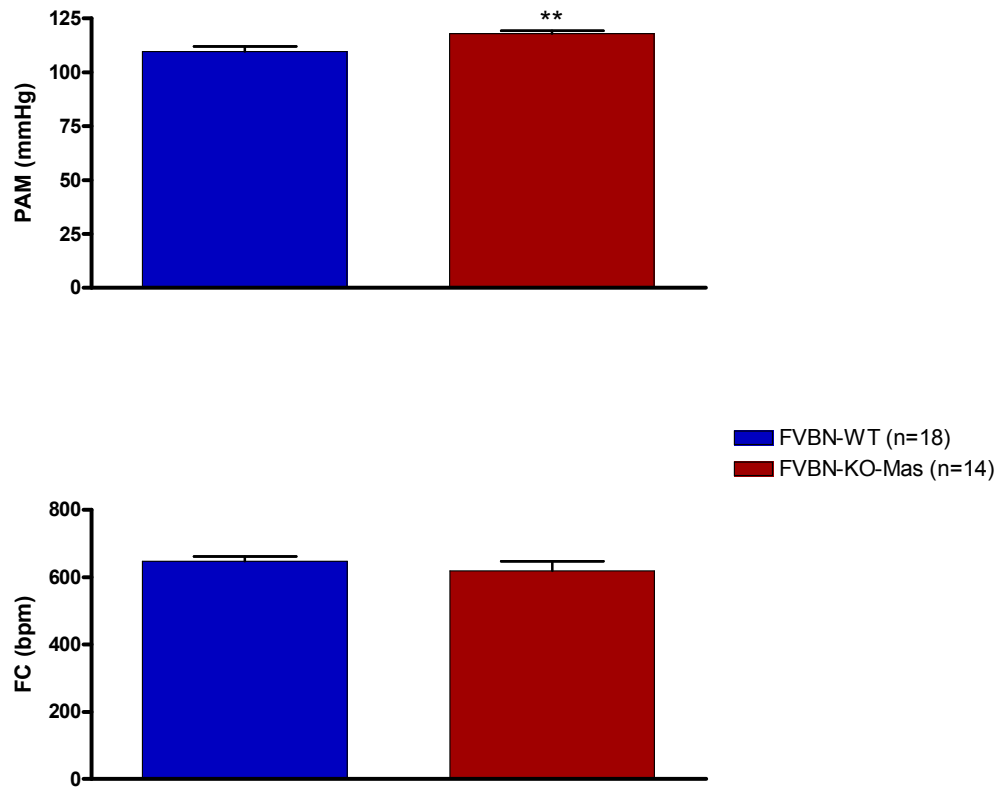
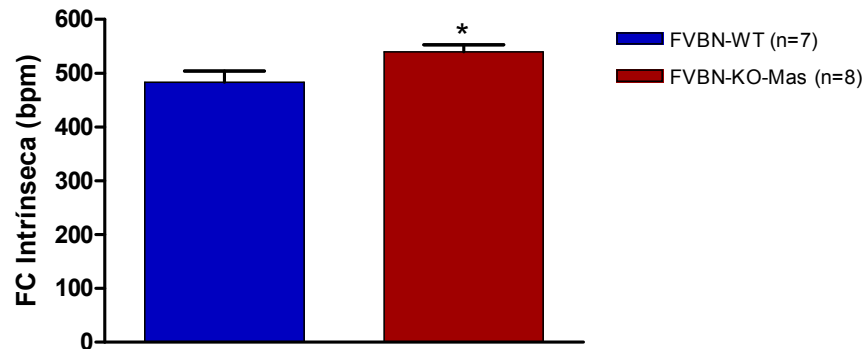


Figura 09 – Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) dos camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) e dos camundongos controle (FVBN) não anestesiados. (**) Diferença significativa em relação ao controle (** $p < 0.01$, Teste- t de Student).

A



B

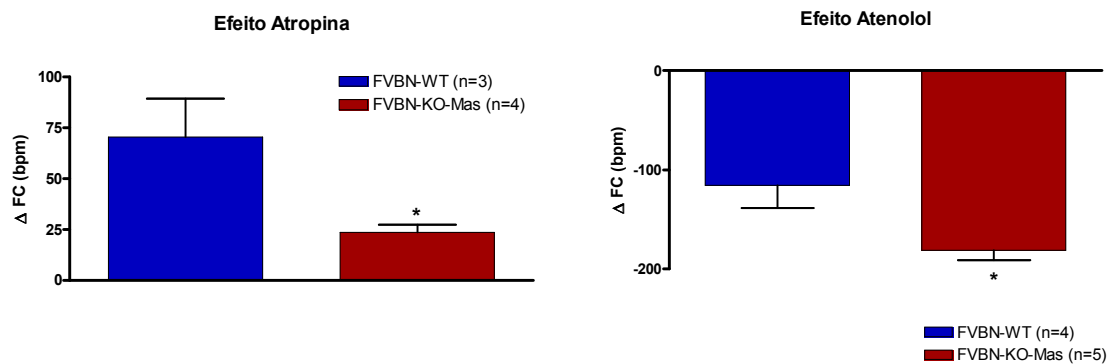


Figura 10 – (A) Frequência cardíaca intrínseca (bpm), avaliada após bloqueio autonômico simpático e parassimpático através de injeções i.v. de atenolol (1 mg/kg) e atropina (1 mg/kg); **(B)** Alterações sobre a frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela injeção i.v. de atropina (1 mg/kg) ou de atenolol (1 mg/kg) avaliados em camundongos com deleção do receptor Mas da linhagem FVBN não anestesiados. (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$, Teste- t de Student).

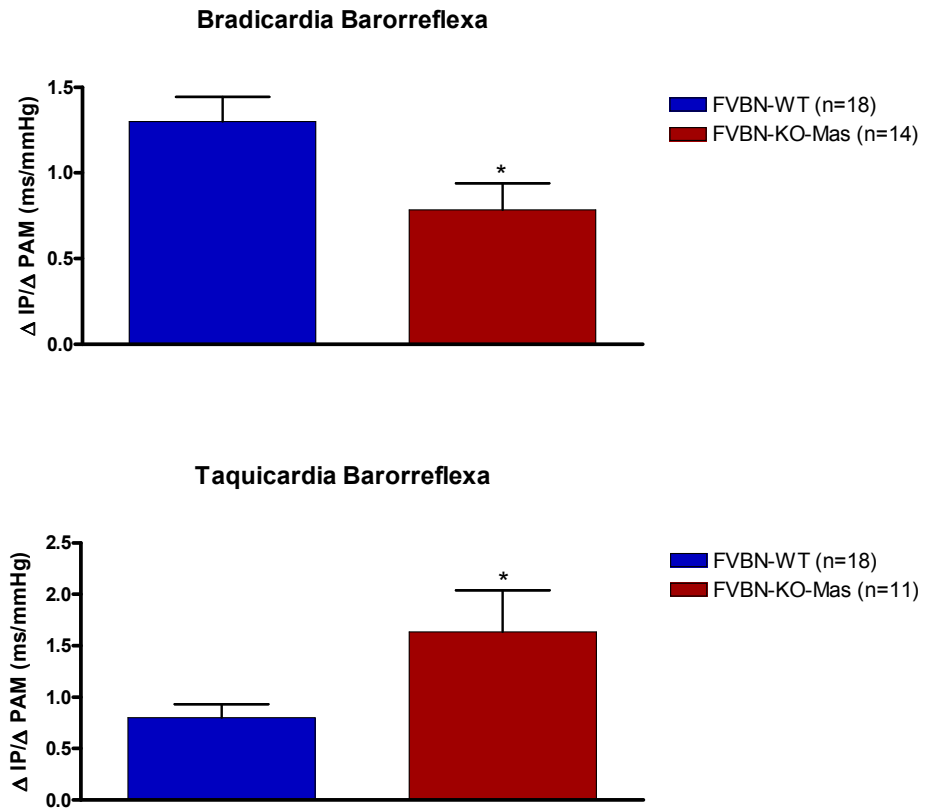


Figura 11 – Sensibilidade barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg) induzidas por injeções i.v. de FE (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e NPS (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) em camundongos com deleção do receptor Mas da linhagem FVBN não anestesiados. (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$, Teste-t de Student).

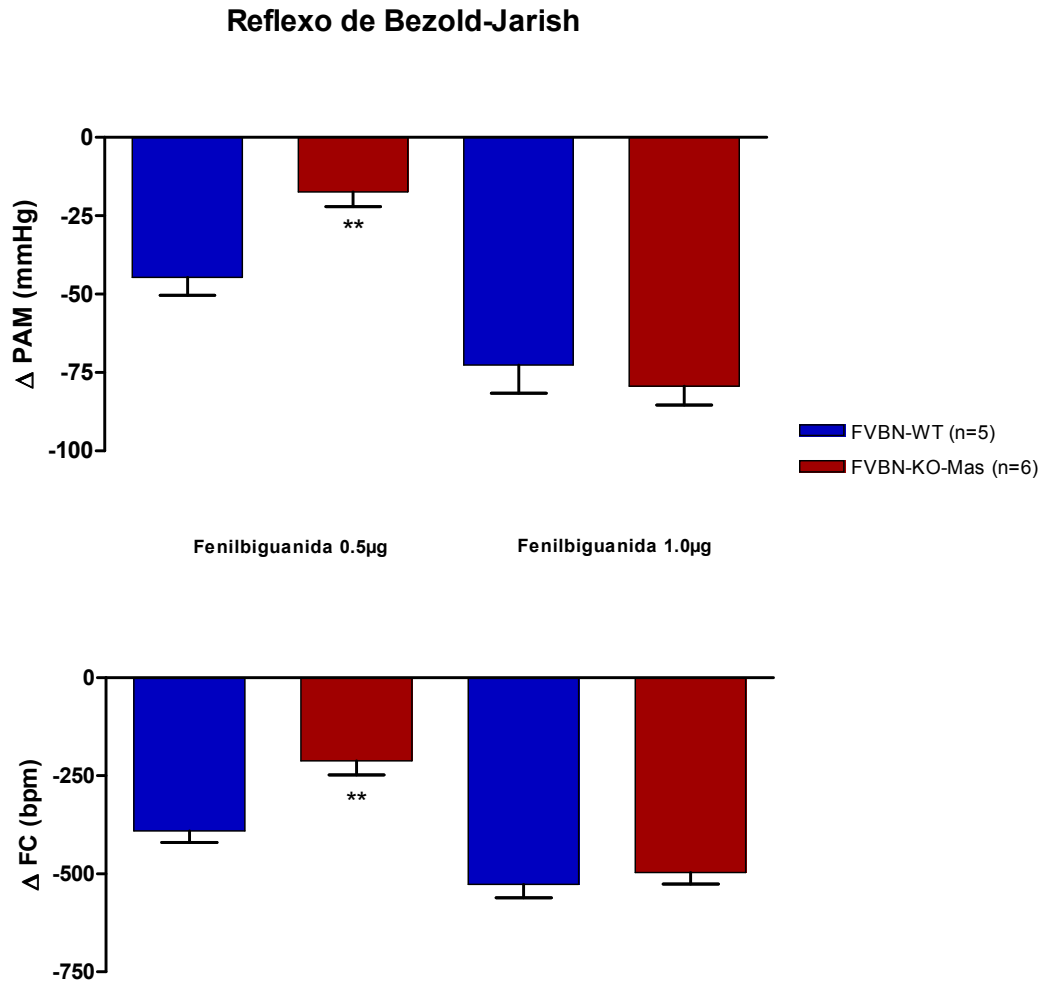


Figura 12 - Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e freqüência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela estimulação do reflexo de Bezold-Jarisch através de injeções i.v. de FB (0.5–1.0 μ g/5 μ l) em camundongos com deleção do receptor Mas da linhagem FVBN não anestesiados. (**) Diferença significativa em relação ao grupo controle (** $p < 0.01$, Teste- t de Student).

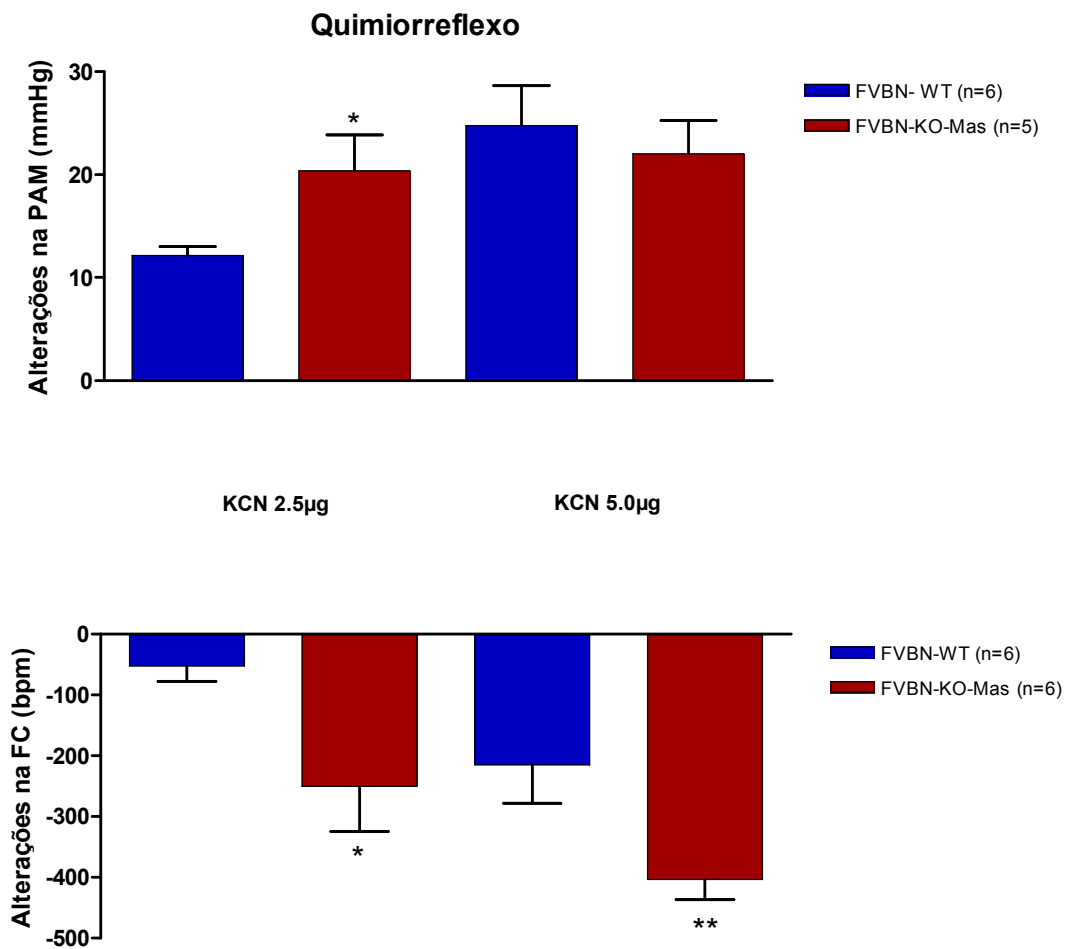


Figura 13 - Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e freqüência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela estimulação do quimiorreflexo através de injeções i.v. de KCN (2.5 – 5 µg/5 µl) em camundongos da linhagem FVBN não anestesiados. (*) e (**) Diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Teste- t de Student).

4.4 - Avaliação do efeito da infusão i.v. de Ang II sobre as respostas cardiovasculares à estimulação do barorreflexo e sobre a função autonômica cardíaca em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) não anestesiados:

Neste protocolo experimental, avaliamos a influência da deleção do receptor Mas durante a infusão i.v. de Ang II (6 µg/300 µl/hora) sobre as respostas cardiovasculares desencadeadas pela estimulação do barorreflexo. Quando avaliamos o efeito da infusão i.v. de Ang II (6 µg/300 µl/hora) em camundongos FVBN, com deleção do receptor Mas (KO-Mas) não observamos alterações significativamente diferentes entre os grupos avaliados. No entanto, a infusão i.v. de Ang II promoveu significativo efeito pressor (36 ± 4 vs. 32 ± 4 mmHg) e bradicardia (-158 ± 21 vs. -182 ± 26 bpm) em ambos os grupos avaliados (tabela C).

Em relação à função autonômica cardíaca, observamos o mesmo resultado descrito anteriormente durante a infusão i.v. de Salina (300 µl/hora), ou seja, o efeito taquicárdico promovido pela injeção i.v. de atropina (7 ± 3 vs. 74 ± 13 bpm) significativamente reduzido e acentuação significativa do efeito bradicárdico produzido pela injeção i.v. de atenolol (-192 ± 18 vs. -153 ± 9 bpm) nos camundongos com deleção do receptor Mas quando comparados aos animais controle (figura 14, tabela 28). Ao compararmos os efeitos sobre a FC promovidos pela injeção de atropina e atenolol durante a infusão i.v. de Ang II (6 µg/300 µl/hora), observamos alterações interessantes. O efeito taquicárdico induzido pelo bloqueio vagal cardíaco foi significativamente atenuado (74 ± 13 vs. 38 ± 10 bpm) pela infusão i.v. de Ang II nos camundongos controle FVBN não anestesiados, enquanto este mesmo efeito foi significativamente acentuado (56 ± 9 vs. 7 ± 3 bpm) nos camundongos com deleção do receptor Mas (figura 14, tabela 29). A infusão de Ang II não promoveu alterações

significativas sobre a bradicardia induzida pela injeção i.v. de atenolol nos camundongos com deleção do receptor Mas (-189 ± 20 vs. -192 ± 17 bpm), nem tampouco no respectivo grupo controle (-135 ± 10 vs. -153 ± 9 bpm) (figura 14, tabela 29).

Com relação à sensibilidade barorreflexa, durante a infusão i.v. de Ang II ($6 \mu\text{g}/300 \mu\text{l/hora}$) não observamos alteração significativa no índice de bradicardia barorreflexa (3.37 ± 0.82 vs. 2.56 ± 0.63 ms/mmHg) e nenhuma alteração significativa no índice de taquicardia barorreflexa (0.75 ± 0.14 vs. 0.81 ± 0.16 ms/mmHg) nos animais controle FVBN não anestesiados (figura 15, tabelas 30 e 31). Nos animais KO-Mas, durante a infusão i.v. de Ang II ($6 \mu\text{g}/300 \mu\text{l/hora}$) também não observamos alterações significativas sobre a bradicardia barorreflexa (2.79 ± 0.73 vs. 1.68 ± 0.39 ms/mmHg) nos animais KO-Mas, e nem alterações significativas na taquicardia barorreflexa (0.48 ± 0.01 vs. 0.49 ± 0.13 ms/mmHg) (figura 16, tabelas 32 e 33). A infusão i.v. de Salina ($300 \mu\text{L/hora}$) não alterou de maneira significativa nem a bradicardia (2.74 ± 0.99 vs. 3.56 ± 1.0 ms/mmHg) nem a taquicardia barorreflexa (1.05 ± 0.33 vs. 1.30 ± 0.34 ms/mmHg) nos animais controle FVBN (figura 15, tabelas 30 e 31) nem tampouco nos camundongos com deleção do receptor Mas não anestesiados (2.12 ± 0.51 vs. 1.99 ± 0.46 ms/mmHg, bradicardia barorreflexa; 0.32 ± 0.69 vs. 0.39 ± 0.10 ms/mmHg, taquicardia barorreflexa) (figura 16, tabelas 32 e 33). Vale ressaltar, que a avaliação da sensibilidade barorreflexa foi iniciada após pelo menos 30 minutos do início da infusão de Salina e Angiotensina II, e consequente estabilização dos parâmetros cardiovasculares em todos os grupos experimentais avaliados. Desta forma, garantimos que o nível de PAM e FC, modificados pela infusão i.v. de Ang II não interferiu na avaliação das respostas reflexas.

Considerando que na análise do índice da sensibilidade barorreflexa, por $\Delta\text{IP}/\Delta\text{PAM}$, onde se leva em consideração apenas a variação do pico de bradicardia

em relação à variação do pico de pressão arterial, e ainda que a infusão i.v. de Ang II não foi capaz de alterar o barorreflexo, avaliado por este índice, analisamos a bradicardia barorreflexa considerando também a variação da FC em função do tempo ($\Delta FC/\Delta t$, bpm/seg). Para isso a bradicardia barorreflexa foi dividida em dois componentes: um componente rápido (1º componente), e um componente lento (2º componente), conforme descrito no item Material e Métodos. Para elucidar as alterações produzidas pela infusão i.v. de Ang II sobre a inclinação de cada um dos componentes da bradicardia barorreflexa, realizamos a análise separada dos mesmos.

Com relação ao componente rápido (1º componente), a infusão i.v. de Ang II diminuiu significativamente a inclinação deste componente nos camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) (-102 ± 18 vs. -150 ± 13 bpm/seg), mas não nos camundongos controle FVBN não anestesiados (-145 ± 29 vs. -178 ± 20 bpm/seg). Durante a avaliação do componente lento (2º componente) observamos que a infusão i.v. de Ang II promoveu aumento significativo da inclinação deste componente nos camundongos KO-Mas (13.42 ± 2.18 vs. 5.63 ± 0.88 bpm/seg), mas não nos camundongos FVBN não anestesiados (13.62 ± 2.28 vs. 6.42 ± 0.09 bpm/seg) (figura 18, tabela 35). A infusão i.v. de Salina não promoveu alterações significativas na inclinação de nenhum dos dois componentes da bradicardia barorreflexa, tanto nos camundongos com deleção do receptor Mas, quanto no grupo controle (figura 17, tabela 34).

Quando avaliamos as respostas bradicárdica e taquicárdica barorreflexas após o bloqueio autonômico parassimpático com injeção de metil-atropina (1 mg/kg), observamos uma redução significativa na bradicardia (0.010 ± 0.07 vs. 2.76 ± 0.24 ms/mmHg) e taquicardia (0.09 ± 0.02 vs. 0.24 ± 0.05 ms/mmHg) barorreflexas nos camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) (figura 20, tabelas 38 e 39) e nos camundongos controle (FVBN) (bradicardia barorreflexa: 0.06 ± 0.03 vs. $3.83 \pm$

1.24 ms/mmHg; taquicardia barorreflexa: 0.20 ± 0.05 vs. 1.46 ± 0.42 ms/mmHg) (figura 19, tabelas 36 e 37) não anestesiados. A infusão i.v. de Ang II ($6 \mu\text{g}/300 \mu\text{l/hora}$) não alterou esta resposta inibitória sobre a função barorreflexa (figuras 19 e 20, tabelas 36 a 37).

Em relação ao bloqueio simpático, realizado pela administração de atenolol (1 mg/kg), observamos uma facilitação significativa na bradicardia barorreflexa (4.18 ± 0.82 vs. 2.17 ± 0.54 ms/mmHg) nos animais controle (FVBN) não anestesiados, durante a infusão i.v. de Salina ($300 \mu\text{l/hora}$). A infusão i.v. de Ang II ($6 \mu\text{g}/300 \mu\text{l/hora}$) não alterou esta resposta (12 ± 2 vs. 6.25 ± 2.22 ms/mmHg) nos camundongos FVBN não anestesiados (figura 21, tabela 65 - anexos). No entanto, após bloqueio simpático cardíaco não observamos alterações significativas na resposta taquicárdica barorreflexa nos animais FVBN durante infusão i.v. de Salina (0.20 ± 0.07 vs. 0.27 ± 0.06 ms/mmHg) ou de Ang II (0.45 ± 0.22 vs. 0.49 ± 0.17 ms/mmHg) (figura 21, tabela 41).

Quando avaliamos os animais KO-Mas nas mesmas condições experimentais, observamos uma significativa facilitação da bradicardia barorreflexa após o bloqueio simpático com atenolol (1 mg/kg) durante a infusão i.v. de Salina ($300 \mu\text{l/hora}$) (5.93 ± 1.07 vs. 3.09 ± 0.47 ms/mmHg) e durante a infusão i.v. de Ang II ($6 \mu\text{g}/300 \mu\text{l/hora}$) (6.63 ± 1.91 vs. 3.30 ± 1.27 ms/mmHg) (figura 22, tabela 42). Durante a avaliação da taquicardia barorreflexa, também observamos aumento significativo dessa resposta após administração de atenolol (1 mg/kg) em ambos os grupos avaliados (0.85 ± 0.38 vs. 0.27 ± 0.07 ms/mmHg, durante infusão i.v. de Salina; 0.55 ± 0.18 vs. 0.38 ± 0.13 ms/mmHg, durante a infusão i.v. de Ang II) (figura 22, tabela 43).

Tabela C – Alterações máximas na PAM (mmHg) e FC (bpm) em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) e controle não anestesiados, promovidas pela infusão i.v. de Ang II (6µg/300µl/hora) e Salina (300µl/hora):

| Grupo | Droga | N | Δ PAM (mmHg) | Δ FC (bpm) |
|--------------|--------------|----------|---------------------|-------------------|
| FVBN | Salina | n=12 | -1.7 ± 0.25 | 13 ± 3 |
| | Ang II | n=6 | 32 ± 4*** | -182 ± 26*** |
| KO-Mas | Salina | n=8 | -2.3 ± 0.43 | 13 ± 3 |
| | Ang II | n=14 | 36 ± 4*** | -158 ± 21*** |

(***) Diferença significativa quando comparado ao grupo tratado com Salina (***) $p < 0.001$, Teste-*t* de Student).

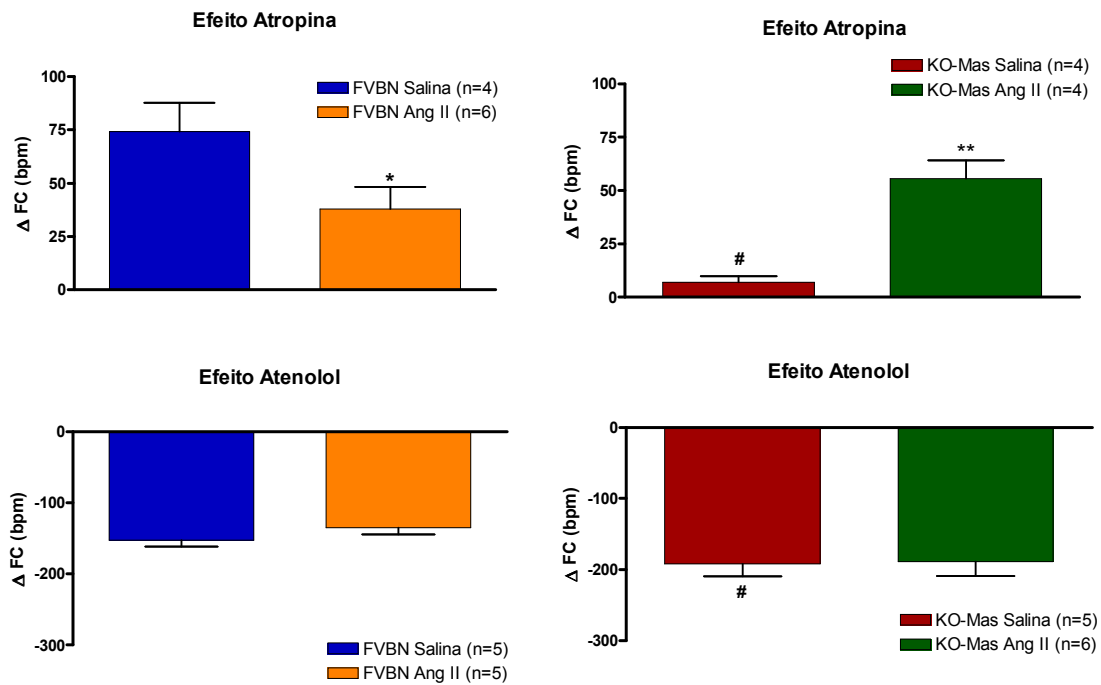


Figura 14 – Efeito produzido pela i.v. de Ang II (6 μ g/300 μ l/hora) ou Salina (300 μ l/hora) sobre as alterações na frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela injeção i.v. de atropina (1 mg/kg) ou de atenolol (1 mg/kg) em camundongos com deleção do receptor Mas da linhagem FVBN não anestesiados. (*) e (**) Diferença significativa em relação ao grupo tratado com Salina (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Teste- t de Student). (#) Diferença significativa em relação ao grupo controle (FVBN) submetido ao mesmo tratamento (# $p < 0.05$, Teste- t de Student).

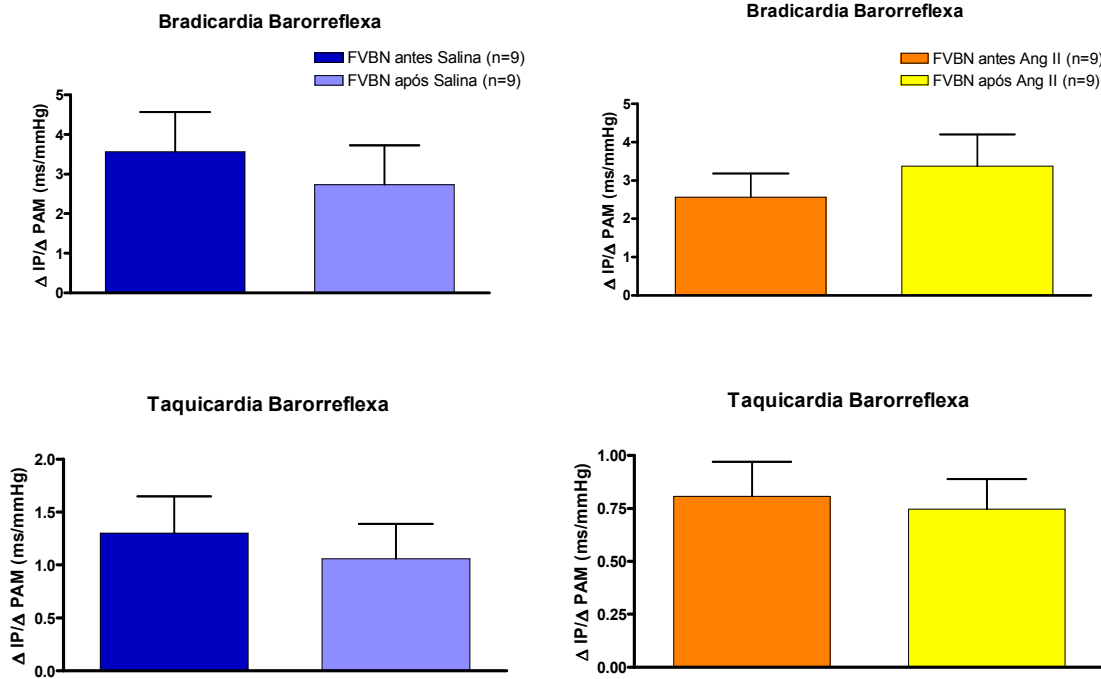


Figura 15 – Efeito da infusão i.v. de Ang II (6 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}/\text{hora}$) ou Salina (300 $\mu\text{l}/\text{hora}$) sobre a sensibilidade barorreflexa ($\Delta\text{IP}/\Delta\text{PAM}$, ms/mmHg) induzidas por injeções i.v. de FE (0.25 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e NPS (0.25 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) em camundongos controle da linhagem FVBN não anestesiados. (*) Diferença significativa em relação ao período controle (antes da infusão) (* $p < 0.05$, Teste- t de Student).

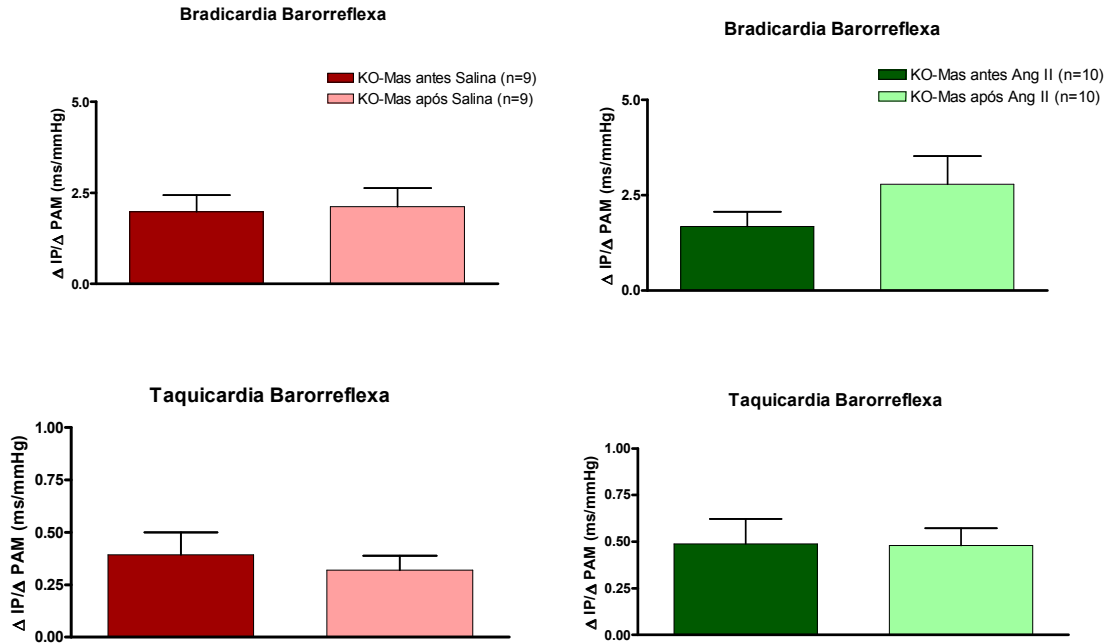


Figura 16 – Efeito da infusão i.v. de Ang II (6 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l/hora}$) ou Salina (300 $\mu\text{l/hora}$) sobre a sensibilidade barorreflexa ($\Delta\text{IP}/\Delta\text{PAM}$, ms/mmHg) induzidas por injeções i.v. de FE (0.25 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e NPS (0.25 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) em camundongos com deleção do receptor Mas da linhagem FVBN não anestesiados. (*) Diferença significativa em relação ao período controle (antes da infusão) (* $p < 0.05$, Teste- t de Student).

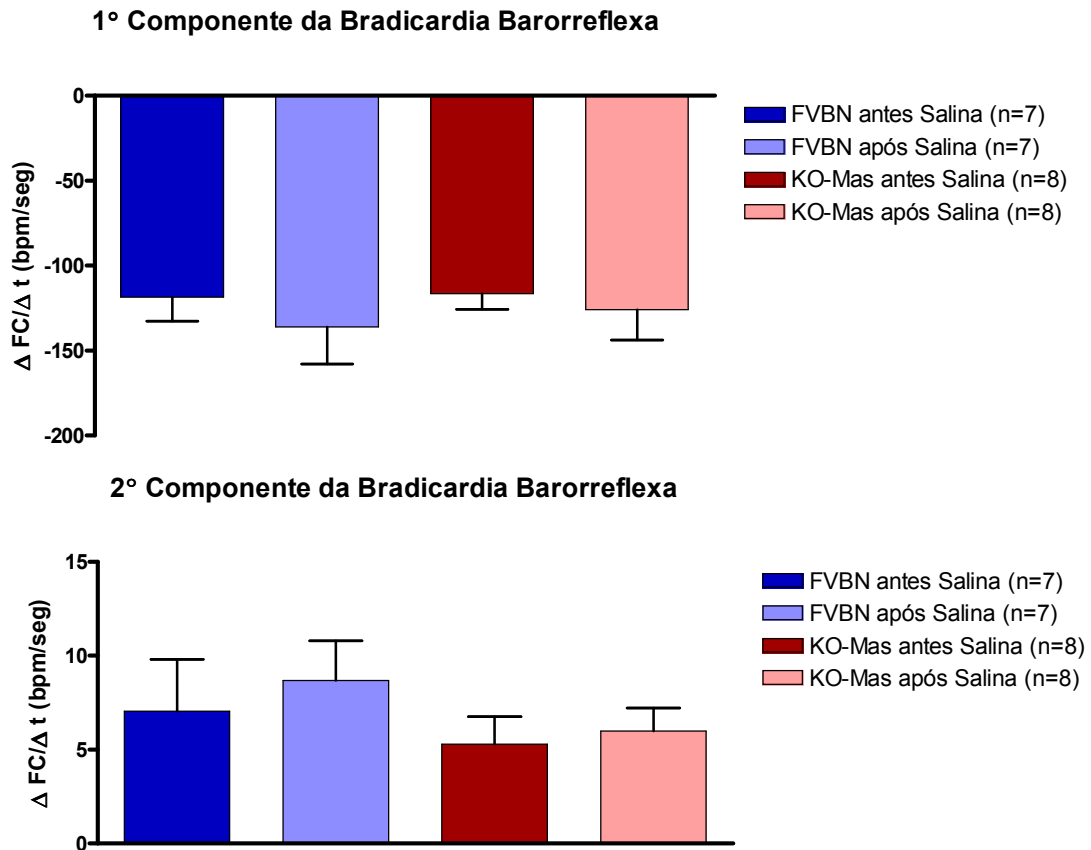


Figura 17 – Efeito da infusão i.v. de Salina (300 μ l/hora) sobre os componentes rápido (parassimpático) e lento (simpatoinibitório) da bradicardia barorreflexa ($\Delta FC/\Delta t$, bpm/seg) induzida pela injeção i.v. de FE (0.25 μ g/5 μ l) em camundongos com deleção do receptor Mas e controle da linhagem FVBN não anestesiados.

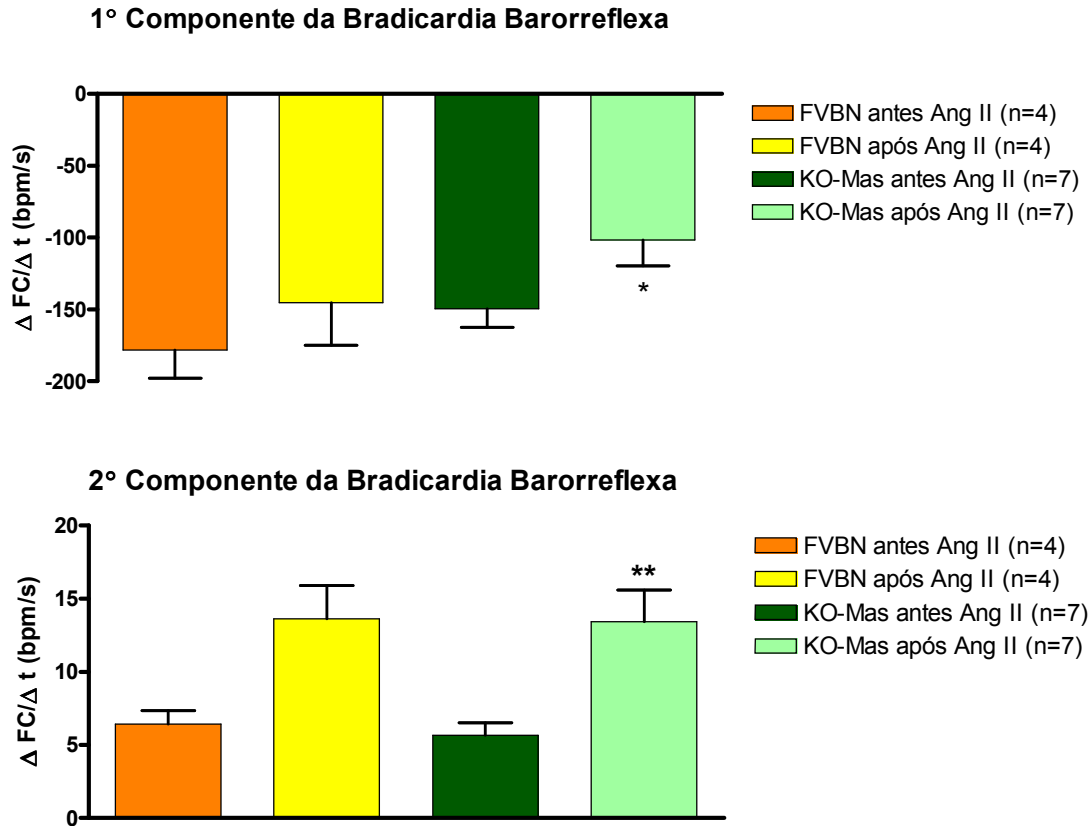


Figura 18 – Efeito da infusão i.v. de Ang II (6 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l/hora}$) sobre os componentes rápido (parassimpático) e lento (simpatoinibitório) da bradicardia barorreflexa ($\Delta\text{FC}/\Delta\text{t}$, bpm/seg) induzida pela injeção i.v. de FE (0.25 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) em camundongos com deleção do receptor Mas e controle da linhagem FVBN não anestesiados. (*) e (**) Diferença significativa em relação ao período controle (antes da infusão) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Teste- t de Student).

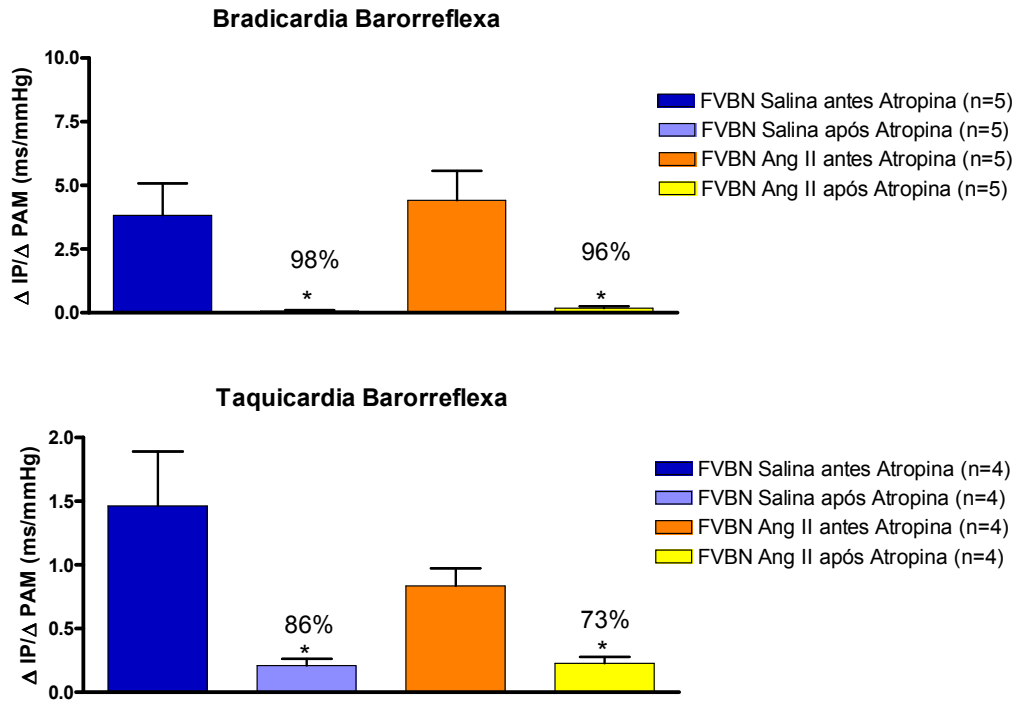


Figura 19 - Efeito do bloqueio parassimpático (Atropina – 33 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) durante a infusão i.v. de Ang II (6 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l/hora}$) ou Salina (300 $\mu\text{l/hora}$) sobre a sensibilidade barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg) induzidas por injeções i.v. de FE (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e NPS (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) em camundongos controle da linhagem FVBN não anestesiados. (*) Diferença significativa em relação ao período controle (antes da Atropina) (* $p < 0.05$, Teste-t de Student).

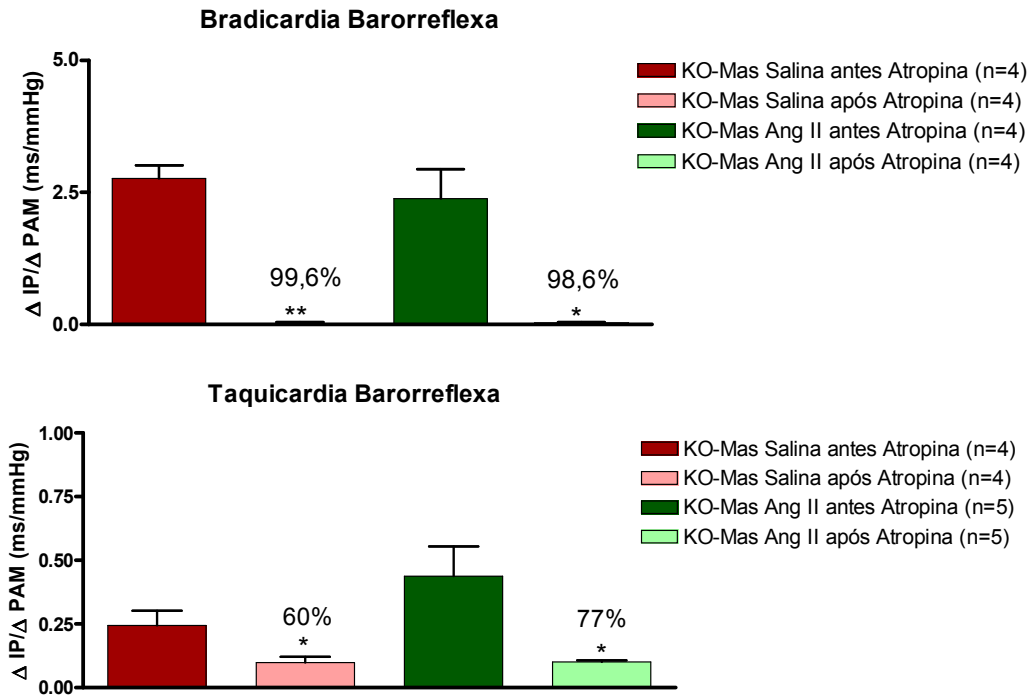


Figura 20 - Efeito do bloqueio parassimpático (Atropina – 33 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) durante a infusão i.v. de Ang II (6 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}/\text{hora}$) ou Salina (300 $\mu\text{l}/\text{hora}$) sobre a sensibilidade barorreflexa ($\Delta\text{IP}/\Delta\text{PAM}$, ms/mmHg) induzidas por injeções i.v. de FE (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e NPS (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) não anestesiados. (*) e (**) Diferença significativa em relação ao período controle (antes da Atropina) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Teste-t de Student).

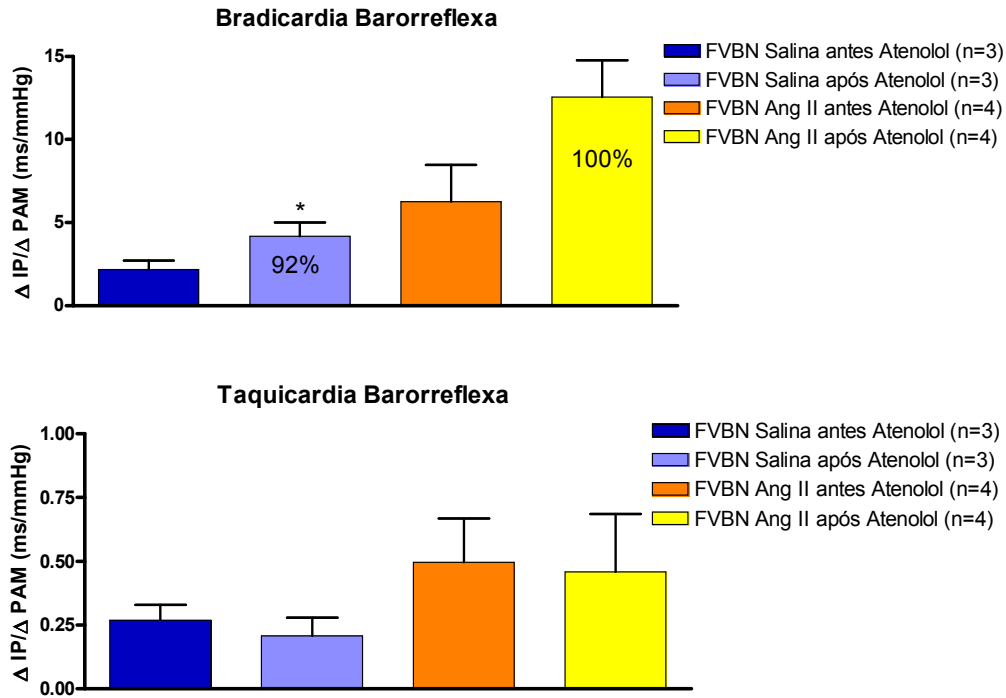


Figura 21 - Efeito do bloqueio simpático (Atenolol – 33 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) durante a infusão i.v. de Ang II (6 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l/hora}$) ou Salina (300 $\mu\text{l/hora}$) sobre a sensibilidade barorreflexa ($\Delta\text{IP}/\Delta\text{PAM}$, ms/mmHg) induzidas por injeções i.v. de FE (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e NPS (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) em camundongos controle (FVBN) não anestesiados. (*) Diferença significativa em relação ao período controle (antes da Atenolol) (* $p < 0.05$, Teste- t de Student).

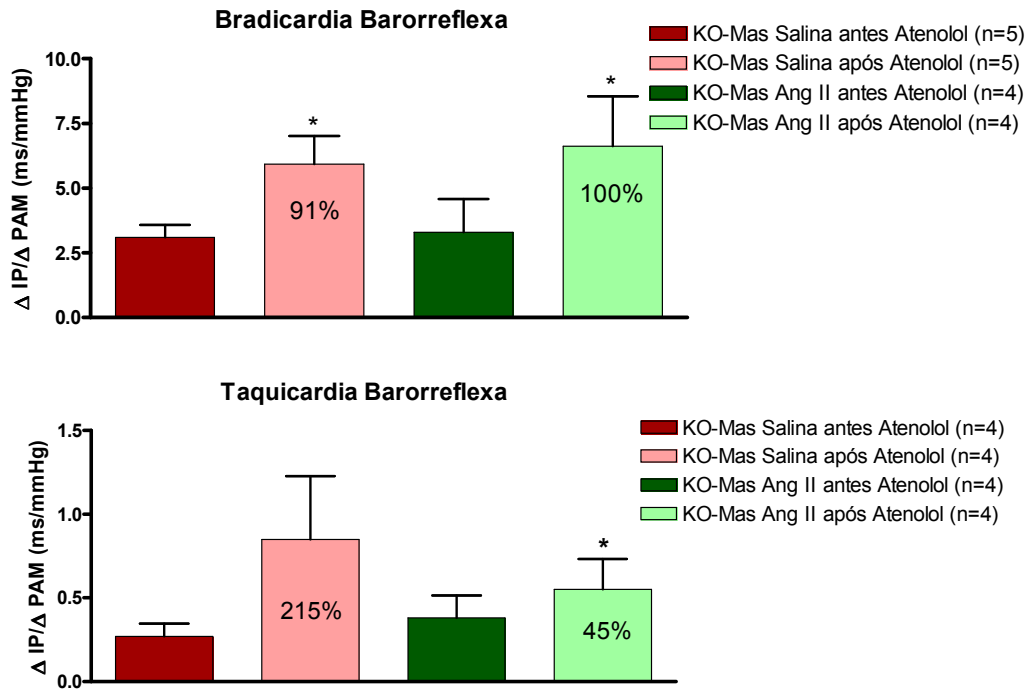


Figura 22 - Efeito do bloqueio simpático (Atenolol – 33 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) durante a infusão i.v. de Ang II (6 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}/\text{hora}$) ou Salina (300 $\mu\text{l}/\text{hora}$) sobre a sensibilidade barorreflexa ($\Delta\text{IP}/\Delta\text{PAM}$, ms/mmHg) induzidas por injeções i.v. de FE (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e NPS (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) em camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) não anestesiados. (*) Diferença significativa em relação ao período controle (antes da Atenolol) (* $p < 0.05$, Teste- t de Student).

4.5 - *Avaliação dos parâmetros cardiovasculares basais, da sensibilidade barorreflexa e dos efeitos da infusão ICV do antagonista da Ang-(1-7), A-779 sobre estes parâmetros em camundongos da linhagem FVBN com superexpressão do receptor Mas no cérebro (NSE-Mas) não anestesiados:*

Avaliamos ainda, pela primeira vez, uma linhagem de camundongos transgênicos, com superexpressão do receptor Mas no cérebro (NSE-Mas). Quando comparamos os parâmetros cardiovasculares basais, observamos que os camundongos NSE-Mas apresentam PAM mais elevada (116 ± 3 vs. 109 ± 2 , mmHg) quando comparados aos camundongos controle. Com relação aos valores basais de FC, não observamos nenhuma diferença significativa entre os camundongos NSE-Mas (648 ± 13 vs. 641 ± 18 bpm) e o respectivo grupo controle (figura 23, tabela 44 e 45).

Quando avaliamos a sensibilidade barorreflexa induzida pela injeção i.v. de FE nos animais NSE-Mas, observamos pela primeira vez, uma exacerbação significativa na bradicardia barorreflexa (2.03 ± 0.33 vs. 1.3 ± 0.14 ms/mmHg) nesses animais quando comparados aos camundongos controle (figura 24, tabela 46). No que diz respeito à resposta de taquicardia barorreflexa induzida pela injeção i.v. de NPS (1.12 ± 0.3 vs. 0.80 ± 0.13 ms/mmHg) não observamos alterações significativas nos camundongos NSE-Mas quando comparados aos camundongos controle não anestesiados (figura 24, tabela 47).

Durante a infusão intracerebroventricular (ICV) do antagonista de Ang-(1-7), A-779 ($2 \text{ nmol}/2 \mu\text{l/hora}$) ou de solução Salina ($2 \mu\text{l/hora}$) não observamos alterações significativas nos parâmetros cardiovasculares PAM e FC em nenhum dos grupos de animais avaliados (tabela D).

Para tentar elucidar o mecanismo envolvido nas alterações observadas na resposta de bradicardia barorreflexa nos camundongos NSE-Mas, realizamos infusão

ICV do antagonista da Ang-(1-7), A-779 (2 nmol/2 μ l/hora), nesses animais e no respectivo grupo controle. Observamos, de maneira interessante, que a infusão ICV do antagonista A-779 produziu uma redução significativa da resposta de bradicardia (1.17 ± 0.14 vs. 1.92 ± 0.37 ms/mmHg) e de taquicardia (0.37 ± 0.05 vs. 0.58 ± 0.05 ms/mmHg) barorreflexas nos camundongos controle FVBN (figura 25, tabelas 48 e 49). Nos camundongos NSE-Mas, a infusão ICV do antagonista A-779, não produziu alterações significativas nas respostas bradicárdica (1.70 ± 0.45 vs. 1.87 ± 0.38 ms/mmHg) e taquicárdica (0.49 ± 0.11 vs. 0.94 ± 0.32 ms/mmHg) reflexas nos camundongos com superexpressão do receptor Mas no cérebro (NSE-Mas) (figura 26, tabelas 50 e 51). A infusão ICV de Salina (2 μ l/hora) não produziu alterações nas respostas bradicárdicas e taquicárdicas barorreflexas em nenhum dos grupos avaliados (figura 25 e 26, tabelas 48 a 51).

Tabela D – Alterações na PAM (mmHg) e FC (bpm) em camundongos FVBN e NSE-Mas conscientes, submetidos a infusão ICV do antagonista da Ang-(1-7), A-779 (2 nmol/2µl/hora) e de Salina (2 µl/hora):

| Grupo | Droga | N | Δ PAM (mmHg) | Δ FC (bpm) |
|--------------|--------------|----------|---------------------|-------------------|
| FVBN | Salina | n=3 | -3 ± 0.5 | 42 ± 26 |
| | A-779 | n=6 | -6 ± 3 | 14 ± 38 |
| NSE-Mas | Salina | n=3 | 0.3 ± 7 | 9 ± 4 |
| | A-779 | n=5 | -0.2 ± 0.8 | 46 ± 10* |

(*) Diferença significativa em relação ao grupo tratado com salina. (* $p < 0.05$, Teste- t de Student).

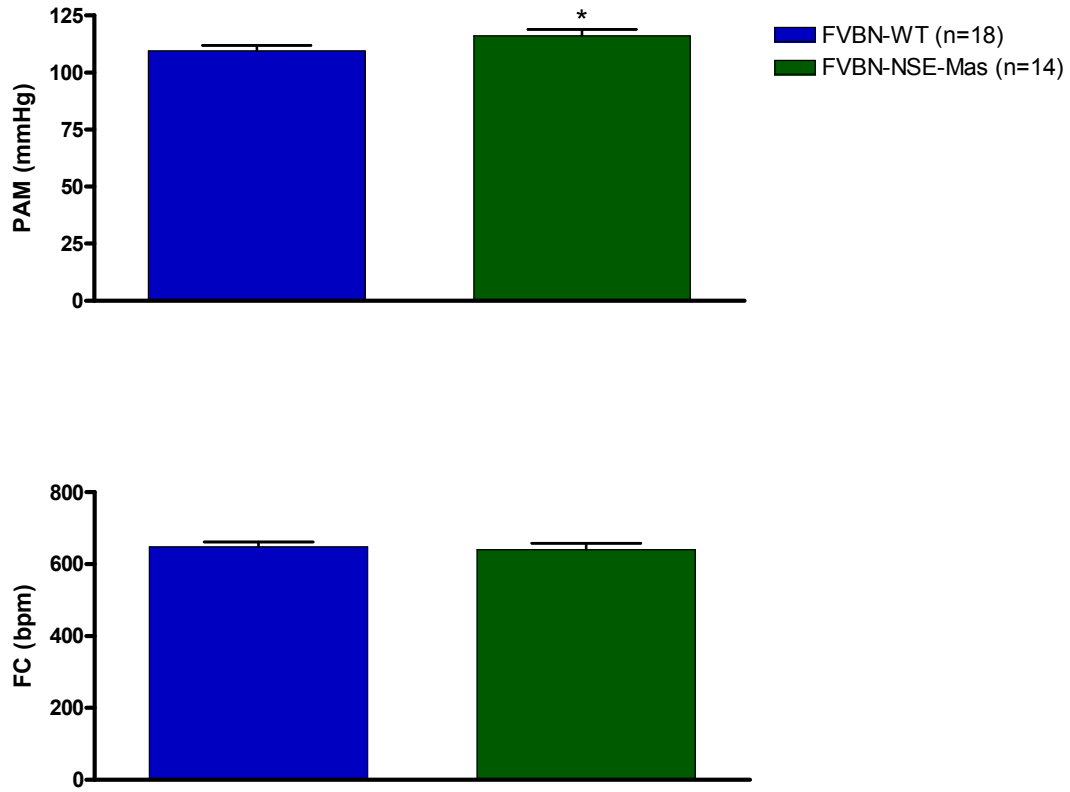


Figura 23 – Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) dos camundongos com superexpressão do receptor Mas (NSE-Mas) e dos camundongos controle (FVBN) não anestesiados. (*) Diferença significativa em relação ao controle (* $p < 0.05$, Teste- t de Student).

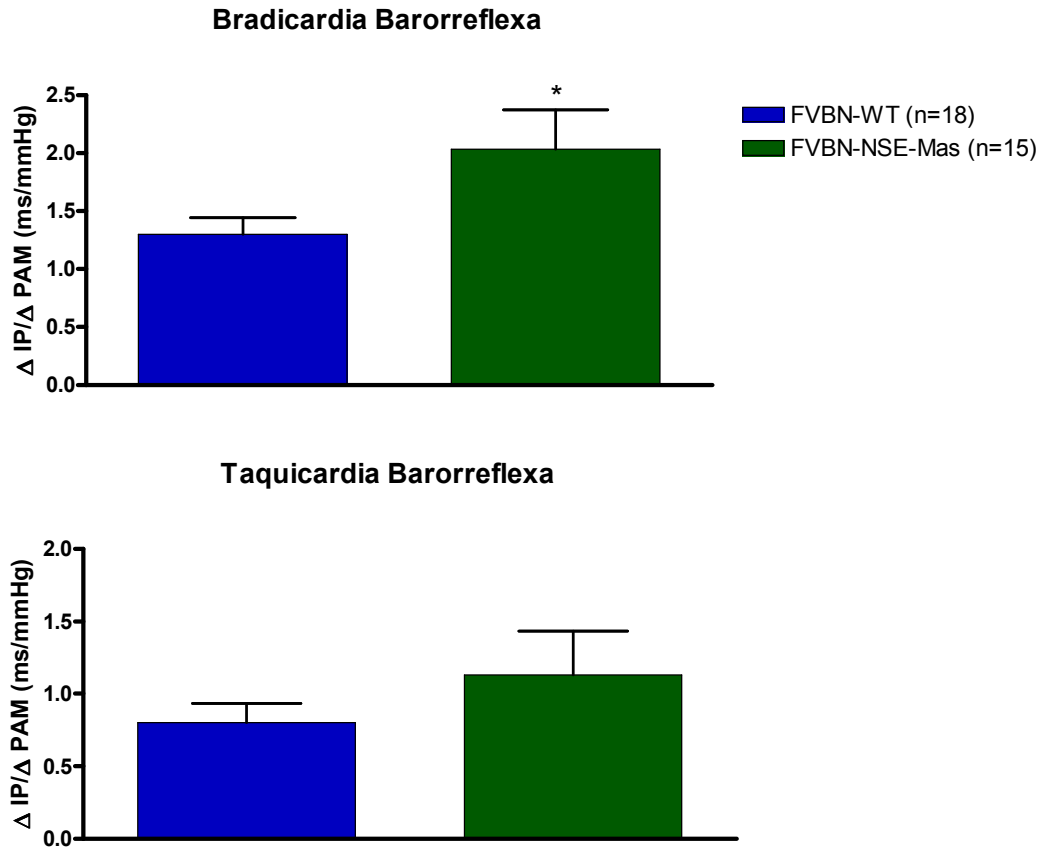


Figura 24 – Sensibilidade barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg) induzidas por injeções i.v. de FE (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e NPS (0.25-0.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) em camundongos com superexpressão do receptor Mas (NSE-Mas) e camundongos controle da linhagem FVBN não anestesiados. (*) Diferença significativa em relação ao grupo controle. (* $p < 0.05$, Teste-*t* de Student).

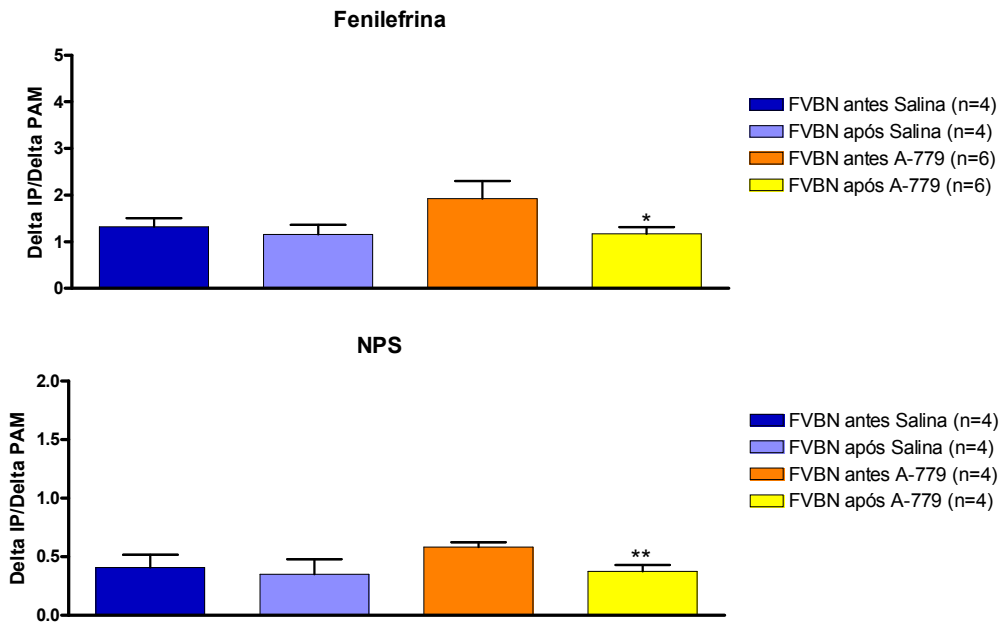


Figura 25 – Efeito da infusão ICV de A-779 (2 nmol/2 μ l/hora) ou Salina (2 μ l/hora) sobre a sensibilidade barorreflexa (Δ IP/ Δ PAM, ms/mmHg) induzidas por injeções i.v. de FE (0.25-0.5 μ g/5 μ l) e NPS (0.25-0.5 μ g/5 μ l) em camundongos controle da linhagem FVBN não anestesiados. (*) e (**) Diferença significativa em relação ao período controle (antes da infusão) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Teste- t de Student).

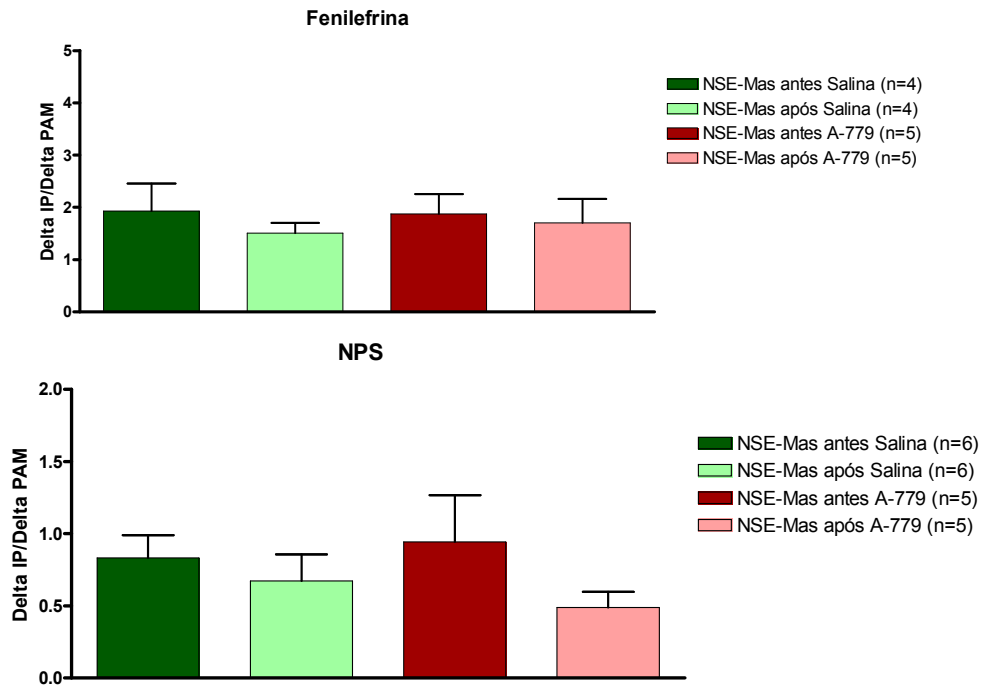


Figura 26 – Efeito da infusão ICV de A-779 (2 nmol/2 μ l/hora) ou Salina (2 μ l/hora) sobre a sensibilidade barorreflexa (Δ IP/ Δ PAM, ms/mmHg) induzidas por injeções i.v. de FE (0.25-0.5 μ g/5 μ l) e NPS (0.25-0.5 μ g/5 μ l) em camundongos com superexpressão do receptor Mas no cérebro (NSE-Mas) não anestesiados.

5 – DISCUSSÃO:

Neste estudo, utilizando modelos de camundongos submetidos à manipulação genética do receptor da Ang-(1-7), Mas, demonstramos que este receptor está envolvido de forma importante na modulação das respostas cardiovasculares reflexas. Os principais resultados obtidos nesse estudo foram: 1) a deleção do receptor da Ang-(1-7), Mas, reduz a sensibilidade barorreflexa, enquanto a superexpressão deste receptor no cérebro, aumenta a sensibilidade barorreflexa; 2) a deleção do receptor da Ang-(1-7), Mas, reduz as respostas reflexas induzidas pela estimulação do reflexo de Bezold-Jarisch, e potencia a bradicardia do quimiorreflexo. Ainda, demonstramos que o receptor da Ang-(1-7), Mas, participa da manutenção tônica dos níveis basais de PAM, participa da modulação dos efeitos cardiovasculares promovidos pela Ang II e que a deleção deste receptor promove alterações nos componentes autonômicos simpático e parassimpático cardíacos.

Nos últimos anos, os recentes avanços nas técnicas de biologia molecular e genética transformaram os camundongos em animais experimentais indispensáveis para estudos fisiológicos. Seu tamanho pequeno, contudo, muitas das vezes torna difícil a realização da mensuração de variáveis fisiológicas *in vivo* e requer um repertório de imaginação para adaptações em protocolos experimentais (Rao e Verkman, 2000; Ishii e cols., 2001; Janssen e Smits, 2002). As mutações gênicas em camundongos têm aberto uma infinidade de oportunidades para o estudo do papel fisiológico e fisiopatológico de qualquer proteína reguladora ou funcional em animais intactos (Lorenz, 2002). Apesar disso, existem hoje, relativamente poucos estudos funcionais *in vivo* em camundongos, sendo isso devido em parte às dificuldades técnicas associadas ao tamanho pequeno do animal e à falta de dados básicos a respeito dos procedimentos anestésicos e dos parâmetros fisiológicos normais nesses

animais. Como exemplo, os tradicionais métodos para estudos fisiológicos de canulação de ductos e órgãos para infusão e coleta de fluidos, procedimentos de rotina em animais de experimentação de maior porte, tornaram-se um incrível desafio atual na utilização de camundongos, como animais experimentais (Rao e Verkman, 2000).

Há uma grande preocupação em relação à realização de anestesia e cirurgias em camundongos, incluindo o desafio em que se transformou a monitorização rotineira dos parâmetros cardiovasculares e análise dos gases sanguíneos durante a anestesia, além dos riscos da própria anestesia. Uma perda sanguínea de aproximadamente 300 µl em um camundongo adulto pode produzir choque hipovolêmico (Rao e Verkman, 2000). Um ponto relevante a destacar, é que um camundongo não é simplesmente um rato pequeno, e cuidados especiais têm que ser tomados para resistirmos ao impulso de comparar diretamente dados de camundongos com dados de ratos (Janssen e Smits, 2002; Lorenz, 2002).

Um dos desafios iniciais na manipulação de camundongos é sem dúvida a escolha do anestésico. Os estudos disponíveis na literatura destacam uma variedade de anestésicos disponíveis e a importância de se adequar o tipo de anestésico utilizado aos objetivos do experimento e técnicas cirúrgicas empregadas. Camundongos anestesiados são particularmente vulneráveis à hipotermia, provavelmente por conta de sua alta taxa metabólica e relação área de superfície corporal por massa corporal. Assim, a temperatura corporal precisa ser constantemente monitorizada e cuidadosamente regulada (Rao e Verkman, 2000; Lorenz, 2002; Janssen e cols., 2004).

Sabe-se ainda que os anestésicos podem influenciar, em diversos graus, os parâmetros basais do sistema cardiovascular, assim como sua responsividade à ativação exógena ou endógena. O anestésico uretana proporciona um período prolongado e estável de anestesia, e em comparação a outros anestésicos, produz

uma condição cirúrgica caracterizada por alto grau de atividade do sistema nervoso autônomo no controle das variáveis cardiovasculares. Isso é sustentado pela observação de que a administração de drogas que bloqueiam a função autonômica (atropina, hexametônio, propranolol ou fentolamina) em animais anestesiados com uretana produz variações rápidas e acentuadas na FC, PA e contratilidade cardíaca (Maggi e Meli, 1986 a, b).

Em nossa primeira seqüência de experimentos e durante a padronização da técnica de canulação de vasos periféricos (artéria femoral e veia jugular) para registro contínuo dos parâmetros cardiovasculares e administração de drogas, respectivamente, utilizamos uretana como anestésico. Como descrito acima, podemos observar pelos valores basais de PAM (97 ± 2 mmHg) e FC (616 ± 15 bpm) em camundongos C57BL6J, que realmente, o efeito da uretana sobre os parâmetros cardiovasculares apresentou-se bastante reduzido. Ainda, a partir da utilização deste anestésico, que permite um período bastante prolongado e estável de anestesia, pudemos monitorizar a pressão pulsátil dos animais por períodos contínuos de até 2 horas, avaliando os reflexos cardiovasculares através da injeção de diversas drogas com tranqüilidade. Realmente, o maior inconveniente observado durante a anestesia com uretana em camundongos foi a hipotermia, que controlamos a partir da monitorização contínua da temperatura retal, e aquecimento do animal através de colchonete térmico.

Com os procedimentos cirúrgicos adequados e uma eficiente monitorização dos parâmetros cardiovasculares, iniciamos o estudo em camundongos com alteração da expressão gênica do receptor funcional da Ang-(1-7), receptor Mas. Avaliamos as variáveis cardiovasculares basais e o padrão das respostas cardiovasculares reflexas nesses animais e em seus respectivos controles sob anestesia com uretana.

A deleção gênica pode produzir alterações compensatórias complexas envolvendo o desenvolvimento de órgãos e a expressão de outras proteínas (Rao e Verkman, 2000). Apesar disso, os animais com deleção do receptor Mas são saudáveis, crescem normalmente e não demonstram anormalidades óbvias no desenvolvimento, e também não apresentam diferenças em relação ao mecanismo da sede (Walther, 1998). Com relação aos parâmetros cardiovasculares, Walther e cols. (2000) avaliaram a variabilidade da FC e PA em camundongos KO-Mas e observaram alterações como redução na variabilidade da FC. No entanto, os dados são questionáveis uma vez que parâmetros essenciais como anestesia empregada (tiopental – FC ~ 300 bpm), frequência de amostragem (250 Hz) durante a coleta dos dados, além de número restrito de animais avaliados por grupo experimental, podem ter influenciado os dados apresentados no estudo.

O efeito da Ang-(1-7) sobre a PAM ainda não é claro e dados sugerem que os efeitos sistêmicos deste peptídeo podem ser diferentes dependendo do alvo estudado e dependendo do modelo experimental utilizado (Roks e cols., 1999). A Ang-(1-7) possui efeitos cardiovasculares benéficos agindo direta ou indiretamente através da potenciação da bradicinina ou pela contra-regulação das ações da Ang II (Ferreira e Santos, 2005). Os efeitos dos inibidores da ECA podem ser parcialmente mediados pelo aumento dos níveis de Ang-(1-7) durante a administração desta classe de drogas (Chappell e cols., 1998; Roks e cols., 1999; Santos e cols, 2000) e este heptapeptídeo contribui para os efeitos hipotensores durante o tratamento crônico com antagonistas do receptor AT₁ da Ang II, losartan, em ratos normais (Collister e cols., 2003). A Ang-(1-7) apresenta potente efeito na distribuição do fluxo sanguíneo e hemodinâmica sistêmica. A infusão de Ang-(1-7) em doses baixas (110 fmol/min) em ratos produz importantes alterações no fluxo sanguíneo regional, diminuindo a resistência periférica vascular em diferentes territórios (mesentério, cérebro, pele e rins). Alterações opostas

ocorrem no débito cardíaco, provavelmente por conta do aumento do retorno venoso decorrente de vasodilatação em diversos leitos periféricos, o que pode explicar a ausência de alterações substanciais na pressão arterial durante a administração i.v. de Ang-(1-7) (Sampaio e cols., 2003).

Durante a monitorização da pressão arterial, a partir da canulação da artéria femoral em camundongos anestesiados, não observamos alterações significativas nos valores de PAM entre animais KO-Mas e controle (C57BL6J). Apesar disso, não podemos desconsiderar a contribuição do heptapeptídeo Ang-(1-7) para a manutenção dos níveis basais de PA, uma vez que este peptídeo promove alterações regionais diferentes nos vários leitos vasculares, retorno venoso e débito cardíaco, como descrito anteriormente. Ainda, trata-se de um animal com deleção gênica de uma proteína e respostas compensatórias a essa alteração não podem ser descartadas.

Atualmente, a Ang-(1-7) é considerada uma parte do SRA no coração. Suas ações incluem alterações bioquímicas e funcionais levando a vasodilatação coronariana e melhora da função cardíaca (Ferreira e cols., 2005). Esta função é evidente em estudo utilizando ratos transgênicos [TGR(A1-7)3292]. Esses animais, que apresentam concentração plasmática de Ang-(1-7) 2.5 vezes aumentada, são significativamente mais resistentes que animais controles à indução de hipertrofia cardíaca por isoproterenol, e ainda apresentam uma redução na duração das arritmias de reperfusão e melhora na função cardíaca pós-isquemia em corações isolados (Santos e cols., 2004). Outra evidência da função cardioprotetora da Ang-(1-7) foi apresentada em um estudo com coração isolado de camundongos com deleção do receptor Mas, demonstrando uma importante alteração na função cardíaca nestes animais. A tensão sistólica, (dT/dt) e a FC encontram-se diminuídas e a resistência vascular coronariana aumentada (Castro e cols., 2004).

Apesar das evidentes ações cardioprotetoras descritas para a Ang-(1-7), não observamos diferenças entre os valores basais de FC e FC intrínseca dos camundongos KO-Mas e dos respectivos controles (C57BL6J) anestesiados com uretana. Como justificado anteriormente, provavelmente não observamos diferenças por conta de compensações desenvolvidas pelos animais com deleção do receptor Mas, já que um estudo recente de nosso grupo demonstrou que os camundongos KO-Mas apresentam importante prejuízo da função ventricular, provavelmente cursando com insuficiência cardíaca. Apesar disso, o estudo citado também não demonstrou diferenças significativas entre os valores basais de FC durante a avaliação por ecocardiografia em camundongos KO-Mas e controles (C57BL6J) anestesiados com halotano (Santos e cols., 2006).

A homeostase cardiovascular é controlada e coordenada por uma interação contínua de mecanismos neurais e humorais através de mecanismos de feedback negativo e positivo, dos quais se destacam o SRA. Aumentos da atividade nervosa simpática desempenham importante papel na patogênese da hipertensão arterial. Existem evidências de que a Ang-(1-7) exerce efeitos anti-hipertensivos e pode diminuir a atividade nervosa simpática, desempenhando importante ação neuromodulatória sobre este sistema centralmente, através da inibição da liberação de norepinefrina por um mecanismo relacionado à liberação de óxido nítrico, o qual por sua vez, mantém os níveis de norepinefrina circulantes (Gironacci e cols., 2004).

Nossos resultados demonstraram efeitos cardíacos diferentes produzidos pela administração dos bloqueadores β -adrenérgico (atenolol) e colinérgico (atropina) em camundongos KO-Mas e camundongos controle. O bloqueio β -adrenérgico promoveu uma bradicardia mais acentuada nos animais KO-Mas em relação aos animais controle (C57BL6J) anestesiados, apesar desta diferença não ter sido significativa ($p=0.0518$). Em adição, observamos que os camundongos KO-Mas apresentam tônus simpático

significativamente mais elevado quando comparados aos camundongos controle (tabela 4). Uma modificação no balanço autonômico a favor da atividade autonômica simpática já havia sido sugerida por Walther e cols. (2000), por análise da variabilidade da FC e PA, apesar de ter sido utilizada no estudo, uma frequência de amostragem relativamente baixa (250 Hz). Através de bloqueio farmacológico, demonstramos efetivamente que os camundongos KO-Mas apresentam atividade simpática cardíaca elevada, o que condiz com a hipótese de que a Ang-(1-7) poderia reduzir a atividade simpática, modulando a homeostase cardiovascular, como descrito por Gironacci e cols. (2004).

Durante o bloqueio colinérgico em camundongos anestesiados com uretana, não observamos a característica taquicardia evidenciada claramente em ratos e outras espécies de animais de experimentação. Para nossa surpresa, a administração de metilatropina (1 mg/kg) promoveu leve bradicardia ou nenhum tipo de alteração na FC. Consequentemente, na avaliação do tônus vagal, pela metodologia descrita por Negrão e cols., (1992), encontramos valores negativos, ao contrário do imaginado. Apesar disso, os dados sobre o efeito da atropina e tônus vagal não foram diferentes entre os animais controles (C57BL6J) e os animais com deleção do receptor Mas anestesiados com uretana (estudos preliminares em andamento no nosso laboratório, tabela 4). Os dados da literatura são escassos, mas também descrevem efeito praticamente nulo sobre a FC após administração de metilatropina em camundongos anestesiados (Desai e cols., 1997; Janssen e Smits, 2002). Outro ponto que poderia justificar essa ausência de efeito taquicárdico após bloqueio com metilatropina em camundongos seriam os valores já bastante elevados de FC intrínseca apresentados por estes animais. As evidências disponíveis até o momento, sugerem que os camundongos, diferente dos humanos, apresentam balanço autonômico cardíaco dominado pelo sistema nervoso

simpático, com apenas pequena contribuição do sistema nervoso parassimpático (Gehrmann e cols., 2000; Janssen e Smits, 2002).

Os mecanismos neuro-humorais de controle da PA resultam em alterações apropriadas do débito cardíaco, resistência periférica e do retorno venoso através da intervenção do SNC que, integrando as informações provenientes de diferentes sensores do sistema cardiovascular, modula a atividade cardíaca e vascular por meio de nervos autonômicos periféricos e da liberação de diferentes hormônios. A regulação neuro-hormonal da PA funciona como um arco-reflexo envolvendo receptores, aferências, centros de integração, eferências e efetores, além de alças hormonais.

O barorreflexo é um sistema de feedback negativo que mantém a pressão arterial dentro de limites estreitos constantemente. Em níveis normais de pressão arterial, os barorreceptores inibem tonicamente os efeitos simpáticos sobre os vasos sanguíneos e coração. Quando a pressão arterial é reduzida, a inibição tônica das respostas simpáticas é removida, assim sendo observado vasoconstrição e aumento da FC. Como parte deste mesmo reflexo, efeitos vagais sobre o coração são reduzidos, fornecendo adicional mecanismo para o aumento da FC (Franceschini e cols., 2000). A administração de fenilefrina, um agonista de receptores α_1 -adrenérgicos, resulta em imediata hipertensão e simultânea bradicardia reflexa, com o retorno dos valores de PA e FC para os níveis basais em aproximadamente 2 minutos em humanos e animais de grande porte. Essas respostas são qualitativamente preservadas em camundongos (Desai e cols., 1997; Ishii e cols., 2001, Janssen e Smits, 2002; Ma e cols., 2002).

A participação do SRA na modulação das respostas cardiovasculares reflexas tem sido evidenciada a partir da bem descrita ação inibitória da Ang II sobre o barorreflexo. Diversos estudos utilizando diferentes modelos de hipertensão arterial em cães, coelhos e ratos, tanto após administração periférica quanto central ilustram tal efeito. A Ang II estaria envolvida tanto no deslocamento da faixa de funcionamento dos

barorreceptores (alteração do *set point*) quanto na redução do ganho do controle barorreflexo. Interessantemente, o efeito da Ang II sobre o barorreflexo independe da elevação da PA causada por esse peptídeo, indicando que o efeito da Ang II sobre o barorreflexo deve ser exercido por ação central (Averill e Diz, 2000; Campagnole-Santos e Haibara, 2001; Santos e cols., 2005). Ainda, Luoh e Chan (1998) demonstraram que a ação da Ang II tanto via receptor AT₁, quanto via receptor AT₂, exerce ação modulatória inibitória tônica sobre a função barorreflexa.

A manipulação genética em camundongos tem auxiliado no esclarecimento da modulação desempenhada pelo SRA sobre o controle das funções cardiovasculares. Por exemplo, foi recentemente observado que animais KO-AT₁ são hipotensos, apresentam desbalanço autonômico com observação de aumento da atividade simpática eferente, FC intrínseca reduzida e, com a metodologia empregada (análise espectral), não foi observada alteração na sensibilidade barorreflexa (Chen e cols., 2005). Já os camundongos KO-AT₂, são hipertensos, apresentam um aumento da sensibilidade barorreflexa espontânea, aumento da expressão de receptores AT₁ nos rins e coração. A partir do estudo destes animais levantou-se uma discussão a respeito de uma possível ação contra-regulatória dos receptores AT₁/AT₂ na modulação barorreflexa (Gross e cols., 2002, 2004), o que contrasta com a observação anterior, em ratos, de que ambos receptores AT₁ e AT₂ desempenham ação modulatória inibitória sobre a função barorreflexa, agindo em sinergismo (Luoh e Chan 1998).

Em nosso estudo observamos diferenças significativas entre a bradicardia e a taquicardia barorreflexas induzidas pela injeção i.v. de fenilefrina (FE) e nitroprussiato de sódio (NPS) em camundongos KO-Mas. A ativação da eferência simpática e a redução da eferência parassimpática, pelo menos no coração, em resposta à diminuição e aumento da pressão arterial com FE e NPS parecem ser influenciadas pela deleção genética do receptor Mas, em camundongos. Sabe-se que peptídeos

angiotensinérgicos interferem na modulação das respostas barorreflexas. A Ang-(1-7), particularmente, quando administrada intracerebroventricularmente (ICV) (Campagnole-Santos e cols., 1992 Oliveira e cols., 1996; Britto e cols., 1997; Oliveira e cols., 1998) ou no núcleo do trato solitário (NTS) (Chavez e cols., 2000) facilita o componente bradicárdico do barorreflexo. No entanto, após a infusão i.v. de Ang-(1-7) não se observa alterações na sensibilidade barorreflexa quer para aumentos quer para diminuições da PAM, demonstrando que este peptídeo modula o controle barorreflexo através de elementos neuronais dentro do SNC que participam da regulação barorreceptora (Campagnole-Santos e cols., 1992).

Apesar de diversos estudos demonstrarem que os efeitos dos peptídeos angiotensinérgicos sobre a modulação barorreflexa, nosso estudo foi o primeiro a demonstrar o efeito da Ang-(1-7) na modulação barorreflexa em camundongos. Observamos importantes alterações: redução da bradicardia barorreflexa e aumento da taquicardia barorreflexa em camundongos KO-Mas quando comparados aos camundongos controles (C57BL6J) anestesiados com uretana. Nossos dados sugerem que a Ang-(1-7) pode alterar os efeitos parassimpáticos sobre o coração (bradicardia e taquicardia) à estimulação barorreflexa. Ainda, sugerem que a Ang-(1-7) pode aumentar a atividade autonômica parassimpática e talvez reduzir a atividade autonômica simpática, sendo que na ausência do receptor Mas, esta modulação parece estar alterada. Essa hipótese está de acordo com a observação descrita acima de que os camundongos KO-Mas anestesiados com uretana apresentam tônus simpático aumentado em relação aos camundongos controles (C57BL6J) na mesma condição experimental. Dessa forma, parece evidente que a Ang-(1-7) é um importante modulador da atividade eferente simpática e parassimpática.

Os reflexos cardiopulmonares também contribuem para a homeostase cardiovascular. São ativados via alterações na pressão de enchimento cardíaco

(reflexo volume-sensível) e estimulação química (reflexo quimiossensível). Há poucos estudos sobre o envolvimento do SRA na modulação deste reflexo, mas existem algumas evidências de que em situações de prejuízo da sensibilidade a volume de enchimento cardíaco, este reflexo pode ser restaurado pelo tratamento com inibidores da ECA (Uggere e cols., 2000). Nosso estudo foi o primeiro a avaliar a participação da Ang-(1-7), particularmente do receptor Mas, na modulação das respostas reflexas induzidas pela estimulação química dos receptores cardiopulmonares.

O Reflexo de Bezold-Jarisch é iniciado pela estimulação de receptores quimiossensíveis e mecanossensíveis na parede do ventrículo esquerdo. As vias aferentes consistem em fibras amielínicas ou fibras-C que correm via nervo vago para núcleos no tronco encefálico relacionados ao controle das funções cardiovasculares (NTS). A via eferente envolve bradicardia vagal e redução do tônus simpático. Estudos de Whorlow e cols., (1998) e Sever e cols., (2001) indicam que a Ang II pode atenuar os componentes hipotensor e vagal do reflexo de Bezold-Jarisch. Hipotensão profunda e bradicardia têm sido observadas em homens submetidos à infusão de inibidores da renina e atribui-se este efeito a uma exacerbação do reflexo de Bezold-Jarisch (Semple e cols., 1988). Mecanismo similar pode contribuir para a resposta hipotensora à primeira dose de inibidores da ECA durante o tratamento de insuficiência cardíaca. No tratamento com bloqueadores de receptores AT₁ pelo antagonista candesartan ocorre remoção da modulação desempenhada pela Ang II sobre o reflexo de Bezold-Jarisch e observa-se reação vago-vagal (Sever e cols., 2001).

Nossos resultados mostram que os camundongos com deleção do receptor Mas apresentaram resposta à estimulação do reflexo de Bezold-Jarisch (reflexo quimiossensível) significativamente alterada. As respostas hipotensora e bradicárdica, evidenciadas pela estimulação deste reflexo, se encontram diminuídas nos camundongos KO-Mas quando comparados aos respectivos controles (C57BL6J)

anestesiados. Todas as informações acima a respeito da possível contribuição da Ang II na modulação do reflexo de Bezold-Jarisch são consistentes com nossos resultados em camundongos KO-Mas. Se a Ang II tem um efeito atenuador sobre este reflexo, é possível que a Ang-(1-7) desempenhe efeitos opostos. Assim, camundongos KO-Mas demonstraram uma significativa atenuação do reflexo de Bezold-Jarisch, provavelmente por conta de alterações na atividade eferente cardíaca simpática e parassimpática induzidas pela ausência de modulação pela Ang-(1-7) via receptor Mas. Esta pode ser mais uma evidência, (ainda que indireta) que reforça a idéia de que a Ang-(1-7) exerce ações contra-regulatórias às ações da Ang II na modulação das respostas cardiovasculares reflexas.

Importante ainda, é ressaltar a existência de estudos da literatura que demonstram, por exemplo, que ratos com insuficiência cardíaca devido a infarto agudo do miocárdio (Meyrelles e cols., 1997), apresentam prejuízo da resposta à estimulação deste reflexo, provavelmente decorrente de alterações morfológicas no ventrículo esquerdo que poderiam comprometer a aferência vagal de tal reflexo. Como citamos anteriormente, os animais KO-Mas apresentam quadro condizente com insuficiência cardíaca e esta também poderia ser a explicação para a observação de atenuação das respostas hipotensora e bradicárdica do reflexo de Bezold-Jarisch nos animais KO-Mas em condições basais.

Complementando os mecanismos de controle reflexo da PA, destaca-se o quimiorreflexo, que participa de forma importante no controle da circulação e desempenha papel único na produção integrada de ajustes ventilatórios e cardiovasculares. Os quimiorreceptores periféricos do corpúsculo carotídeo desempenham uma função chave na detecção de alterações químicas no sangue arterial, promovendo então, ajustes respiratórios e cardiovasculares. Por exemplo, quando há redução na pressão de oxigênio do sangue arterial abaixo de 50 mmHg,

observa-se um aumento exponencial na atividade do nervo carotídeo. Esta informação excita os neurônios do NTS, os quais são a primeira estação sináptica no bulbo das informações viscerais. Isto resulta em elevação da atividade central e atividade nervosa eferente, aumentando a ventilação, a pressão arterial e a redistribuição do fluxo sanguíneo (Leung e cols., 2003). As alterações nos quimiorreceptores carotídeos causadas por hipóxia prolongada estão relacionadas com um remodelamento estrutural incluindo aumento da vasculatura, hipertrofia e hiperplasia das células glomais, assim como modificações funcionais, tais como síntese e liberação de catecolaminas. Estudos têm demonstrado que os níveis circulantes de Ang II também podem modificar os níveis de atividade basal do corpúsculo carotídeo. Há evidências sugerindo que os receptores AT₁ da Ang II nas células quimiossensíveis são responsáveis pelos efeitos da Ang II sobre o corpúsculo carotídeo. Existem evidências de que a Ang II pode diretamente modular a excitabilidade dos quimiorreceptores. Este efeito excitatório da Ang II sobre as células glomais pode aumentar a quimiossensibilidade. (Leung e cols., 2003). Hipoxemia pós-natal está associada com aumento da sensibilidade dos quimiorreceptores periféricos à Ang II e aumento da expressão de receptores AT₁ que medeiam a atividade dos quimiorreceptores (Fung e cols., 2002). Ainda, a microinjeção de Ang II no NTS aumenta a bradicardia quimiorreflexa, sendo este efeito revertido pela microinjeção do antagonista de receptor AT₁ da Ang II, losartan (Paton e Kasparov, 1999; Rocha e cols., 2003). Estes dados da literatura sugerem uma importante participação do SRA, principalmente da Ang II, na modulação da resposta quimiorreflexa.

Nosso estudo demonstrou que as respostas quimiorreflexas também estão alteradas em camundongos KO-Mas. Observamos que a resposta pressora à estimulação quimiorreflexa encontra-se aumentada nos animais KO-Mas ($p=0.0556$) anestesiados quando comparados aos camundongos controles (C57BL6J). De forma

mais expressiva, a bradicardia quimiorreflexa encontra-se significativamente aumentada nos camundongos KO-Mas quando comparados aos respectivos animais controles (C57BL6J) anestesiados com uretana. Diz e cols. (2002) destacam em sua revisão que o efeito facilitatório a Ang II sobre a ativação do quimiorreflexo pode decorrer da ativação do sistema nervoso simpático no NTS.

Não existem estudos sobre o envolvimento do heptapeptídeo Ang-(1-7) na modulação quimiorreflexa. Contudo, se a Ang-(1-7) desempenha ações na maioria das vezes opostas às ações da Ang II, e se este último aumenta a atividade do quimiorreflexo, é possível que a Ang-(1-7) exerça efeito inibitório sobre a modulação quimiorreflexa. Assim, os camundongos KO-Mas poderiam apresentar um aumento da resposta quimiorreflexa devido à ausência da modulação da Ang-(1-7) sobre este reflexo. Nossos resultados sugerem que o efeito da Ang-(1-7) sobre o componente cárdio-vagal (bradicardia) dos diferentes reflexos não é inespecífico, uma vez que a deleção do receptor Mas resulta em atenuação da bradicardia barorreflexa e da bradicardia do reflexo de Bezold-Jarisch, ao mesmo tempo em que potencia a bradicardia do quimiorreflexo.

A manipulação dos genes que codificam os diferentes componentes do SRA, ou seja, renina, angiotensinogênio, ECA, receptores AT₁ e AT₂, produzem pronunciados efeitos sobre a homeostase cardiovascular. Uma das mais surpreendentes observações é a intensa hipotensão que ocorre quando o SRA é bloqueado pela deleção gênica da ECA (Krege e cols., 1995; Tian e cols., 1997) ou dos receptores da Ang II, subtipo AT₁ (Ito e cols., 1995; Sugaya e cols., 1995) em camundongos. O efeito hipotensor observado nesses animais é muito maior quando comparamos com o efeito da inibição farmacológica da ECA ou do bloqueio dos receptores AT₁, em cães e humanos. A explicação para esta diferença de magnitude das respostas hipotensoras observadas entre a deleção gênica e a inibição farmacológica não é clara. No entanto,

isso pode ser devido a maior sensibilidade do SRA em camundongos ou a diferenças entre a eficiência da manipulação gênica e farmacológica do SRA (Cholewa e cols., 2005).

Em nosso estudo, observamos respostas interessantes durante a infusão i.v. de Ang II em camundongos KO-Mas anestesiados. A infusão i.v. de Ang II promoveu resposta pressora e taquicardia tanto em camundongos KO-Mas quanto nos controles da linhagem C57BL6J anestesiados com uretana. No entanto, a magnitude das respostas observadas foi significativamente maior nos animais KO-Mas quando comparados aos animais controles. Estes dados ressaltam as ações contra-regulatórias da Ang II/Ang-(1-7) no controle da homeostase cardiovascular. A justificativa mais adequada para este resultado seria de que na ausência da oposição realizada pela Ang-(1-7) sobre as ações da Ang II, estas se apresentariam exacerbadas. Um estudo recente suporta esta hipótese, demonstrando que o receptor Mas exibe um antagonismo direto ao receptor AT_1 da Ang II *in vitro* e sugere a existência de uma interação oligomérica entre estes receptores (Kostenis e cols., 2005). Os autores destacam ainda que, esta interação pode representar um estado natural para estes receptores *in vivo*, pelo menos em alguns tecidos (Kostenis e cols., 2005).

Com relação aos reflexos cardiovasculares, observamos inicialmente que a infusão i.v. de Salina não alterou nenhuma das respostas reflexas avaliadas (bradicardia e taquicardia barorreflexas, resposta hipotensora e bradicárdica do reflexo de Bezold-Jarisch ou respostas pressora e bradicárdica quimiorreflexas). Isso demonstra uma eficiência em nossa metodologia de avaliação de tais respostas, assim como emprego adequado das técnicas experimentais, principalmente, da taxa de infusão. Metodologia adequada é essencial para avaliação das respostas cardiovasculares em camundongos e muito cuidado deve ser tomado em relação à

manipulação de volume circulante, uma vez que o volume total de sangue em um camundongo adulto é de apenas 2 a 3 ml de sangue (Lorenz, 2002).

A infusão i.v. de Ang II, na dose utilizada (correspondente à dose padronizada na literatura para infusão i.v. em ratos) de maneira surpreendente, pelo menos a princípio, não promoveu alterações significativas nas respostas bradicárdica e taquicárdica barorreflexas em camundongos C57BL6J, anestesiados com uretana. No entanto, apesar do camundongo não ser um rato pequeno e suas respostas não corresponderem muitas das vezes às observadas em ratos, Lorenz (2002) destaca em sua revisão que, por mais estranho que pareça, de acordo com a experiência do grupo dirigido por ele, os camundongos se assemelham estreitamente a pequenos coelhos. São ambos um tanto frágeis, apresentam dificuldades em manter a pressão sanguínea adequada durante anestesia e apresentam alta labilidade da pressão arterial o que torna difícil a produção de elevação da PA experimentalmente, quer por manipulação aguda ou crônica (Lorenz, 2002).

Reid e Chou (1990) e Dorward e Rudd (1991) observaram que a infusão i.v. de Ang II (10 ng/kg/min. e 6.7 ± 3.7 pmol/min., respectivamente) não promoveu efeitos sobre o barorreflexo em coelhos. No entanto, Gaudet e cols., (2000) utilizando mini-bombas osmóticas para infusão de Ang II no IV ventrículo de coelhos durante duas semanas, observaram redução no ganho do barorreflexo, como descrito para ratos. Em outros três estudos (Dorward e Rudd 1991; Bendle e cols., 1997; Gaudet e cols., 1998) em coelhos intactos, a administração ICV aguda de antagonistas de receptores da Ang II não promoveu alterações na PA ou FC basais, nem afetou o barorreflexo. No entanto, coelhos com insuficiência cardíaca apresentam função barorreflexa inibida, e têm tal função restaurada pela administração i.v. do antagonista de receptor AT_1 L-158,509 (0.33 mg/kg) (Liu e cols., 1999). Assim, Head e cols., (2002) sugerem, que a participação da Ang II na inibição das respostas barorreflexas não parece ocorrer em

animais (pelo menos em coelhos) em condições normais, mas parece necessitar de uma perturbação a longo-prazo do sistema cardiovascular, tal como na insuficiência cardíaca ou administração crônica de Ang II (Head, 2002).

Considerando que as respostas cardiovasculares em camundongos sejam semelhantes à de coelhos, e que os animais controles utilizados em nosso estudo são saudáveis, não seria tão surpreendente a ausência de efeitos da infusão i.v. aguda de Ang II sobre o barorreflexo. Mais interessante, é o fato de que nos camundongos KO-Mas, que apresentam alterações morfológicas e fisiopatológicas condizentes com quadro de insuficiência cardíaca (Santos e cols., 2006), a infusão i.v. de Ang II tenha reduzido a bradicardia barorreflexa, praticamente abolindo esta resposta.

Outra explicação para esses achados, porém não menos importante, seria a exacerbação do efeito da Ang II em atenuar a bradicardia barorreflexa na ausência do antagonismo fisiológico desempenhado pelo receptor Mas sobre as ações da Ang II via receptor AT_1 (Kostenis, 2005), apesar de este efeito estar ausente nos animais controle (C57BL6J). Nesse sentido, estudo em ratos idosos demonstrou que a Ang II endógena exerce maior efeito de atenuação da bradicardia barorreflexa na ausência de ação da Ang-(1-7) endógena através da microinjeção do antagonista A-779 no NTS (Sakima e cols., 2005). Diante dessas evidências, podemos sugerir que há exacerbação dos efeitos da Ang II nos camundongos KO-Mas, provavelmente em decorrência de ausência da ação antagônica desempenhada pela Ang-(1-7) nestes animais.

Outra observação importante, que nos leva à possibilidade de exacerbação dos efeitos da Ang II na ausência do receptor Mas, refere-se ao fato dos animais KO-Mas apresentarem a resposta taquicárdica barorreflexa aumentada durante a infusão i.v. de Ang II em comparação com a infusão i.v. de Salina. Considerando que o tônus simpático cardíaco está aumentado nos camundongos KO-Mas (estudos preliminares em andamento no nosso laboratório – tabela 4), provavelmente por uma ação da Ang II

não contra-regulada pela Ang-(1-7) sobre a atividade simpática eferente cardíaca, e que a taquicardia barorreflexa decorre de um aumento das descargas dos nervos simpáticos cardíacos, podemos compreender a origem da taquicardia barorreflexa aumentada nesses animais em condições basais, assim como a exacerbação desta resposta durante a infusão i.v. de Ang II.

Ainda, estudos têm demonstrado que existem receptores de Ang II, AT₁ e AT₂, distribuídos no sistema de condução do coração (Saito e cols., 1987; Sechi e cols., 1993; Saavedra e cols., 1993) e que a Ang II injetada diretamente na artéria que irriga o nodo sinoatrial de cães anestesiados, produz efeito cronotrópico positivo direto (Lambert e cols., 1991; Beaulieu e Lambert, 1998). Dessa forma, outra possível explicação para a exacerbação da resposta taquicárdica barorreflexa nos camundongos com deleção do receptor Mas, seria a ação direta da Ang II cardíaca sobre o sistema de condução, também não contra-regulada pelas ações da Ang-(1-7).

De forma semelhante ao descrito acima, a infusão i.v. de Ang II não alterou as respostas hipotensora e bradicárdica desencadeadas pela estimulação do reflexo de Bezold-Jarisch em camundongos C57BL6J anestesiados. As justificativas podem ser semelhantes às apresentadas para a ausência de efeito da infusão de Ang II sobre as respostas barorreflexas em animais intactos em condições basais, pois, apesar de os estudos envolvendo SRA e reflexo de Bezold-Jarisch serem escassos, a integração central deste reflexo é muito semelhante à do barorreflexo (Vasquez e cols., 1997; Machado e cols., 1997). Apesar disso, os animais KO-Mas apresentaram uma redução significativa da resposta hipotensora à estimulação do reflexo de Bezold-Jarisch durante a infusão i.v. de Ang II. Nenhuma alteração significativa foi observada na resposta bradicárdica que compõe o reflexo de Bezold-Jarisch. Diz e cols. (2002) demonstraram que o reflexo de Bezold-Jarisch encontra-se atenuado em ratos transgênicos com aumento das concentrações de Ang II central e exacerbado em ratos

transgênicos com diminuição do angiotensinogênio central. Nossos dados, associados às evidências da literatura, reforçam a hipótese de que os peptídeos angiotensinérgicos parecem participar da modulação das respostas cardiovasculares desencadeadas pela estimulação do reflexo de Bezold-Jarisch.

No que diz respeito ao quimiorreflexo, a infusão i.v. de Ang II produziu uma acentuação da resposta bradicárdica quimiorreflexa em camundongos C57BL6J anestesiados com uretana. Estes dados estão de acordo com os dados da literatura, que demonstram que a Ang II aumenta a quimiossensibilidade nas células do corpúsculo carotídeo, aumentando assim a frequência de disparo de potenciais dos quimiorreceptores (Leung e cols., 2003) e as respostas cardiovasculares observadas em consequência disso. De acordo com Diz e cols. (2002) a Ang II estimula o nervo do seio carotídeo e exacerba a resposta à ativação do quimiorreflexo com KCN. Diferente do esperado, nos camundongos KO-Mas, observamos que a infusão i.v. de Ang II promove atenuação da resposta bradicárdica quimiorreflexa. Entretanto outra explicação para esses resultados seria que esta resposta pode ser consequência de uma reversão do efeito promovido pela Ang II, devido ao alcance do limite máximo de resposta bradicárdica desencadeada pela injeção de KCN em camundongos KO-Mas, uma vez que esta resposta já se encontra exacerbada nestes animais. Nesta situação, a bradicardia dos animais KO-Mas foi semelhante àquela observada nos animais C57BL6J, onde a Ang II potenciou esta resposta. Talvez, a infusão de Ang II nos animais KO-Mas, que já apresentam uma resposta quimiorreflexa exacerbada, provavelmente por aumento na frequência de disparo de potenciais no nervo do seio carotídeo não contrabalanceada pela Ang-(1-7), não tenha sido capaz de aumentar ainda mais a frequência de disparo de potenciais destes nervos, diferente do que ocorreu nos animais controle. No entanto, estas são apenas especulações, uma vez que existem ainda poucos estudos a respeito da participação do SRA na modulação

quimiorreflexa, sendo o nosso estudo o primeiro a demonstrar a possível participação da Ang-(1-7) na modulação desta resposta reflexa.

O uso de anestesia durante a avaliação de parâmetros cardiovasculares em camundongos, assim como em outros animais de experimentação, pode mascarar resultados importantes, principalmente quando avaliamos resultados de manipulações gênicas (Desai e cols., 1997). O anestésico utilizado em nosso estudo, uretana, é considerado uma boa escolha já que sua administração reduz pouco a PA e o índice cardíaco, em comparação a outros anestésicos, como isoflurano e pentobarbital de sódio (Janssen e cols., 2004). Apesar de em nosso estudo, a anestesia com uretana ter influenciado pouco as respostas cardiovasculares pela avaliação dos valores basais de PAM e FC, sabe-se que este anestésico produz efeitos depressores sobre as respostas reflexas por afetar a neurotransmissão (Maggi e Meli, 1986 a, b; Machado e Bonagamba, 1992; Sun e Reis, 1995). Daló e Larson (1990) demonstraram que o efeito depressor produzido pela administração de uretana como anestésico está provavelmente relacionado à inibição da atividade de aminoácidos excitatórios em camundongos.

Outro ponto a ser considerado é a utilização da anestesia com uretana em estudos relacionados ao papel do SRA no controle cardiovascular. Leenen e Provost (1981) demonstraram que a administração de saralasin, um antagonista competitivo da Ang II, diminuiu muito a PA em ratos anestesiados com uretana, sugerindo que um aumento na atividade da renina plasmática é essencial para a manutenção dos níveis normais de PA. Estudos também indicam que sob anestesia com uretana, as respostas vasoconstritoras à noradrenalina, tiramina e Ang II são reduzidas se comparadas às observadas em animais não anestesiados ou preparações utilizando outros anestésicos, demonstrando que a uretana desempenha ações depressoras diretas sobre a contratilidade do músculo liso vascular (Maggi e Meli, 1986 a, b). Ainda, um

dos maiores inconvenientes ressaltados durante a utilização de uretana como anestésico têm sido as evidências de que este anestésico ativa as eferências simpáticas do sistema nervoso central para os órgãos periféricos. Isso é evidenciado pela importante influência da atividade simpática cardíaca na FC basal de ratos anestesiados com uretana, indicada pelo grande efeito cronotrópico negativo observado após a injeção de propranolol nestes animais (Maggi e Meli, 1986 a, b). Também, Shimokawa e cols. (1998) demonstraram que a uretana aumenta a atividade nervosa simpática renal tônica em ratos.

Diante de todos os pontos ressaltados e a partir do aprimoramento da técnica de canulação de vasos periféricos em camundongos, iniciamos a investigação em animais não anestesiados. Utilizamos para realização dos procedimentos cirúrgicos um coquetel de ketamina + xilazina. Esta mistura possui potentes efeitos cardiodepressores agudamente (Janssen e cols., 2004), mas é muito bem tolerada por camundongos. Além disso, fornece um tempo adequado para realização de procedimentos cirúrgicos, permite a livre movimentação do animal (diferente dos anestésicos inaláveis como halotano) e o animal encontra-se completamente recuperado dentro de 2 horas (Lorenz, 2002).

Ao compararmos camundongos da linhagem C57BL6J anestesiados e conscientes, observamos que os animais conscientes apresentam valores de PAM basais ligeiramente mais elevados em comparação aos animais anestesiados. Isso era esperado, uma vez que a anestesia promove efeito hipotensor também em camundongos (Rao e Verkman, 2000; Janssen e cols., 2004). Ainda condizente com os dados da literatura foi a observação de que os camundongos C57BL6J não anestesiados apresentam valores de FC basais significativamente menores do que os observados nos camundongos anestesiados (figuras e tabelas nos anexos). Provavelmente isso se deve ao aumento da influência da atividade simpática eferente

cardíaca para o coração proporcionada pela administração de uretana também em camundongos, como observado anteriormente em ratos (Maggi e Meli, 1986 a, b).

Apesar do exposto acima, não observamos diferenças significativas entre a bradicardia provocada por injeção i.v. do bloqueador β -adrenérgico atenolol em camundongos C57BL6J não anestesiados e anestesiados com uretana. Entretanto, observamos que o efeito produzido pela administração do antagonista colinérgico metilatropina foi significativamente aumentado nos camundongos não anestesiados quando comparado ao efeito nos camundongos anestesiados com uretana (figuras e tabelas nos anexos). Esses dados sugerem que o efeito da uretana sob a modulação da neurotransmissão das respostas cardiovasculares pode influenciar não apenas a atividade simpática eferente cardíaca como descrito na literatura, mas também e de forma importante a atividade eferente parassimpática cardíaca, pelo menos em camundongos.

No que diz respeito às respostas cardiovasculares reflexas, observamos importantes alterações. As respostas bradicárdica e taquicárdica barorreflexas apresentam-se significativamente aumentadas nos camundongos não anestesiados quando comparados aos camundongos anestesiados com uretana (resultados mostrados na tabela 55). Dados semelhantes já haviam sido observados em relação à bradicardia barorreflexa em ratos (Fluckiger e cols., 1985; Fernandes e cols., 2003). Nossos dados a respeito da resposta barorreflexa em camundongos não anestesiados quando comparados aos camundongos da mesma espécie (C57BL6J) anestesiados com uretana, ressaltam a evidência de que o anestésico uretana pode influenciar a modulação autonômica simpática e parassimpática cardíacas.

Observamos, de forma bastante interessante, que o Reflexo de Bezold-Jarisch encontra-se atenuado nos camundongos não anestesiados quando comparados aos animais anestesiados com uretana (resultados mostrados nas tabelas 56 e 57). Se

considerarmos que os circuitos neuronais responsáveis pela modulação das respostas barorreflexas e do Reflexo de Bezold-Jarisch são semelhantes, os dados poderiam parecer estranhos; no entanto, a manutenção da homeostase cardiovascular depende da integração de todas as respostas cardiovasculares reflexas. Por exemplo, Chianca Jr. e Machado (1994) demonstraram que a responsividade do reflexo de Bezold-Jarisch é aumentada em ratos após remoção dos barorreceptores arteriais, sugerindo que os receptores cardiopulmonares podem contra-regular o aumento do tônus eferente simpático após denervação das aferências dos barorreceptores, contribuindo assim para a manutenção dos níveis normais de PAM observados nestes animais. Resultados semelhantes haviam sido observados anteriormente em cães (Persson e cols., 1988). É possível que a perda ou diminuição da aferência barorreceptora promova uma reorganização do processamento neural dentro do NTS e talvez em outros núcleos envolvidos no circuito de modulação barorreflexa (Thrasher, 2005). De acordo com os estudos citados, podemos sugerir que em camundongos intactos não anestesiados há uma predominância da atividade barorreceptora em relação à atividade dos receptores cardiopulmonares. Isso justificaria a reduzida atividade do reflexo de Bezold-Jarisch nos camundongos não anestesiados, em relação à uma maior atividade na situação de anestesia, onde a atividade barorreceptora encontra-se atenuada.

Além das dificuldades já destacadas em relação à interpretação dos dados em camundongos, e à comparação com outras espécies de animais de experimentação, ainda existem problemas relacionados às diferentes linhagens de camundongos utilizadas durante a manipulação gênica e conseqüentemente, na experimentação. Diversos estudos (Desai e cols., 1997; Mattson, 2001; Campen e cols., 2002; Shusterman e cols., 2002; Deschepper e cols., 2004; Campen e cols., 2005) têm evidenciado claras diferenças hemodinâmicas e autonômicas entre diversas linhagens

de camundongos. Em alguns casos, as diferenças variam de acordo com o parâmetro avaliado e metodologia empregada. Mas um fato que nos chamou a atenção foi a descrição de alterações relacionadas à expressão de genes relacionados ao SRA na linhagem de camundongo utilizada em nosso estudo (C57BL6J). Estudos demonstraram que existem diferenças linhagem-dependente na regulação da secreção de renina. Camundongos 129sv e Swiss Webster são linhagens da classe de camundongos com alta renina e possuem alta atividade da renina em glândulas submandibulares, enquanto outros camundongos, incluindo os C57BL6J são da classe de camundongos com baixa renina, e apresentam reduzida atividade da renina (Piccini e cols., 1982). Outro estudo demonstrou elevados níveis de PA basal em camundongos 129sv, os quais apresentam duas cópias de genes para renina, comparado a níveis mais reduzidos de PA basal em camundongos C57BL6J, que apresentam apenas um gene para renina (Krege e cols., 1995). Estas informações são muito importantes para nosso estudo e, assim sendo, com a disponibilidade de camundongos com deleção do receptor Mas de outra linhagem (FVBN), partimos para investigação dos reflexos cardiovasculares nestes camundongos não anestesiados.

Os camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) da linhagem FVBN apresentaram valores de PAM basais mais elevados do que os animais do grupo controle não anestesiados. Sampaio e cols. (2003) demonstraram que a administração i.v. de Ang-(1-7) não promove alterações significativas na PAM e FC, apesar de alterar de maneira oposta a resistência periférica e o débito cardíaco, variáveis que determinam os valores de PA. No entanto, considerando as evidências do efeito cardioprotetor desempenhado pela Ang-(1-7) (Ferreira e Santos, 2005), assim como as recentes descobertas de que os camundongos com deleção do receptor Mas apresentam função cardíaca prejudicada (Santos e cols., 2006), a observação de

valores basais de PAM mais elevados nestes animais está de acordo com os dados da literatura.

Como revisado por Averill e Diz (2000), vários estudos têm demonstrado que a Ang-(1-7) pode agir como um importante neuromodulador, especialmente em áreas bulbares relacionadas com o controle tônico e reflexo da PA. A infusão ICV de Ang-(1-7) não modifica os valores basais de PAM e FC, mas produz significativa facilitação do controle reflexo barorreceptor da FC (Campagnole-Santos e cols., 1992; Averill e Diz, 2000). A microinjeção de Ang-(1-7) no NTS, RVLM e CVLM induz alterações similares na PAM e FC (hipotensão e bradicardia, efeito pressor e simpatoexcitatório, efeito depressor e simpatoinibitório, respectivamente) às observadas durante a microinjeção de Ang II (Silva e cols., 1993; Fontes e cols., 1994, 1997, 2000; Chavez e cols., 2000; Alzamora e cols., 2002). Os efeitos cardiovasculares produzidos pela Ang-(1-7) no cérebro são abolidos pela administração do antagonista A-779 (Santos e cols., 1994, 2000). No entanto, a função efetiva da Ang II e Ang-(1-7) endógenas no bulbo em situações fisiológicas e fisiopatológicas, e particularmente se o receptor Mas participa dos efeitos mediados pela Ang-(1-7), ainda não está suficientemente esclarecido (Fontes e cols., 1997; Hirooka e cols., 1997; Santos e cols., 2005).

A manipulação genética em camundongos tem auxiliado na investigação do papel das angiotensinas no controle central da PA e FC. Camundongos KO-AT_{1a} são hipotensos e apresentam valores de FC similares aos dos animais controles (Chen e cols., 2005). Já camundongos com superexpressão do receptor AT_{1a} no cérebro (NSE-AT_{1a}), são normotensos e apresentam FC mais elevada quando comparados aos animais controles (Lazartigues e cols., 2002). Com relação ao papel do receptor AT₂, o estudo de camundongos KO-AT₂, realizado por Hein e cols., 1995, demonstrou que estes animais apresentavam valores de PAM e FC similares aos observados nos camundongos controles. No entanto, Gross e cols., (2000 e 2004), demonstraram que

camundongos KO-AT₂ apresentam valores basais de PAM mais elevados do que os animais controles.

Como podemos ver, apesar da evolução das técnicas experimentais e a facilidade na utilização de animais geneticamente modificados, os resultados utilizando manipulação farmacológica e genética do SRA no que diz respeito ao controle central da PA e FC ainda são divergentes. A observação em nosso estudo, inédita, de que camundongos KO-Mas apresentam valores de PAM significativamente mais elevados do que os observamos em camundongos controles (FVBN) não anestesiados, associada aos diversos estudos citados acima que evidenciam um importante papel da Ang-(1-7) endógena na regulação da PA, nos permite reforçar a hipótese de que o eixo Ang-(1-7)/Mas parece estar envolvido no controle tônico da pressão arterial e ainda a ausência de seus efeitos pode participar da gênese da hipertensão arterial.

Apesar de não observarmos diferenças em relação aos valores basais de FC entre os camundongos com deleção do receptor Mas (KO-Mas) quando comparados aos camundongos controles (FVBN) não anestesiados, isso não descarta a possibilidade de participação da Ang-(1-7) no controle também da FC. É necessário considerar que estes animais podem apresentar compensações que tamponem o efeito direto da manipulação da expressão do receptor Mas sobre a FC. Podemos observar alterações no controle da FC em camundongos KO-Mas após o duplo bloqueio autonômico. Estes animais apresentam tendência a FC intrínseca mais elevada ($p=0.0517$) do que os animais controles (FVBN) não anestesiados. Isso pode ser devido, pelo menos em parte, à ação da Ang II endógena sobre a excitabilidade das células do sistema de condução do músculo cardíaco (Saito e cols., 1987; Sechi e cols., 1993; Saavedra e cols., 1993; Beaulieu e Lambert, 1998), não contra-regulada pela Ang-(1-7), nos camundongos com deleção do receptor Mas. Em concordância com a hipótese de exacerbação das ações da Ang II na ausência da contra-regulação

pela Ang-(1-7), observamos que durante o bloqueio simpático os camundongos KO-Mas não anestesiados apresentam efeito bradicárdico induzido pela injeção i.v. do bloqueador β -adrenérgico, atenolol, significativamente maior do que o observado nos camundongos controle, sugerindo que estes animais apresentam atividade simpática cardíaca aumentada. Ao contrário, o bloqueio colinérgico realizado através da injeção i.v. de metilatropina produziu taquicardia significativamente menor nos camundongos KO-Mas, quando comparados ao respectivo grupo controle não anestesiado, sugerindo uma redução da atividade cárdio-vagal nos animais com deleção do receptor Mas. Esses dados estão de acordo com a hipótese de que a Ang-(1-7) via Mas desempenha importante papel no controle tônico da atividade simpática e parassimpática cardíacas.

Como descrito para os camundongos KO-Mas (C57BL6J), os camundongos KO-Mas da linhagem FVBN, não anestesiados, apresentam bradicardia barorreflexa significativamente reduzida e taquicardia barorreflexa significativamente acentuada em relação aos camundongos controle da mesma linhagem. Estes dados estão de acordo com a redução na atividade cárdio-vagal e aumento da atividade simpática cardíaca observada nos camundongos KO-Mas, como descrito acima, e sugerem que a deleção do receptor Mas produz modificações na modulação da atividade autonômica simpática e parassimpática cardíacas.

Estudos a respeito do SRA cerebral em camundongos ainda são escassos, mas, por exemplo, o estudo de Häuser e cols. (1998) analisou a distribuição de receptores da Ang II (AT_1 e AT_2) no cérebro de camundongos C57BL6J. Estes autores observaram que há expressão similar de receptores AT_1 e AT_2 no NTS de camundongos, diferente do observado em ratos que apresentam somente receptores AT_1 no NTS (para revisão, von Bohlen und Halbach e Albrecht, 2006). Estes dados indicam a existência de diferenças no SRA cerebral de camundongos em relação a ratos, uma vez que o NTS é considerado a primeira estação sináptica das aferências

cardiovasculares. Recentemente, Doobay e cols., (2007) demonstraram pela primeira vez a expressão da ECA2 (proteína e RNAm) no citoplasma de neurônios de camundongos, no NTS, núcleo dorsal motor do vago, núcleo ambíguo e RVLM, todas estas, áreas relacionados com o controle das funções cardiovasculares. Esta observação ressalta a importância do SRA neuronal e ainda, destaca a produção efetiva de Ang-(1-7) no cérebro a partir da conversão de Ang II pela ECA2, para contraregular as ações mediadas pela própria Ang II, principalmente em situações conhecidas por ativar o SRA, como hipertensão e outras doenças cardiovasculares (Gallagher e cols., 2006; Doobay e cols., 2007).

Em concordância com os dados apresentados dos camundongos KO-Mas da espécie C57BL6J, os camundongos KO-Mas FVBN não anestesiados apresentam atenuação das respostas hipotensora e bradicárdica que constituem o reflexo de Bezold-Jarisch e exacerbação das respostas pressora e bradicárdica que compõem o quimiorreflexo. Como discutido acima, estes dados são condizentes com os observados na literatura a respeito da participação da Ang II na modulação de tais reflexos e ainda com a possibilidade de os camundongos FVBN KO-Mas, assim como os camundongos C57BL6J KO-Mas, apresentarem alterações morfológicas condizentes com quadro de insuficiência cardíaca (Santos e cols., 2006), apesar de animais desta linhagem ainda não terem sido submetidos a tal avaliação.

Considerando que a Ang II atenua o barorreflexo (Campagnole-Santos 1992; Luoh e chan, 1998; Averill e Diz, 2000; Campagnole-Santos e Haibara 2001; Santos e cols., 2005), atenua o reflexo de Bezold-Jarisch (Semple e cols., 1988; Whorlow e cols., 1998; Uggere e cols., 2000; Sever e cols., 2001) e facilita o quimiorreflexo (Paton e Kasparov, 1999; Fung e cols., 2002; Rocha e cols., 2003; Leung e cols., 2003), agindo via receptor AT_1 , sendo o receptor Mas um antagonista funcional do receptor AT_1 (Kostenis e cols., 2005), reforçamos a hipótese de que a Ang-(1-7), via receptor Mas

contra-regula as ações da Ang II na modulação das respostas cardiovasculares reflexas, provavelmente atuando em nível do SNC.

Trabalho recente de Gallagher e cols. (2006) mostra outra evidência de interação entre os peptídeos Ang II e Ang-(1-7) em astrócitos de ratos. Este estudo sugere que a Ang-(1-7) agindo em seu receptor previne a redução transcricional da ECA2 produzida pela Ang II, acentuando assim a produção de Ang-(1-7) a partir da conversão de Ang II pela ECA2. Associado a isso, a demonstração de Doobay e cols. (2007) de que há significativa expressão da ECA2 no cérebro de camundongos e especificamente em áreas relacionadas com o controle das funções cardiovasculares, indica o importante papel desempenhado pela Ang-(1-7) no SNC. Esta é mais uma evidência de que a Ang-(1-7) age como modulador fisiológico da Ang II, produzindo ações opostas sobre o volume de fluido corporal, pressão sanguínea e crescimento celular, que são particularmente evidentes sob condições de ativação do SRA (Gallagher e cols., 2006; Doobay e cols., 2007).

Se realmente há ativação do SRA ou não nos camundongos com alteração da expressão do receptor Mas, não podemos afirmar ainda. Mas, é possível que alterações nos níveis plasmáticos, assim como na expressão de receptores aconteçam diante de manipulações gênicas. Alenina (2003) durante a produção dos animais KO-Mas e NSE-Mas da linhagem FVBN, demonstrou que estes animais apresentam atividade da renina plasmática similar ao observado para camundongos controles FVBN (cerca de 2 ng/ml/h), concentrações plasmáticas de Ang II também similares aos animais controles FVBN (cerca de 250 pg/ml) assim como concentrações plasmáticas de angiotensinogênio (cerca de 11 ng/ μ l). Entretanto, sabe-se hoje que além do SRA circulante, existem SRA teciduais e que as concentrações dos substratos e peptídeos podem variar de acordo com o tecido avaliado, condição experimental e tipo de animal avaliado. Outro dado importante foi apresentado no estudo de Cholewa e cols. (2005).

Estes autores demonstraram que a manutenção da PA em camundongos é mais dependente do SRA endógeno do que em ratos. Ainda, este estudo demonstrou que os camundongos (C57BL6J), mesmo com apenas um gene para renina, apresentam concentração plasmática de renina 44 vezes maior do que o observado em ratos Sprague-Dawley (SD) e ainda, que os ratos SD apresentam concentração plasmática de angiotensinogênio 7 vezes maior do que camundongos C57BL6J. Estes dados demonstram a existência de uma relação inversa entre os dois mais importantes componentes do SRA entre camundongos e ratos (Cholewa e cols., 2005).

Como nos protocolos iniciais, avaliamos o efeito da infusão i.v. de Ang II em camundongos KO-Mas e controles da linhagem FVBN não anestesiados. Durante a infusão de Salina, não observamos alterações importantes nas variáveis cardiovasculares PAM e FC. A infusão i.v. de Ang II promoveu efeito pressor e bradicardia de similar magnitude em todos os grupos de animais avaliados (KO-Mas e controles FVBN). Nos protocolos iniciais havíamos observado que a infusão i.v. de Ang II em camundongos KO-Mas C57BL6J anestesiados com uretana produz efeito pressor significativamente maior do que o observado para os animais controles (C57BL6J). Apesar de estes dados ressaltarem as ações contra-regulatórias Ang II/Ang-(1-7) no controle da homeostase cardiovascular e da justificativa mais adequada para este resultado ser a ausência da oposição realizada pela Ang-(1-7) sobre as ações da Ang II, diante dos atuais resultados, é necessário considerar outras hipóteses.

Uma delas seriam as possíveis diferenças relacionadas ao SRA de camundongos C57BL6J e FVBN, uma vez que o primeiro apresenta apenas um gene para renina e o segundo, dois genes para renina. Entretanto, Cholewa e Mattson (2001) demonstraram que os valores de atividade da renina plasmática, concentração de renina plasmática, concentração de Ang II e aldosterona mensurados em camundongos C57BL6J são equivalentes aos valores observados para camundongos

com dois genes para renina. Outra possibilidade seria a influência da anestesia nos resultados iniciais. Estudo de Leenen e Provost (1981) demonstraram que um aumento na atividade da renina plasmática é essencial para a manutenção dos níveis normais de PA em ratos anestesiados com uretana. A anestesia, além de aumentar a atividade da renina plasmática, aumenta também os níveis de Ang II circulantes (Sigmon e Beierwaltes, 1993). Ainda, Moura e cols. (2005) demonstraram que a injeção i.v. de antagonistas de receptor AT_1 , losartan e CV11974, promoveram importante redução na PAM de ratos normotensos anestesiados com uretana, em concordância com a idéia de que a PAM de ratos anestesiados com uretana é mantida em níveis normais por uma ativação do SRA. Sendo assim, pode ser que a exacerbação no efeito pressor induzido pela infusão i.v. de Ang II em camundongos C57BL6J anestesiados com uretana tenha sido causada por uma ativação do SRA decorrente da anestesia.

Uma vez que os níveis plasmáticos de Ang II nos camundongos FVBN controles e KO-Mas são semelhantes, e que a infusão i.v. de Ang-(1-7) não causa mudanças significativas na PAM e FC (Sampaio e cols., 2003), podemos sugerir que as modificações provocadas pela deleção do receptor Mas talvez causem diferentes modificações no débito cardíaco e resistência periférica total, por exemplo, que mascarem o efeito direto sobre a PAM. Estudo recente de nosso grupo (Botelho-Santos e cols., 2007) utilizando ratos transgênicos TRG(A1-7)3292, que apresentam níveis plasmáticos cronicamente elevados de Ang-(1-7), demonstrou que estes animais apresentam maior débito cardíaco, maior índice cardíaco e menor resistência periférica total quando comparados aos ratos SD e no entanto, não apresentam valores diferentes de PAM. Ainda, podemos sugerir que provavelmente a expressão de receptores AT_1 e, talvez até de receptores AT_2 , não seja diferente entre os camundongos controle e KO-Mas, já que a infusão de Ang II não produziu efeitos

cardiovasculares diferentes nesses animais. No entanto, não existem dados ainda que suportem estas hipóteses.

A infusão i.v. de Salina não alterou as respostas observadas anteriormente durante o bloqueio autonômico simpático e parassimpático cardíacos. Observamos claramente nos camundongos KO-Mas (FVBN) que o efeito taquicárdico produzido pela administração de metilatropina encontra-se significativamente reduzido, enquanto o efeito bradicárdico produzido pela administração de atenolol encontra-se significativamente aumentado quando comparados aos camundongos controles FVBN não anestesiados. Estes dados suportam a hipótese de que a Ang-(1-7) via receptor Mas desempenha importante papel na modulação da atividade autonômica simpática e parassimpática cardíacas.

Durante a infusão i.v. de Ang II observamos uma redução significativa na taquicardia induzida pela administração de metilatropina camundongos FVBN controles e, aumento significativo desta resposta nos camundongos com deleção do receptor Mas não anestesiados. Estes dados estão de acordo com a literatura, já que conforme descrito por Potter (1982) a Ang II inibe a liberação de acetilcolina nas terminações vagais cardíacas de ratos. Da mesma forma, Du e cols. (1998) demonstraram que a Ang II pode promover inibição pré-sináptica da liberação de acetilcolina em corações infartados e insuficientes de ratos. Apesar disso, não existe até o momento estudos relacionando Ang II e atividade parassimpática eferente cardíaca em camundongos. Nos camundongos com deleção do receptor Mas, a redução da taquicardia induzida pelo bloqueio colinérgico é condizente com a literatura e com a nossa hipótese de que na ausência da ação contra-regulatória da Ang-(1-7), os efeitos da Ang II são exacerbados. No entanto, a observação de que o efeito taquicárdico produzido pela administração i.v. de metilatropina aumenta significativamente durante a infusão i.v. de Ang II é a princípio surpreendente. Podemos especular que talvez a Ang II exógena

esteja agindo diretamente sobre os receptores AT_1 no sistema de condução cardíaco e produzindo o aumento da resposta de taquicardia induzida pela administração i.v. de atropina nos camundongos KO-Mas. Talvez esta resposta taquicárdica esteja relacionada não diretamente ao bloqueio colinérgico cardíaco, induzido pela Ang II endógena na ausência de ação da Ang-(1-7), mas indiretamente à estimulação do sistema de condução cardíaco. Apesar disso, a infusão de Ang II não produziu alterações significativas na resposta bradicárdica à injeção de atenolol em nenhum dos grupos experimentais avaliados.

A infusão i.v. de Ang II não produziu alterações significativas nas respostas bradicárdica e taquicárdica barorreflexas nos camundongos com deleção do receptor Mas, nem tampouco nos camundongos controles não anestesiados. Estes dados são diferentes do esperado e inclusive, dos dados demonstrados por nós nos camundongos KO-Mas da linhagem C57BL6J anestesiados com uretana. Até o momento, não existem estudos a respeito da influência da administração exógena de peptídeos angiotensinérgicos sobre a função barorreflexa em camundongos não anestesiados. Os estudos a respeito da função barorreflexa em camundongos com alteração gênica de componentes do SRA utilizaram análise espectral e, de acordo com Lipman e cols. (2003), este tipo de avaliação que utiliza o índice barorreflexo espontâneo é inconsistente com o ganho barorreflexo arterial avaliado pela técnica farmacológica. A manipulação farmacológica perturba o sistema e permite avaliar o ganho reflexo. Este método é baseado no fato de as respostas barorreflexas serem maiores e mais aparentes através de mudanças rápidas na pressão arterial, o oposto de um estado estacionário ou alterações mínimas na pressão arterial como ocorre durante a avaliação do barorreflexo espontâneo. Os resultados do estudo de Lipman e cols. (2003) demonstram que as análises matemáticas não são claras e seria quase impossível refletirem o ganho barorreflexo arterial. Por conta disso, a manipulação

farmacológica é considerada o método de escolha para avaliação da função barorreflexa (Lipman e cols., 2003).

Na tentativa de desvendar possíveis alterações induzidas pela infusão i.v. de Ang II nos camundongos não anestesiados, realizamos análise separadamente dos componentes rápido (parassimpático) e lento (simpatoinibitório) da resposta bradicárdica barorreflexa, claramente descrita na literatura como sendo inibida pela administração de Ang II. De forma bastante interessante, observamos que a infusão i.v. de Ang II reduziu o 1º componente da bradicardia barorreflexa ($p < 0.05$) nos camundongos KO-Mas não anestesiados. Nos camundongos controle, a Ang II não produziu alterações significativas no 1º componente da bradicardia barorreflexa. Estes dados estão de acordo com a hipótese de que a atividade parassimpática cardíaca é influenciada pela ação da Ang II, e de que na ausência da ação da Ang-(1-7), este efeito é exacerbado. Talvez, o tempo de infusão ou a dose de Ang II não tenham sido suficientes para observarmos alterações significativas, já que alguns trabalhos demonstram que a infusão aguda de Ang II pode não produzir alterações no barorreflexo (Kashihara e cols., 2003).

Analisando o 2º componente da bradicardia barorreflexa, observamos que a infusão i.v. de Ang II produziu um significativo aumento na inclinação da curva $\Delta FC/\Delta t$ (bpm/seg) em camundongos KO-Mas, o que poderia ser interpretado como uma redução do componente simpatoinibitório que participa da fase lenta do efeito bradicárdico na resposta barorreflexa induzida por elevação súbita da PA (Coleman, 1980). De forma interessante, este efeito só foi observado nos animais KO-Mas, sendo que a infusão de Ang II não alterou os componentes da bradicardia barorreflexa nos camundongos controles não anestesiados.

A infusão i.v. de Salina não alterou de maneira significativa as respostas bradicárdica e taquicárdica barorreflexas nos camundongos com deleção do receptor

Mas, nem tampouco nos camundongos controle não anestesiados. Ainda, a infusão i.v. de Salina não produziu alterações significativas nos componentes da bradicardia barorreflexa em nenhum dos grupos experimentais avaliados.

Diante da ausência de estudos semelhantes e ainda, da surpreendente resposta observada, torna-se difícil a interpretação dos dados observados em nosso estudo. Recentemente, Alzamora e cols. (2006) avaliaram o efeito da microinjeção de Ang II e Ang-(1-7) em áreas importantes na modulação das respostas barorreflexas, RVLM e CVLM, em ratos anestesiados com uretana. Os autores observaram que a microinjeção de ambos os peptídeos no RVLM não promoveram alterações significativas nas respostas bradicárdica e taquicárdica barorreflexas. No entanto, a microinjeção de Ang-(1-7) no CVLM, resultou em atenuação da bradicardia barorreflexa e facilitação da taquicardia barorreflexa; enquanto a microinjeção de Ang II na mesma área, promoveu alterações opostas: facilitação da bradicardia barorreflexa e atenuação da taquicardia barorreflexa. Uma vez que estas alterações foram abolidas após tratamento com metilatropina, os autores sugeriram que os peptídeos Ang II e Ang-(1-7), no CVLM, produzem modulação barorreflexa diferente (respostas opostas), provavelmente devido a efeitos distintos sobre a atividade parassimpática cardíaca (Alzamora e cols., 2006).

Como demonstrado por nosso estudo, a função barorreflexa em condições basais parece depender da ação modulatória da Ang-(1-7) via receptor Mas sobre as ações da Ang II via receptor AT_1 , ou no camundongo, até mesmo o receptor AT_2 , já que ambos estão presentes no NTS de camundongos (Häuser e cols., 1998). Apesar disso, durante a administração exógena de Ang II, em camundongos FVBN não anestesiados, com ou sem alteração na expressão do receptor Mas, observamos mesmo padrão de resposta.

Quando realizamos o bloqueio autonômico cardíaco, observamos que o bloqueio parassimpático através da injeção de metilatropina aboliu a bradicardia barorreflexa e

reduziu significativamente a taquicardia barorreflexa em camundongos com deleção do receptor Mas e no respectivo grupo controle durante a infusão i.v. de Salina. Estas respostas não foram alteradas pela infusão i.v. de Ang II em nenhum dos grupos experimentais. Resposta similar foi observada em estudos de Paton (1998) e Paton e Butcher (1998) durante avaliação das respostas cardiovasculares reflexas antes e após a administração de metilatropina em camundongos C57BL6J utilizando a preparação tronco cerebral-coração. Estes autores observaram que a bradicardia barorreflexa, a bradicardia quimiorreflexa e a bradicardia do reflexo de Bezold-Jarisch foram todas abolidas após a administração de metilatropina em camundongos C57BL6J.

Após o bloqueio β -adrenérgico, pela administração de atenolol, observamos que a bradicardia barorreflexa foi significativamente aumentada (predomínio da atividade parassimpática) nos camundongos com deleção do receptor Mas e no respectivo grupo controle. A infusão i.v. de Ang II não modificou esta resposta. Com relação à resposta taquicárdica barorreflexa após bloqueio β -adrenérgico, a infusão i.v. de Salina não produziu alterações significativas na resposta taquicárdica barorreflexa nos camundongos KO-Mas e camundongos controles não anestesiados. A infusão de Ang II aumentou significativamente a resposta taquicárdica barorreflexa apenas nos camundongos com deleção do receptor Mas, que apresentam atividade simpática cardíaca eferente aumentada, pelo provável efeito da Ang II endógena não antagonizado pela Ang-(1-7).

Estes dados associados aos dados anteriores de bloqueio autonômico cardíaco indicam que: nos camundongos FVBN não anestesiados, apesar de a FC basal ser dependente principalmente da atividade simpática eferente cardíaca, as respostas bradicárdica e taquicárdica barorreflexas, parecem ser dependentes principalmente da atividade parassimpática eferente cardíaca, já que tanto as respostas de bradicardia

quanto as de taquicardia barorreflexas foram significativamente atenuadas após bloqueio parassimpático.

Para os camundongos KO-Mas FVBN não anestesiados, observamos atividade parassimpática eferente cardíaca reduzida e atividade simpática eferente cardíaca aumentada quando comparados aos camundongos controles. Estes dados estão de acordo com a observação de atenuação da bradicardia barorreflexa, assim como com a facilitação da taquicardia barorreflexa observadas nestes animais. Assim, estes dados indicam que a Ang-(1-7) desempenha importante papel na modulação da atividade autonômica simpática e parassimpática cardíacas, provavelmente aumentando a atividade parassimpática e reduzindo a atividade simpática, como esperado, também em camundongos não anestesiados. Provavelmente, as ações da Ang II estejam sendo exacerbadas nos camundongos com deleção do receptor Mas, pela ausência do antagonismo desempenhado pela provável heterodimerização funcional dos receptores Mas/AT₁ (Kostenis e cols., 2005).

Neste trabalho, considerando os efeitos da Ang-(1-7) no SNC, ainda tivemos a oportunidade de avaliar as alterações sobre os parâmetros cardiovasculares basais (PAM e FC) e sensibilidade barorreflexa em camundongos transgênicos que superexpressão o receptor Mas no cérebro (NSE-Mas). De maneira interessante, estes animais apresentam valores basais de PAM significativamente mais elevado quando comparados ao respectivo grupo controle (FVBN). Apesar de inicialmente, esperarmos o contrário, a PAM mais elevada nestes animais não contraria a hipótese levantada sobre o papel fundamental da Ang-(1-7) no controle tônico da PA. Muito pelo contrário, apesar de não sabermos ainda a localização precisa da superexpressão do receptor Mas nestes camundongos, estes dados evidenciam que a Ang-(1-7) via Mas, participa efetivamente do controle da PA agindo em nível do SNC. Em ratos Wistar, Becker e cols. (2005), demonstraram que há significativa expressão do receptor Mas nas

diversas áreas bulbares (NTS, RVLM e CVLM) relacionadas com o controle tônico da PA e FC. No entanto, ainda não existem dados na literatura a respeito da expressão de receptor Mas no cérebro de camundongos FVBN, nem tampouco em camundongos NSE-Mas.

Em relação aos valores basais de FC, não observamos diferenças significativas entre os camundongos com superexpressão do receptor Mas no cérebro (NSE-Mas) e os camundongos controles não anestesiados. Este resultado também não descarta o envolvimento do receptor Mas e da Ang-(1-7) no controle tônico da FC, uma vez que além de não sabermos a localização precisa da superexpressão do Mas no cérebro destes animais, precisamos considerar a possibilidade de respostas compensatórias serem desenvolvidas pelo organismo destes animais para tamponar possíveis alterações. Como discutido anteriormente, estudos de nosso grupo (Sampaio e cols., 2003; Botelho-Santos e cols., 2007) têm demonstrado que a Ang-(1-7) aguda ou cronicamente (ratos transgênicos) promove alterações importantes nas variáveis cardiovasculares, que não necessariamente se expressam em alterações finais de PAM e FC.

Diante de dados consistentes da literatura a respeito do efeito facilitatório da Ang-(1-7) sobre a função barorreflexa, interessante foi investigar a função barorreflexa em camundongos com superexpressão do receptor Mas no cérebro. Observamos, de forma muito interessante, que estes animais apresentam bradicardia barorreflexa significativamente exacerbada em relação aos camundongos controles FVBN não anestesiados, sem tampouco apresentarem alterações no índice de taquicardia barorreflexa. Uma vez que não se sabe a localização do receptor Mas no cérebro destes animais, e que estes são dados preliminares a respeito de tal animal, não podemos sugerir um mecanismo que explique tal resultado. No entanto, estes dados reforçam a idéia de participação efetiva da Ang-(1-7) via Mas na modulação da

resposta bradicárdica barorreflexa e, conseqüentemente, na regulação das funções cardiovasculares.

Na busca de compreender um pouco o papel da Ang-(1-7) e do receptor Mas no cérebro de camundongos realizamos infusão ICV do antagonista A-779 nos camundongos com superexpressão do receptor Mas no cérebro (NSE-Mas) e em camundongos controle não anestesiados. A infusão ICV de A-779 ou Salina não promoveu alterações significativas nos valores basais de PAM nos camundongos com superexpressão do receptor Mas no cérebro (NSE-Mas), nem nos camundongos controles não anestesiados. A FC basal dos camundongos controles FVBN não foi alterada pela infusão de Salina ou de A-779. Já nos camundongos NSE-Mas, a infusão ICV de A-779 causou significativa taquicardia quando comparado à infusão ICV de Salina. Estes dados, associados aos dados da literatura, sugerem que a Ang-(1-7) participa do controle central da FC e que a superexpressão do receptor Mas no cérebro pode modificar o controle tônico sobre os parâmetros cardiovasculares.

A idéia de que a Ang-(1-7) no SNC participa da modulação da resposta barorreflexa também em camundongos, foi ratificada durante a avaliação das respostas bradicárdica e taquicárdica barorreflexas após a infusão ICV do antagonista A-779. Observamos de maneira bastante interessante que ambas as respostas barorreflexas (bradicardia e taquicardia) foram reduzidas em camundongos controles FVBN não anestesiados após infusão ICV de A-779. No entanto, estas respostas não foram significativamente alteradas pela infusão ICV de A-779 nos camundongos NSE-Mas. Estes dados são condizentes com a observação de que a Ang-(1-7) provavelmente aumenta a atividade parassimpática eferente cardíaca em camundongos não anestesiados. De forma interessante, nos camundongos que superexpressam o receptor Mas no cérebro (NSE-Mas) a infusão ICV de A-779, na mesma dose utilizada nos animais controle, não modificou significativamente estas respostas.

Apesar de não sabermos a respeito da localização precisa do receptor Mas no cérebro de camundongos, esta é uma evidência funcional de que não só o receptor Mas está presente no cérebro de camundongos, mas que está em maior número no cérebro dos animais NSE-Mas.

Assim, neste estudo, demonstramos pela primeira vez as alterações induzidas pela deleção genética do receptor, Mas, em camundongos C57BL6J anestesiados com uretana, assim como em camundongos FVBN não anestesiados com deleção gênica e superexpressão no cérebro do receptor Mas, sobre as respostas cardiovasculares reflexas. Os resultados sugerem que a Ang-(1-7) e seu receptor Mas estão efetivamente envolvidos na regulação dos parâmetros cardiovasculares basais, assim como na modulação das respostas cardiovasculares reflexas.

6 - CONCLUSÕES:

Conforme demonstrado, os resultados do presente estudo confirmam dados da literatura e estendem o conhecimento a respeito das funções desempenhadas pelo o heptapeptídeo Ang-(1-7), via receptor Mas, sobre o controle tônico e reflexo das variáveis cardiovasculares, uma vez que:

- ✓ O receptor da Ang-(1-7), Mas, está envolvido de forma importante na modulação das respostas cardiovasculares reflexas.
- ✓ A deleção e a superexpressão do receptor da Ang-(1-7), Mas, no cérebro, alteram as respostas barorreflexas induzidas por injeção intravenosa de fenilefrina e nitroprussiato de sódio.
- ✓ A deleção do receptor da Ang-(1-7), Mas, altera as respostas reflexas induzidas pela estimulação do Reflexo de Bezold-Jarisch e do Quimiorreflexo.
- ✓ A infusão intravenosa de Ang II promove alterações nas respostas cardiovasculares e reflexas em camundongos com deleção e com superexpressão no cérebro do receptor da Ang-(1-7), Mas.
- ✓ O receptor da Ang-(1-7), Mas, participa de forma importante da modulação dos efeitos cardiovasculares promovidos pela Ang II.
- ✓ A deleção do receptor da Ang-(1-7), Mas, altera os níveis basais de PAM em camundongos FVBN não anestesiados, demonstrando que o eixo Ang-(1-7)/Mas, contribui para a manutenção tônica dos parâmetros cardiovasculares.
- ✓ A Ang-(1-7) endógena central participa da modulação das respostas bradicárdica e taquicárdica barorreflexa em camundongos não anestesiados.
- ✓ O bloqueio dos componentes autonômicos simpático e parassimpático altera de maneira importante as respostas bradicárdica e taquicárdica barorreflexas em camundongos com alteração da expressão do receptor Mas.

- ✓ A deleção do receptor da Ang-(1-7), receptor Mas, promove alterações nos componentes autonômicos simpático e parassimpático cardíacos que mantêm a homeostase cardíaca.

O papel da Ang-(1-7) na manutenção da homeostase cardiovascular é muito discutido na literatura. Em nosso estudo, utilizando camundongos submetidos à manipulação da expressão gênica do receptor Mas, demonstramos a efetiva participação da Ang-(1-7) via receptor Mas na manutenção e controle das variáveis cardiovasculares. Se a deleção do receptor da Ang-(1-7), compromete as respostas cardiovasculares reflexas por conta de alterações funcionais e morfológicas cardíacas; por conta de alterações na transmissão sináptica e liberação de neurotransmissores em áreas do SNC, relacionadas ao controle das funções cardiovasculares, ou de ambos, não podemos afirmar ainda. Em contrapartida, podemos afirmar que alterações funcionais cardiovasculares reflexas importantes ocorrem durante a deleção do receptor da Ang-(1-7), receptor Mas.

Considerando os resultados do presente estudo, destacamos a importância da interação Ang-(1-7)/Mas contrabalanceando as ações clássicas da Ang II/AT₁ para a manutenção da atividade autonômica cardíaca, assim como na modulação das respostas cardiovasculares reflexas e ainda na manutenção dos valores basais de PA e FC. Estes resultados associados aos dados da literatura, ratificam a relevância do potencial efeito fisiológico que a Ang-(1-7), assim como seu receptor Mas, desempenham sobre o controle das funções cardiovasculares e conseqüente manutenção da homeostase.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ACCORSI-MENDONÇA D., LEAO R.M., AGUIAR J.F., VARANDA W.A., MACHADO B.H. Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract of rat brain stem slices. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 292: R396-R402, 2007.
- ALBISTON A. L., McDOWALL S. G., MATSACOS D., SIM P., CLUNE E., MUSTAFA T., LEE J., MENDELSON F.A.O., SIMPSON R. J., CONNOLLY L. M., CHAI S. Y. Evidence that the Angiotensin IV (AT₄) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 276 (52): 48623-6, 2001.
- ALENINA N. Mas expression in mice. PhD tesis, Max-Delbrück Center – Berlin – Buch - Germany 2003.
- ALLEN A.M. Angiotensin AT₁ receptor-mediated excitation of rat carotid body chemoreceptor afferent activity. *J. Physiol.* 510: 773-781, 1998.
- ALLEN A.M., MOELLER J., JENKINS T.A., ZHUO J., ALDRED G.P., CHAI S.Y. MENDELSON F.A.O. Angiotensin receptor in the nervous system. *Brain Research Bulletin* vol. 47, nº 1 : 17-28, 1998.
- AL-UBAIDI M.R., BROCK D., SICILIANO M.J. Assignment of the homolog of the MAS1 oncogene to mouse chromosome 17. *Genomics* 13(2):487, 1992.
- ALZAMORA A.C., SANTOS R.A.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. Baroreflex modulation by angiotensins at the rat rostral and caudal ventrolateral medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1027-R1034, 2006.
- ALZAMORA A.C., SANTOS R.A.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. Hypotensive effect of Ang II and Ang-(1-7) at the caudal ventrolateral medulla involves different mechanisms. *Am J Physiol* 283(5): R1187-R1195, 2002.
- AMBROZ C., CLARK A.J.L., CATT K.J. The Mas oncogene enhances angiotensin-induced [Ca²⁺]_i responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. *Biochem. Biophys. Acta* 1133: 107-111, 1991.

- ANDRAWIS N.S., BROCK T.A., DZAU V.J., PRATT R.E. Mas oncogene receptor coupling and peptide specificity in Balb 3T3 and vascular smooth muscle cells. *Am J Med Sci* 302(6): 329-34, 1991.
- ANGELIS K. De, WICHI R.B., JESUS W.R.A., MOREIRA E.D., MORRIS M., KRIEGER E.M., IRIGOYEN M.C. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J. Appl. Physiol.* 96: 2174-2178, 2004.
- ARDAILLOU R. Angiotensin II receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 (Suppl 11): S30-39, 1999.
- AVERILL D.B., DIZ D.I. Angiotensin peptides and the baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Research Bull* 51(2): 119-128, 2000.
- AVIADO D.M., AVIADO D.G. The Bezold-Jarisch Reflex: A historical Perspective of Cardiopulmonary Reflexes. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 940: 48-58, 2001.
- BADER M., PETERS J., BALTATU O., MULLER D. N., LUFT F. C., GANTEN D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J. Mol. Med.* 79: 76-102, 2001.
- BEAULIEU P., LAMBERT C. Peptidic regulation of heart rate and interactions with the autonomic nervous system. *Cardiovascular Research* 37: 578-585, 1998.
- BECKER L.K., SANTOS R.A., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. The angiotensin-(1-7) receptor Mas is present in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Abstract 59th CHBPR*, October 2005.
- BENDLE R.D., MALPAS S.C., HEAD G.A. Role of endogenous angiotensin II on sympathetic reflexes in conscious rabbits. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 272: R1816-R1825, 1997.
- BICKERTON R., BUCKLEY J. Evidence for a central mechanism of angiotensin induced hypertension. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 106: 834-837, 1961.
- BISCOE T.J., DUCHEN M.R. Cellular basis of transduction in carotid chemoreceptors. *Am. J. Physiol.* 258 (6 part 1): L271-L278, 1990.

- BLOCK C.H., SANTOS R.A.S., BROSNIHAN K.B., FERRARIO C.M. Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. *Peptides* 9: 1395-1401, 1988.
- BOTELHO-SANTOS G.A., SAMPAIO W.O., REUDELHUBER T.L., BADER M., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., SANTOS R.A.S. Expression of an angiotensin-(1-7) producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance. *Am J Physiol Heart Cir Physiol*, in press, 2007.
- BRASZKO J. J., WLASIENKO J., KOZIOLKIEWIEZ W., JANECKA A., WISNIEWSKI K. The 3-7 fragment of angiotensin II is probably responsible for its psychoactive properties. *Brain Research* 554: 49-54, 1991.
- BRISTOW J.D., HONOUR A.J., PICKERING G.W., SLEIGHT P., SMYTH H.S. Diminished reflex sensitivity in high blood pressure. *Circulation* 39: 48-54, 1969.
- BRITTO R.R., SANTOS R.A., FAGUNDES-MOURA C.R., KHOSLA M.C., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. *Hypertension* 30 (3 pt 2): 549-556, 1997.
- BUNNEMANN B., FUXE K., METZGER R., MULLINS J., JACKSON T.R., HANLEY M.R., GANTEN D. Autoradiographic localization of mas-protooncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. *Neurosci. Lett.* 114: 147-153, 1990.
- CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., DIZ D.I., FERRARIO C.M. Baroreceptor reflex modulation by angiotensin II at the nucleus tractus solitarii. *Hypertension* 11 [Suppl I]: I-167-I-171, 1988.
- CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., DIZ D.I., SANTOS R.A.S., KHOSLA M.C., BROSNIHAN K.B., FERRARIO C.M. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol* 257: H324-H329, 1989.
- CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., HAIBARA A.S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. *Rev. Bras. Hipertens.* 8(1): 30-40, 2001.
- CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., HERINGER S.B., BATISTA E.N., KHOSLA M.C., SANTOS R.A.S. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am.J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 32: R89-R94, 1992.

- CAMPEN M.J., TAGAITO Y., JENKINS T.P., BALBIR A., O'DONNELL C.P. Heart rate variability responses to hypoxic and hypercapnic exposures in different mouse strains. *J Appl Physiol* 99: 807-813, 2005.
- CAMPEN M.J., TAGAITO Y., JENKINS T.P., SMITH P.L., SCHWARTZ A.R., O'DONNELL C.P. Phenotypic differences in the hemodynamic response during REM sleep in six strains of inbred mice. *Physiol Genomics* 11: 227-234, 2002.
- CASTRO C.H., SANTOS R.A.S., WALTHER T., ALENINA N., BADER M., ALMEIDA A.P. Effects of genetic deletion of the G-protein-coupled receptor Mas on cardiac function during ischemia and reperfusion in the mouse isolated perfused heart. *Hypertension* 43(6):1350 (abstract), 2004.
- CEBRA-THOMAS J.A., TSAI J-Y., PILDER S.H., COPELAND N.G., JENKINS N.A., SILVER L.M. Localizations of the Mas proto-oncogene to a densely marked region of mouse chromosome 17 associated with genomic imprinting. *Genomics* 13: 444-446, 1992.
- CHALMERS J. Brain amines and models of experimental hypertension. *Circ. Res.* 36: 469-480, 1975.
- CHALMERS J., PILOWSKY P. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. *J Hypertens* 9: 675-694, 1991.
- CHAPLEAU M.W., HAJDUCZOK G., ABOUD F.M. Mechanisms of resetting of arterial baroreceptors: as overview. *Am J Med Sci* 295(4): 327-334, 1988.
- CHAPPELL M.C., IYER S.N., DIZ D. I., FERRARIO C.M. Antihypertensive effects of angiotensin-(1-7). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 31: 1205-1212, 1998.
- CHAPPELL M.C., TALLANT E.A., BROSNIHAN K.B., FERRARIO C.M. Processing of angiotensin peptides by NG108-15 neuroblastoma X glioma hybrid cell line. *Peptides* 22: 375-380, 1990.
- CHAVES G. Z., CALIGIORNE S. M., SANTOS R. A., KHOSLA M. C., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. 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* 18(12): 1841-1848, 2000.
- CHEN Y., JOAQUIM L.F., FARAH V.M., WICHI R.B., FAZAN JR. R., SALGADO H.C., MORRIS M. Cardiovascular autonomic control in mice lacking angiotensin AT_{1a} receptors. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 288: R1071-R1077, 2005.
- CHIANCA JR. D., MACHADO B.H. The sensitivity of the Bezold-Jarisch reflex is increased in rats with sinoaortic deafferentation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27: 775-781, 1994.
- CHOLEWA B.C., MEISTER C.J., MATTSON D.L. Importance of the renin-angiotensin system in the regulation of arterial blood pressure in conscious mice and rats. *Acta Physiol Scand* 183: 309-320, 2005.
- COLEMAN T.G. Arterial baroreflex control of heart rate in the conscious rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 238: H5150H520, 1980.
- COLERIDGE H.M., COLERIDGE J.C.G., DANGEL A., KIDD C., LUCK J.C., SLEIGHT P. Impulses in slowing conducting vagal fibers from afferent endings in the veins atria and arteries of dogs and cats. *Cir. Res.* 33: 87-97, 1973.
- COLERIDGE J.C., COLERIDGE H.M. Aferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 99: 1-10, 1984.
- COLLISTER J.P., HENDEL M.D. The role of Ang-(1-7) in mediating the chronic hypotensive effects of losartan in normal rats. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 4(3):176-179, 2003.
- DALÓ N.L., LARSON A.A. Effects of urethane and ketamine on substance p and excitatory amino acid-induced behavior in mice. *European Journal of Pharmacology* 184: 173-177, 1990.
- DAMPNEY R.A.L., GOODCHILD A.K., ROBERTSON L.G., MONTGOMERY W. Role of ventrolateral medulla in vasomotor regulation: a correlative anatomical and physiological study. *Brain Res* 249: 223-235, 1982.

- DAMPNEY R.A.L., Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol. Rev* 74(2): 323-64, 1994.
- DAMPNEY R.A.L., HORIUCHI J. Functional organization of central cardiovascular pathways: studies using *c-fos* gene expression. *Progress in Neurobiology* 71: 359-384, 2003.
- De GASPARO M., CATT K.J., INAGAMI T., WRIGHT J.W., UNGER T. International union of pharmacology, XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52(3): 415-472, 2000.
- DESAI K.H., SATO R., SCHAUBLE E., BARSH G.S., KOBILKA B.K., BERNSTEIN D. Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tool to study models of cardiac disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 41: H1053-H1061, 1997.
- DESAI K.H., SATO R., SCHAUBLE E., BARSH G.S., KOBILKA B.K., BERNSTEIN D. Cardiovascular indexes in the mouse at rest and with exercise: new tools to study models of cardiac disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 272: H1053-H1061, 1997.
- DESCHEPPER C.F., OLSON J.L., OTIS M., GALLO-PAYER N. Characterization of blood pressure and morphological traits in cardiovascular-related organs in 13 different inbred mouse strains. *J Appl Physiol* 97: 369-376, 2004.
- DIZ A.I., JESSUP J.A., WESTWOOD B.M., BOSCH S.M., VINSANT S., GALLAGHER P.E., AVERILL D.B. Angiotensin peptides as neurotransmitters/neuromodulators in the dorsomedial medulla. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29: 473-482, 2002.
- DONOGHUE M., HSIEH F., BARONAS E., GODBOUT K., GOSSELIN M., STAAGLIANO N., DONOVAN M., WOOLF B., ROBISON K., JEYASEELAN R., BREITBART R.E., ACTON S. A Novel Angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circulation Research* 87: e1-e9, 2000.
- DOOBAY M.F., TALMAN L.S., OBR D., TIAN X., DAVISSON R.L., LAZARTIGUES E. Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with over expression of the brain renin angiotensin system. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol*, 292: R373-R381, 2007.

- DOWARD P.K., RUDD C.D. Influence of brain rennin-angiotensin system on renal sympathetic and cardiac baroreflexes in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 260: H770-H778, 1991.
- DU X-J., COX H.S., DART A.M., ESLER M.D. Depression of efferent parasympathetic control of heart rate in rats with myocardial infarction: effect of losartan. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 31: 937-944, 1998.
- DZAU V. J. Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: emphasis on cardiovascular control. *J. Hypertens.* (Suppl 3): S7-S12, 1988.
- FERNANDES K. B. P., CRIPPA G. E., TAVARES R. F., ANTUNES-RODRIGUES J., CORREA F. M. A. Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline injection into the cingulate cortex of unanesthetized rats. *Neuropharmacology* 44: 757-763, 2003.
- FERRARIO C. M., CHAPPELL M. C., TALLANT E.A., BROSNIHAN K.B., DIZ D.I. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 30(2): 535-541, 1997.
- FERRARIO C.M., SANTOS R.A.S., BROSNIHAN K.B., BLOCK C.H., SCHIAVONE M.T., KHOSLA M.C., GREENE L.J. A hypothesis regarding the function of angiotensin peptides in the brain. *Clinical and Experimental Hypertension A10* (Suppl 1): 107-121, 1988.
- FERREIRA A.J., SANTOS R.A.S. Cardiovascular actions of Angiotensin-(1-7). *Braz. J. Méd. Biol. Res.* 38(4): 499-507, 2005.
- FLUCKIGER J. P., SONNAY M., BOILLAT N., ATKINSON J. Attenuation of the baroreceptor reflex by general anesthetic agents in the normotensive rat. *Eur J Pharmacol* 109: 105-109, 1985.
- FONTES M.A.P., BALTATU O., CALIGIORNE S.M., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., GANTEN D., BADER M., SANTOS R.A.S. Angiotensin peptides acting at rostral ventrolateral medulla contribute to hypertension of TRG (mREN2)27 rats. *Physiol. Genomics* 2: 137-142, 2000.
- FONTES M.A.P., MARTINS PINGE M.C., NAVES V., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., LOPES O.U., KHOSLA M.C., SANTOS R.A.S. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensin and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. *Brain Research* 750(1-2): 305-310, 1997.

- FONTES M.A.P., SILVA L.C.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., KHOSLA M.C., GUERTZENSTEIN P.G., SANTOS R.A.S. Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventrolateral medulla acting through specific receptors. *Brain Research* 665: 175-180, 1994.
- FRANCESCHINI D., ORR-URTREGER A., YU W., MACKEY L.Y., BOND R.A., ARMSTRONG D., PATRICK J.W., BEAUDET A.L., BIASI M.D. Altered baroreflex responses in $\alpha 7$ deficient mice. *Behavioral Brain Research* 113:3-10, 2000.
- FRANCHINI K.G., KRIEGER E.M. Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic denervated rat. *Am J Physiol* 262: R677-R683, 1992.
- FRANCHINI K.G., KRIEGER E.M. Neurogenic hypertension in the rat. In: Ganten D (ed.) handbook of hypertension. Experimental and genetic models. Amsterdam, Elsevier Publishers Company: 119-146, 1993.
- FUKUDA Y., SATO A., SUZUKI A., TRZEBSKI A. Autonomic nerve and cardiovascular responses to changing blood oxygen and carbon dioxide levels in the rat. *J Auton Nerv Syst* 28: 61-74, 1989.
- FUNG M-L., LAM S.Y., DONG X., CHEN Y., LEUNG P.S. Postnatal hypoxemia increases angiotensin II sensitivity and up-regulates AT_{1a} angiotensin receptors in rat carotid body chemoreceptors. *Journal of Endocrinology* 173: 305-313, 2002.
- GALLAGHER P.E., CHAPPELL M.C., FERRARIO C.M., TALLANT A. Distinct roles for Ang II and Ang-(1-7) in the regulation of angiotensin-converting enzyme 2 in rat astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C420–C426, 2006.
- GANONG W. F. Origin of the angiotensin II secreted by cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 205: 213-219, 1994.
- GARREAU I., CHANSEL D., VANDERMEERSCH S., FRUITIER I., PIOT J. M., ARDILLOU R. Hemorphins inhibit angiotensin IV binding and interact with aminopeptidase N. *Peptides* 19: 1339-1348, 1998.
- GAUDET E., GODWIN S.J., HEAD G.A. Effects of central infusion of Ang II and losartan on the cardiac baroreflex in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H558-H566, 2000.

- GAUDET E.A., GODWIN S.J., HEAD G.A. Role of central catecholaminergic pathways in the actions of endogenous Ang II on sympathetic reflexes. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 275: R1174-R1184, 1998.
- GEHRMANN J., HAMMER P.E., MAGUIRE C.T., WAKIMOTO H., TRIEDMAN J.K., BERUL C.I. Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H733-H740, 2000.
- GIRONACCI M.M., VALERA M.S., YUJNOVSKY I., PEÑA C. Angiotensin-(1-7) inhibitory mechanism of norepinephrine release in hypertensive rats. *Hypertension* 44:783-787, 2004.
- GROSS V., OBST M., LUFT F.C. Insights into angiotensin II receptor function through AT₂ receptor knockout mice. *Acta Physiol Scand* 181: 487-494, 2004.
- GROSS V., PLEHM R., TANK J., JORDAN J., DIEDRICH A., OBST M., LUFT F.C. Heart rate variability and baroreflex function in AT₂ receptor-disrupted mice. *Hypertension* 40: 207-213, 2002.
- GUAZZI M., BACCELI G., ZANCHETTI A. Reflex chemoceptive regulation of arterial pressure during natural sleep in the cat. *Am J Physiol* 214(5): 969-978, 1968.
- HABECK J.O. Peripheral arterial chemoreceptor and hypertension. *J. Auton. Nerv. Syst.* 34: 1-8, 1991.
- HARGIND J.W., FELIX D. Angiotensin-sensitive neurons in the rat paraventricular nucleus: relative potencies of angiotensin II and angiotensin III. *Brain Res.* 424: 130-134, 1987.
- HÄUSER W., JÖHREN O., SAAVEDRA J.M. Characterization and distribution of angiotensin II receptor subtypes in the mouse brain. *European Journal of Pharmacology* 348: 101-114, 1998.
- HEAD G.A., SAIGUSA T., MAYOROV D.N. Angiotensin and baroreflex control of circulation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35: 1047-1059, 2002.
- HEIN L., BARSH G.S., PRATT R.E., DZAU V.J., KOBILKA B.K. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor gene in mice. *Nature* 377: 744-747, 1995.

- HERNERT H., MOGA M.M., SAPER C.B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 293: 540-580, 1990.
- HEYMANS C., BOUCKAERT J.J. Sinus carotidien et reflexes respiratoires. *C.R. Soc. Biol.* 103: 498-500, 1930.
- HIROOKA Y., POTTS P.D., DAMPNEY R.A.L. Role of angiotensin II receptor subtypes in mediating sympathoexcitatory effects of exogenous and endogenous angiotensin peptides in the rostral ventrolateral medulla of the rabbit. *Brain Res* 772: 107-114, 1997.
- ISHII T., KUWAKI T., MASUDA Y., FUKUDA Y. Postnatal development of blood pressure and baroreflex in mice. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* 2001; 94:34-41.
- ITO M., OLIVERIO M.I., MANNON P.J., BEST C.F., MAEDA N., SMITHIES O., COFFMANU T.M. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci* 92: 3521-3525, 1995.
- ITO S., SVED A.F. Pharmacological profile of depressor response elicited by sarthran in rat ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279: H2961-2966, 2000.
- JACKSON T.R., BLAIR A.C., MARSHALL J., GOEDERT M., HANLEY M.R. The Mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 335: 437-440, 1988.
- JACKSON TR, HANLEY MR. Tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate inhibits mas/angiotensin receptor-stimulated inositol phosphate production and intracellular Ca²⁺ elevation in the 401L-C3 neuronal cell line. *FEBS Lett* 251(1-2):27-30, 1989.
- JANSSEN B.J.A., CELLE T.D., DEBETS J.J.M., BROUNS AA.E., CALLAHAN M.F., SMITH T.L. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1618-H1624, 2004.
- JANSSEN B.J.A., LEENDERS P.J.A., SMITS J.F.M. Short-term and long-term blood pressure and heart rate variability in the mouse. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 278: R215-R225, 2000.

- JANSSEN B.J.A., SMITS J.F.M. Autonomic control of blood pressure in mice: basic physiology and effects of genetic modification. *Am J Physiol Regulatory Integrative Com Physiol* 282: R1545-R1564, 2002.
- KASHIHARA K., TAKAHASHI Y., CHATANI K., KAWADA T., ZHENG C., LI M., SUGIMACHI M., SUNAGAWA K. Intravenous Angiotensin II does not affect dynamic baroreflex characteristics of the neural or peripheral arc. *Japanese Journal of Physiology* 53: 135-143, 2003.
- KIRCHHEIM H.R. Systemic arterial baroreceptors reflexes. *Physiol Rev* 56: 100-176, 1976.
- KOHARA K., BROSNIHAN K.B., CHAPPELL M.C., KHOSLA M.C., FERRARIO C.M. Angiotensin-(1-7): A member of circulating angiotensin peptides. *Hypertension* 17: 131-138, 1991.
- KOSTENIS E., MILLIGAN G. CHRISTOPOULOS A., SANCHEZ-FERRER C.F., HERINGER-WALTHER S., SEXTON P.M., GEMBARDT F., KELLETT E., MARTINI L., VANDERHEYDEN P., SCHULTHEISS H-P, WALTHER T. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*, 111: 1806-1813, 2005.
- KREGE J., JOHN S., LANGENBACH L. HODGIN J.B., HAGAMAN J.R., BACHMAN E.S., JENNETTE J.C., O'BRIEN D.A., SMITHIES O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 375: 146-148, 1995.
- KRIEGER E.M. Neurogenic hypertension in the rat. *Cir. Res.* 15: 511-521, 1964.
- KRIEGER E.M. Time course of baroreceptor resetting in acute hypertension. *Am J Physiol* 218: 486-490, 1970.
- KUMAR M, GRAMMAS P, GIACOMELLI F, WIENER J. Selective expression of c-mas proto-oncogene in rat cerebral endothelial cells. *Neuroreport* 8(1): 93-6, 1996.
- LAMBERT C., GODIN D., FORTIER P., NADEAU R. Direct effects in vivo of angiotensin I and II on the canine sinus node. *Can J Physiol Pharmacol* 69: 389-392, 1991.
- LAWRENCE A.C., EVIN G., KLADIS A., CAMPBELL D.J. An alternative strategy for the radioimmunoassay of angiotensin peptides using amino-terminal-directed antisera:

- measurement of eight angiotensin peptides in human plasma. *Journal of Hypertension* 8: 715, 1990.
- LAZARTIGUES E., DUNLAY S.M., LOIHL A.K., SINNAYAH P., LANG J.A., ESPELUND J.J., SIGMUND C.D., DAVISSON R.L. Brain-selective overexpression of angiotensin (AT₁) receptors causes enhanced cardiovascular sensitivity in transgenic mice. *Circ Res* 90: 617-624, 2002.
- LEENEN F.H.H., PROVOST A.P. Maintenance of blood pressure by beta adrenoceptor mediated renin release during different forms of anaesthesia in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 59: 364-370, 1981.
- LEUNG P.S., FUNG M.L., TAM M.S.C. Renin-angiotensin system in the carotid body. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35: 847-854, 2003.
- LEUNG P.S., LAM S.Y., FUNG M.L. Chronic hypoxia up regulates the expression and function of AT₁ receptor in rat carotid body. *J. Endocrinol.* 167: 516-524, 2000.
- LIPMAN R.D., SALISBURY J.K., TAYLOR J.A. Spontaneous indices are inconsistent with arterial baroreflex gain. *Hypertension* 42: 481-487, 2003.
- LIU J-L., MURAKAMI H., SANDERFORD M., BISHOP V.S., ZUCKER I.H. Ang II an baroreflex function in rabbits with CHF and lesions of the area postrema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: H342-H350, 1999.
- LORENS J.N. A practical guide to evaluating cardiovascular, renal and pulmonary function in mice. *Am J Physiol Regulatory Integrative Com Physiol* 282: R1565-R1582, 2002.
- LUOH H.F., CHAN S.H.H. Participation of AT₁ and AT₂ receptor subtypes in the tonic inhibitory modulation of baroreceptor reflex response by endogenous angiotensins at the nucleus tractus solitarii in the rat. *Brain Research* 782: 73-82, 1998.
- MA X., ABOUD F.M., CHAPLEAU M.W. Analysis of afferent, central, and efferent components of the baroreceptor reflex in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283: R1033-R1040, 2002.

- MACGREGOR D.P., MURONE C., SONG K., ALLEN A.M., PAXINOS G., MENDELSON F.A.O. Angiotensin II receptor subtypes in the human central nervous system. *Brain Research* 675: 231-240, 1995.
- MACHADO B. H., BONAGAMBA L. G. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res* 576: 131-138, 1992.
- MACHADO B.H., MAUAD H., CHIANCA JR. D.A., HAIBARA A.S. COLOMBARI E. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. *Brazilian Journal of Medical Research* 30: 533-543, 1997.
- MAGGI C.A., MELI A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations. *Experimentia* 42: 109-114, 1986.
- MAGGI C.A., MELI A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system. *Experimentia* 42: 292-297, 1986.
- MARSHALL J.M. Interaction between the responses to stimulation of peripheral chemoreceptors and baroreceptors: the importance of chemoreceptor activation of the defence areas. *J Auton Nerv Syst* 3: 389-400, 1981.
- MARSHALL J.M. Analysis of cardiovascular responses evoked following changes in peripheral chemoreceptor activity in the rat. *J Physiol* 394: 393-414, 1987.
- MARTIN K.A., GRANT S.G., HOCKFIELD S. The mas protooncogene is developmentally regulated in the rat central nervous system. *Brain Research* 68: 75-82, 1992.
- MARY D.A.S.G. Electrophysiology of atrial receptors. In: *Cardiogenic Reflexes*. Ed. by R. Hainsworth, P.N. McWilliam and D.A.S.G. Mary. Oxford University Press. Oxford pp. 3-17, 1987.
- MATTSON D.L. Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice. *AJH* 14: 405-408, 2001.
- McGILLIS J.P., SUDDUTH-KLINGER J., HARROWE G., MITSUHASHI M., PAYAN D.G. Transient expression of the angiotensin II receptor: a rapid and functional analysis of a

- calcium-mobilizing seven-transmembrane domain receptor in COS-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 165(3):935-41, 1989.
- McKINLEY M.J., McALLEN R.M., PENNINGTON G. L., SMARDENCAS A., WEISINGER R.S., OLDFIELD B.J. Physiological Actions of Angiotensin II Mediated by AT₁ and AT₂ receptors in the brain. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* Suppl. 3, S99-S104, 1996.
- METZGER R., BADER M., LUDWIG T., BERBERICH C., BUNNEMANN B., GANTEN D. Expression of the mouse and rat Mas protooncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Letters* 357: 27-32, 1995.
- MEYRELLES S.S., BERNARDES C.F., MODOLO R.P., MILL J.G., VASQUES E.C. Bezold-Jarisch reflex in myocardial infarcted rats. *Journal of the Autonomic Nervous System* 63: 144-152, 1997.
- MICHELINI L.C., SALGADO H.C. Mecanismos neuro-humorais na regulação da pressão arterial. In: Hipertensão Arterial – Celso Amodeo, Ed. Sarvier – São Paulo, pp. 31-45, 1997.
- MIFFLIN S.W. Inhibition of chemoreceptor inputs to nucleus of tractus solitarius neurons during baroreceptor stimulation. *Am J Physiol* 265: R14-R20, 1993.
- MIFFLIN S.W. Short-term potentiation of carotid sinus nerve inputs to neurons in the nucleus of the solitary tract. *Respir. Physiol.* 110: 229-236, 1997.
- MOURA M.M., SANTOS R.A.S, FONTES M.A.P. Evidence for a functional cardiac interaction between Losartan and Angiotensin-(1-7) receptors revealed by orthostatic tilting test in rats. *British Journal of Pharmacology* 144: 755-760, 2005.
- MORRISON S.F., CAO W.H. Differential adrenal sympathetic preganglionic neurons regulate epinephrine and norepinephrine secretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1763-R1775, 2000.
- MUKOYAMA M, NAKAJIMA M, HORIUCHI M, SASAMURA H, PRATT RE, DZAU VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 268(33):24539-42, 1993.

- MURPHY A.Z., ENNIS M., SHIPLEY M.T., BEHBEHANI M.M. Directionally specific changes in arterial pressure induce differential patterns of fos expression in discrete areas of the rat brainstem: a double-labeling study for Fos and catecholamines. *J Comp Neurol* 349: 36-50, 1994.
- NEGRÃO C.E., MOREIRA E.D., SANTOS M.C.L.M., FARAH V.M., KRIEGER E.M. Vagal function impairment after exercise training. *J. Appl. Physiol.* 72(5): 1749-1753, 1992.
- NISHIMURA H. Angiotensin receptors - evolutionary overview and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. Part. A* 128: 11-30, 2001.
- OLIVEIRA D.R., SANTOS R.A.S., SANTOS G.F.P., KHOSLA M.C., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. Changes in the baroreflex control of heart rate produced by central infusion of selective angiotensin antagonists in hypertensive rats. *Hypertension* 27: 1284-1290, 1996.
- OLIVEIRA R.C., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., SANTOS R.A.S. The pressor effect of angiotensin-(1-7) at the rostral ventrolateral medulla is multimediated. *J Hypertension* 16 (suppl 2):S129 (P16-28 –abstract), 1998.
- PATON J.F.R. Pattern of cardiorespiratory afferent convergence to solitary tract neurons driven by pulmonary vagal C-fiber stimulation in the mouse. *J. Neurophysiol* 79: 2365-2373, 1998.
- PATON J.F.R., BUTCHER J.W. Cardiorespiratory reflexes in mice. *Journal of the Autonomic Nervous System* 68: 115-124, 1998.
- PATON J.F.R., KASPAROV S. Differential effects of angiotensin II on cardiorespiratory reflexes mediated by nucleus tractus solitarii – a microinjection study in the rat. *Journal of Physiology* 521(1): 213-225, 1999.
- PATON J.F.R., WAKI H., KASPAROV S. In vivo gene transfer to dissect neuronal mechanisms regulating cardiorespiratory function. *Can. J. Physiol. Pharm.* 81: 311-316, 2003.
- PAXINOS G., FRANKLIN K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2º ed. Academic Press, 2001.
- PEACH M. J. The rennin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. *Physiol. Rev.* 55: 313-369, 1977.

- PEOTTA V.A., VASQUEZ E.C., MEYRELLES S.S. Cardiovascular neural reflexes in L-Name-induced hypertension in mice. *Hypertension*, 38[part2]: 555-559, 2001.
- PERSSON P., EHMKE H., KIRCHHEIM H., SELLER H. Effect of sino-aortic denervation in comparison to cardiopulmonary deafferentation on long-term blood pressure in conscious dogs. *Pflugers Arch* 411: 160-166, 1988.
- PERSSON P.B., EHMKE H. KIRCHHEIM H.R. Cardiopulmonary arterial baroreceptor interaction in control of blood pressure. *NIPS* 4: 56-59, 1989.
- PHILLIPS M. I., SPEAKMEN E. A., KIMURA B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin-angiotensin system. *Regul. Pept.* 43: 1-20, 1992.
- PHILLIPS M. I., WEYHENMEYER J. A., FELIX D., GANTEN D. Evidence for an endogenous brain rennin-angiotensin system. *Fed Proe* 38: 2260-2266, 1979.
- PHILLIPS M.I., SUMMERS C. Angiotensin II in central nervous system physiology. *Reg. Pep* 78: 1-11, 1998.
- PHILLIPS M.I., SUMNERS C. Angiotensin II in central nervous system physiology. *Reg. Pep.* 78: 1-11, 1998.
- PICCINI N., KNOPF J.L., GROSS K.W. A DNA polymorphism, consistent with gene duplication, correlates with high renin levels in the mouse submaxillary gland. *Cell* 30: 205-213, 1982.
- PILOWSKY P.M., GOOGCHILD A.K. Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on. *Journal of Hypertension* 20: 1675-1688, 2002.
- POTTER E.K. Angiotensin inhibits action of vagus nerve at the heart. *Br J Pharmacol* 75: 9-11, 1982.
- POTTS P.D., HORIUCHI J., COLEMAN M.J., DAMPNEY R.A.L. The cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) in the rostral and caudal ventrolateral medulla of the rabbit. *Brain Research* 877: 58-64, 2000.
- POYNER D.R., HAWKINS P.T., BENTON H.P., HANLEY M.R. Changes in inositol lipids and phosphates after stimulation of the MAS-transfected NG115-401L-C3 cell line by mitogenic and non-mitogenic stimuli. *Biochem J* 271(3): 605-11, 1990.

- PRZYBYLSKI J. Alveolar hyperventilation in young spontaneously hypertensive rats. (Abstract). *Int. Res. Commun. Syst. Med. Sci.* 6: 315, 1978.
- RABIN M., BIRNBAUM D., YOUNG D., BIRCHMEIER C., WINGLER M., RUDDLE F.H. Human ros 1 and mas 1 oncogenes located in regions of chromosome 6 associated with tumor-specific rearrangements. *Oncogene Res.* 1: 169-178, 1987.
- RAO S., VERKMAN A.S. Analysis of organ physiology in transgenic mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279: C1-18, 2000.
- REID I.A., CHOU L. Analysis of the action of angiotensin II on the baroreflex control of heart in conscious rabbits. *Endocrinology* 126(5): 2749-2756, 1990.
- REIS D.J., ROSS C.A., RUGGIERO D.A., GRANATA A.R., JOH T.H. Role of adrenaline neurons of ventrolateral medulla (the C1 group) in tonic and phasic control of arterial pressure. *Clin Exp Hypertens* 6: 221-241, 1984.
- RIESEWIJK A.M., SCHEPENS M.T., MARIMAN E.M., ROPERS H-H, KALSCHEUER V. The Mas protooncogene is not imprinted in humans. *Genomics* 35: 380-382, 1996.
- ROCHA I., BRÁS-ROSÁRIO L., AMPARO-BARROS M., SILVA-CARVALHO L. Angiotensin AT₁ receptor antagonist losartan and the defense reaction in the anaesthetized rat. Effect on the carotid chemoreflex. *Experimental Physiology* 88 (3): 309-314, 2003.
- ROKS A.J.M., VAN GEEL P.P., PINTO Y.M., BUIKEMA H., HENNIN R.H., ZEEUW D., VAN GILST W.H. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human rennin-angiotensin system. *Hypertension* 34: 296-301, 1999.
- SAAVEDRA J. M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr. Rev.* 13: 329-280, 1992.
- SAAVEDRA J.M., VISWANATHAN M., SHIGEMATSU K. Localization of angiotensin AT₁ receptors in the rat heart conduction system. *Eur J Pharmacol* 235(2-3): 301-303, 1993.
- SAETHER K., HILAIRE G., MONTEAU R. Dorsal and ventral respiratory groups of neurons in the medulla of the rat. *Brain Res* 419: 87-96, 1987.
- SAITO K., GUTKIND J.S., SAAVEDRA J.M. Angiotensin II binding sites in the conduction system of rat hearts. *Am J Physiol* 253 (6 pt 2): H1618-H1622, 1987.

- SAKIMA A., AVERILL D.B., GALLAGHER P.E., KASPER S.O., TOMMASI E.N., FERRARIO C.M., DIZ D.I. Impaired heart rate baroreflex in older rats: role of endogenous angiotensin-(1-7) at the nucleus tractus solitarii. *Hypertension* 46: 333-340, 2005.
- SAMPAIO W.O., NASCIMENTO A.A.S., SANTOS R.A.S. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 284: H1985-H1994, 2003.
- SANTOS R. A. S., CAMPAGNOLE-SANTOS M. J. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27: 1033-1047, 1994.
- SANTOS R. A. S., CAMPAGNOLE-SANTOS M. J., ANDRADE S. P. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides* 91: 45-62, 2000.
- SANTOS R.A.S, BROSNIHAN K.B., JACOBSEN D.W., DICORLETO P.E., FERRARIO C.M. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension* 19 (Suppl II): II56-II61, 1992.
- SANTOS R.A.S., BROSNIHAN K.B., CHAPPELL M.C., PESQUERO J.L. CHERNICKY C.L., GREENE L.J., FERRARIO C.M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in dog brainstem. *Hypertension* 11: I153-I157, 1988.
- SANTOS R.A.S., BRUM J.M., BROSNIHAN K. B., FERRARIO C.M. The renin-angiotensin system during acute myocardial ischemia in dogs. *Hypertension* 15 (Suppl I): I121- I27, 1990.
- SANTOS R.A.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., BARACHO N.C.V., FONTES M.A.AP., SILVA L.C.S., NEVES L.A.A., OLIVEIRA D.R., CALIGIORNE S.M., RODRIGUES A.R.V., GROPEN JR. C., CARVALHO W.S., SIMÕES E SILVA A.C., KHOSLA M.C. 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* vol. 35(4): 293-298, 1994.
- SANTOS R.A.S., CASTRO C.H., GAVA E., PINHEIRO S.V.B., ALMEIDA A., PAULA R. D., CRUZ J.S., RAMOS A. S., ROSA K.T., IRIGOYEN M.C., BADER M., ALENINA N., KITTEN

- G.T., FERREIRA A.J. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor Mas knockout mice. *Hypertension* 47: 996-1002, 2006.
- SANTOS R.A.S., FERREIRA A.J., NADU A.P., BRAGA A.N.G., ALMEIDA A.P., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., BALATU O., ILIESCU R., REUDELHUBER T.L., BADER M. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardio protective effects in rats. *Physiological Genomics* 17(3):292-299, 2004.
- SANTOS R.A.S., FERREIRA A.J., PINHEIRO S.V.B., SAMPAIO W.O., TOUYZ R., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Invest Drugs* 14(8): 1019-1031, 2005.
- SANTOS R.A.S., SIMÕES E SILVA A.C., MARIC C., SILVA D.M.R., MACHADO R.P., BUHR I., HERINGER-WALTHER S., PINHEIRO S.V.B., LOPES M.T., BADER M., MENDES E.P., LEMOS V.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., SCHULTHEISS H-P., SPETH R., WALTHER T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *PNAS* vol. 100(14): 8258-8263, 2003.
- SASAKI K., YAMANO Y., BARDHAN S., IWAI N., MURRAY J.J., HASEGAWA M., MATSUDA Y., INAGAMI T. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351(6323): 230-3, 1991.
- SAPRU H.N., WANG S.C. Modification of aortic baroreceptor resetting in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 230: 664-674, 1979.
- SCHIAVONE M.T., SANTOS R.A.S., BROSNIHAN K.B., KHOSLA M.C., FERRARIO C.M. Release of vasopressin from the hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85: 4095-4098, 1988.
- SECHI L.A., GRIFFIN C.A., De CARLI S., SECHI G., SCHAMBELAN M., BARTOLI E. Angiotensin II receptors in the heart conduction tissue. *Minerva Cardioangiol.* 41 (11): 511-516, 1993.
- SEMPLE P.F., THOREN P., LEVER A.F. Vasovagal reactions to cardiovascular drugs: the first dose effect. *J. Hypertension* 1988; 6:601-606.

- SEVER P.S., HUGHES A. Angiotensin receptor antagonists and vaso-vagal attacks due to sensitization of the Bezold-Jarisch reflex? *J. Hum. Hypertension* 15(6): 437-8, 2001.
- SHEPHERD J.T., MANCIA G. Reflex control of the human cardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 105: 3-100, 1986.
- SHIMOKAWA A., KUNITAKE T., TAKASAKI M., KANNAN H. Differential effects of anesthetics on sympathetic nerve activity and arterial baroreceptor reflex in chronically instrumented rats. *Journal of the Autonomic Nervous System* 72: 46-54, 1998.
- SHUSTERMAN V., USIENE I., HARRIGAL C., LEE J.S., KUBOTA T., FELDMAN A.M., LONDON B. Strain-specific patterns of autonomic nervous system activity and heart failure susceptibility in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H2076-H2083, 2002.
- SIGMON D.H., BEIERWALTES W.H. Angiotensin II: Nitric oxide interaction and the distribution of blood flow. *Am J Physiol* 265: R1276-R1283, 1993.
- SILVA L.C.S., FONTES M.A.P., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., KHOSLA M.C., CAMPOS JR. R.R., GUERTZENSTEIN P.G., SANTOS R.A.S. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. *Brain Research* 613: 321-325, 1993.
- SMYTH H.S., SLEIGHT P., PICKERING G.W. Reflex regulation of arterial pressure during sleep in man: a quantitative method of assessing baroreflex sensitivity. *Circ. Res.* 24: 109-121, 1969.
- SUGAYA T., NISHIMATSU S., TANIMOTO K., TAKIMOTO E., YAMAGISHI T., IMAMURA K., GOTO S., IMAIZUMI K., HISADA Y., OTSUKA A., UCHIDA H., SUGIURA M., FUKUTA K., FUKAMIZU A., MURAKAMI K. Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J. Biol. Chem* 270: 18719-18722, 1995.
- SUN M.K., REIS D.J. Urethane directly inhibits chemoreflex excitation of medullary vasomotor neurons in rats. *Eur J Pharmacol.* 293(3): 237-243, 1995.
- THOMAS W.G., MENDELSON F.A.O. Angiotensin receptors: form and function and distribution. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35: 774-779, 2003.

- THORÉN P. Role of cardiac vagal C-fibers in cardiovascular control. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* vol. 86: 1-94, 1979.
- THRASHER T.N. Baroreceptors, baroreceptor unloading, and long-term control of blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol* 288: R819-R827, 2005.
- TIAN B., MENG Q.C., CHEN Y.F., KREGG J.H., SMITHIES O., OPARIL S. Blood pressure and cardiovascular homeostasis in mice having reduced or absent angiotensin-converting enzyme gene function. *Hypertension* 30(1 pt 1): 128-133, 1997.
- TIMMERMANS P.B.M.W.M., WONG P.C., CHIU A.T., HERBIN W.F., BENFIELD P., CARINI D.J., LEE R.J., WEXLER R.R., SAYE J.A.M., SMITH R.D. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45: 205-251, 1993.
- TRZEBSKI A., LIPSKI J., MAJCHERCZYK S., SZULCZYK P., CHURSCIELEWSKI L. Central organization and interaction of the carotid baroreceptor and chemoreceptor sympathetic reflex. *Brain Res* 87: 227-237, 1975.
- TRZEBSKI A. Arterial chemoreceptor reflex and hypertension. *Hypertension* 19: 562-566, 1992.
- UGGERE T.A., ABREU G.R., SAMPAIO K.N., CABRAL A.M., BISSOLI N.S. The cardiopulmonary reflexes of spontaneously hypertensive rats are normalized after regression of left ventricular hypertrophy and hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33:589-594, 2000.
- VAN GIERSBERGEN P. L. M., PALKOVITS M., JONG W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarius in cardiovascular regulation. *Physiol Rev* 72: 789-824, 1992.
- VASQUEZ E.C., MEYRELLES S.S., CABRAL A.M. Regulação neural periférica da pressão arterial. *Hiperativo*, volume 2 (3): 34-44, 1995.
- VASQUEZ E.C., MEYRELLES S.S., MAUAD H., CABRAL A.M. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30: 521-532, 1997.

- VERBERNE A.J., GUYENET P.G. Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in rat. *Am. J. Physiol.* 263 (6 pt 2): R1195-R1202, 1992.
- VILLAR A.J., PEDERSEN R.A. Parental imprinting of the Mas protooncogene in mouse. *Nature Genet.* 8: 373-379, 1994.
- VON BOHLEN UND HALBACH O., ALBRECHT D. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res* 326: 599-616, 2006.
- VON BOHLEN UND HALBACH O., WALTHER T., BADER M., ALBRECHT D. Interaction between Mas and the angiotensin AT₁ receptor in the amygdala. *Journal of Neurophysiology* 83: 2012-2020, 2000.
- WALTHER .T, BALSCHUN D., VOIGT J.P., FINK H., ZZUSCHRATTER W., BIRCHMEIER C., GANTEN D., BADER M. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J. Biol. Chem.* 273: 11867-11873, 1998.
- WALTHER T., WESSEL N., KANG N., MALBERG M., BADER M., VOSS A. Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 1-9, 2000.
- WELCHES W.R., SANTOS R.A.S., CHAPPELL M.C., BROSNIHAN K.B., GREENE L.J., FERRARIO C.M. Prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *Journal of Hypertension* 9: 631-638, 1991.
- WHORLOW S.L., ANGUS J.A., WRIGHT C.E. Endogenous angiotensin II and bradykinin delay attenuate the hypotension and N-type calcium channel blockade in conscious rabbits. *J. Cardiovascular Pharmacol.* 32: 951-961, 1998.
- WOLLERT K.C., DREXLER H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovasc. Res.* 43: 838-849, 1999.
- WRIGHT J.W., HARDING J.W. Brain angiotensin receptor subtypes AT₁, AT₂ and AT₄ and their functions. *Regulatory Peptides* 59: 269-295, 1995.
- WRIGHT J.W., HARDING J.W. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Research Rev.*17: 227-262, 1992.

- YANG S-N., LIPPOLDT A., JANSSON A., PHILLIPS M.I., GANTEN D., FUXE K. Localization of angiotensin II AT₁ receptor-like immunoreactivity in catecholaminergic neurons of the rat medulla oblongata. *Neuroscience* 81: 503-515, 1997.
- YE M., WYSOCKI J., NAAZ P., SALABAT M.R., LAPOINTE M.S., BATLE D. Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination? *Hypertension* 43: 1120-1125, 2004.
- YOUNG D., WAICHES G., BIRCHMETER C., FASANO O., WIGLER M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 45: 711-719, 1986.
- ZANCHETTI A., MANCIA G. Cardiovascular reflexes and hypertension. *Hypertension* 18 (suppl. III): 13-21, 1991.
- ZHUO J., MOELLER I., JENKINS T., CHAI S. Y., ALLEN A.M., OSHIRI M., MENDELSON F. A. O. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT₁, AT₂ and AT₄ receptors. *J. Hyp.* 16: 2027-2037, 1998.
- ZINI S., FOURNIE-ZALUSKI M. C., CHAUVEL E., ROQUES B. P., CORVOL P., LLORENS-CORTES C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in control of vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11968-11973, 1996.
- ZOHN I.E., SYMONS M., CHRZANOWSKA-WODNICKA M., WESTWICK J.K., DER C.J. Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac. *Mol. Cell. Biol.* 18: 1225-1235, 1998.