

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

TESE DE DOUTORADO

**CONTRIBUIÇÃO DA ANGIOTENSINA-(1-7) NO NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO PARA A
MANUTENÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA
ATIVIDADE SIMPÁTICA**

ANA QUÊNIA GOMES DA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO ANTÔNIO PELIKY FONTES

**BELO HORIZONTE
2007**

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

TESE DE DOUTORADO

**CONTRIBUIÇÃO DA ANGIOTENSINA-(1-7) NO NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO PARA A
MANUTENÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA
ATIVIDADE SIMPÁTICA**

*Programa de pós-graduação integrada-CNPq
Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Biofísica do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais
para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas*

ANA QUÊNIA GOMES DA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO ANTÔNIO PELIKY FONTES

**BELO HORIZONTE
2007**

Responsáveis por me trazer à vida.

Responsáveis por minha manutenção.

Responsáveis por atender minhas necessidades primárias, secundárias, terciárias e outras mais que eu inventar.

Responsáveis por me ensinar a andar, e se cair, levantar e seguir.

Responsáveis por me mostrar que existe um Deus, em quem posso confiar.

Responsáveis por me educar em princípios cristãos, morais e éticos.

Responsáveis legais por meus atos durante 18 anos.

Responsáveis mais legais ainda, e durante toda a vida pelo ser humano que formaram.

Responsáveis por me mostrar diversos caminhos, e deixar que eu escolhesse qual seguir.

Responsáveis ainda, pela idéia confortante, de que aonde quer que eu fosse, estariam sempre ao meu lado.

E se por qualquer motivo eu me perdesse em meio a tantas encruzilhadas, saberia que o caminho de volta era um só.

Responsáveis por me fazer entender, que se um dia é da caça, o outro será do caçador. Que tudo é aprendizado na matéria de vencer.

Responsáveis por mostrar que não existem barreiras intransponíveis e principalmente, que não há luta sem vitória!

Obviamente, vocês são os responsáveis pela minha vitória!

Nome dos pais e / ou responsáveis:

Jesuíno Gomes da Silva Filho

Maria do Carmo da Silva

À vocês dedico mais esta etapa da minha vida!

P.S: Responsáveis eternos pelo imenso amor e agradecimento que sinto ao pensar em vocês.

Agradecimentos

À Deus, meu amigo e guia, pela presença constante ao meu lado.

Ao Kyan, meu amor e amigo, por tornar a minha vida tão gostosa. Sua companhia torna momentos simples em especiais e faz a vida parecer um conto de fadas.

À minha irmã preferida Ana Queila, companheira e ídola, por me divertir, encher de elogios e saudade.

Ao Professor e amigo Marco Antônio, por ter me aceito como aluna, pela dedicação, disponibilidade, paciência e amizade durante estes anos. Sua ética, conhecimento e seriedade no que faz me fizeram te admirar ainda mais. Foi um privilégio trabalhar com você! Muito obrigada!

Ao professor Robson Santos pela ajuda e consultoria sempre presente. Por mostrar que ter satisfação em fazer o que se gosta, pode nos levar longe. Pela amizade, horas de ensaios e conversas pra me fazer esquecer, por uns momentos, de tudo o que aprendi.

Às professoras Maria José Campagnole-Santos e Andréa Haibara, pelo apoio direto e indireto e por poder absorver um pouco da experiência e conhecimento que vocês possuem!

Ao Zezé, pelos primeiros passos, disponibilidade em ajudar, e por me alegrar com suas histórias e brincadeiras.

Aos demais amigos do laboratório, o convívio com vocês certamente foi um fator a mais, a me motivar, durante a realização deste projeto.

SUMÁRIO:

Lista de figuras.....	x
Lista de tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas.....	xv
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xxi
1. Introdução.....	01
1.1 Grupamentos de neurônios premotores simpáticos envolvidos no controle da pressão arterial	01
1.2 O núcleo paraventricular do hipotálamo e a manutenção do tônus simpático e da pressão arterial.....	03
1.3 O sistema renina angiotensina.....	08
1.4 Sistema renina angiotensina cerebral, angiotensinas e núcleo paraventricular do hipotálamo.....	13
1.5 Considerações sobre a modulação simpática e de PA exercidas pelo PVN durante condições fisiológicas alteradas.....	18
1.5.1 Hipertensão induzida por hipóxia e hipercapnia intermitentes.....	18
1.5.2 Hiperosmolaridade Plasmática.....	20
1.6 Considerações sobre o modelo TGR(ASrAOGEN).....	22
2. Objetivo.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. Material e Métodos.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Anestesia.....	25
3.3 Procedimentos cirúrgicos.....	26
3.3.1 Animais anestesiados.....	26

3.3.1.1 Canulação de artéria e veia femorais.....	26
3.3.1.2 Traqueostomia.....	26
3.3.1.3 Craniotomia.....	26
3.3.1.4 Exposição do nervo simpático renal.....	27
3.3.2 Animais não anestesiados.....	28
3.3.2.1 Implante de probe de telemetria.....	28
3.3.2.2 Craniotomia.....	28
3.4 Registro dos parâmetros cardiovasculares e de atividade simpática.....	28
3.4.1 Animais anestesiados	28
3.4.1.1 Registro de parâmetros cardiovasculares.....	28
3.4.1.2 Registro de atividade simpática.....	29
3.4.2 Animais não anestesiados.....	30
3.4.3 Considerações sobre a atividade simpática eferente destinada aos rins.....	30
3.5 Drogas.....	31
3.6 Protocolos Experimentais.....	32
3.6.1 Caracterização dos efeitos cardiovasculares e de atividade simpática induzidos pela ação de angiotensinas sobre neurônios do PVN, em condições normais.....	32
3.6.1.1 Avaliação dos efeitos cardiovasculares e de atividade simpática induzidos pela microinjeção de angiotensinas no PVN.....	32
3.6.1.2 Avaliação dos efeitos cardiovasculares e de atividade simpática induzidos pelo bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN...	33
3.6.2 Avaliação dos efeitos cardiovasculares e de atividade simpática induzidos pelo bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN, em condições fisiológicas alteradas.....	34
3.6.2.1 Avaliação dos efeitos cardiovasculares e de atividade simpática induzidos pela ação das angiotensinas endógenas no PVN, durante a hipertensão induzida por hipóxia e hipercapnia intermitente.....	34

3.6.2.2 Avaliação dos efeitos cardiovasculares e de atividade simpática induzidos pelo bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN, durante alterações de osmolaridade	36
3.6.3 Avaliação dos efeitos do SRA cerebral na manutenção da atividade simpática e da PA em ratos transgênicos (ASrAOGEN) (TGR)	37
3.6.3.1 Avaliação dos efeitos induzidos pela inibição dos neurônios do PVN em TGR e ratos SD.....	37
3.7 Análise histológica.....	38
3.8 Análise dos dados.....	39
3.8.1 Animais anestesiados.....	39
3.8.1.1 Análise de PAM e FC.....	39
3.8.1.2 Análise de RSNA basal.....	39
3.8.1.3 Análise de RSNA.....	39
3.8.2 Animais não anestesiados.....	40
3.9 Análise estatística.....	40
4. Resultados.....	41
4.1 Caracterização dos efeitos de angiotensinas agindo sobre os neurônios do PVN na modulação do tônus simpático e da pressão arterial..	41
4.1.1 Efeito da microinjeção de angiotensinas no PVN sobre o tônus simpática e a PA.....	41
4.1.2 Efeito do bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN sobre o tônus simpática e a PA.....	43
4.2 Envolvimento das angiotensinas endógenas nos neurônios do PVN para a manutenção do tônus simpático e da PA em condições fisiológicas alteradas.....	49
4.2.1 Efeitos do bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN sobre o tônus simpático e a PA, durante a hipertensão induzida por HI / HC intermitente simulando a apnéia do sono.....	49
4.2.1.1 Medida da PO ₂ e da PCO ₂ arterial.....	49

4.2.1.2 Medida da atividade da renina plasmática.....	50
4.2.1.3 Exposição à E-HI e Infusão crônica de drogas no PVN	51
4.2.2 Efeitos do bloqueio endógeno das angiotensinas no PVN sobre a manutenção do tônus simpático e da PA durante hiperosmolaridade plasmática.....	63
4.3 Caracterização dos efeitos do SRA cerebral na manutenção do tônus simpático e da PA em ratos transgênicos ASrAOGEN.....	68
4.4 Análise histológica.....	73
5. Discussão.....	78
5.1 Participação das Ang-(1-7) e Ang II na manutenção do tônus simpático e da pressão arterial exercida pelo PVN.....	78
5.2 Participação das Ang-(1-7) e Ang II na manutenção do tônus simpático e da PA exercidas pelo PVN durante a hipertensão induzida por E-HI intermitente	91
5.3 Participação das Ang-(1-7) e Ang II na manutenção do tônus simpático e da PA exercidas pelo PVN durante a hiperosmolaridade plasmática.....	95
5.4 Participação do SRA cerebral especificamente no PVN para a manutenção da PA e atividade simpática renal.....	101
5.5 Conclusão.....	105
6. Referências bibliográficas.....	107
7. Anexo.....	131
8.1 Tabelas de Valores Basais	131
8.1.1 Efeitos da microinjeção de angiotensinas no PVN sobre o tônus simpático e a pressão arterial.....	131
8.1.2 Efeitos do bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN sobre o tônus simpático e a pressão arterial.....	132
8.1.3 Efeitos do bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN sobre o tônus simpático e pressão arterial, durante a hipertensão induzida por eucapnia e hipóxia intermitente	134

8.1.4 Efeitos do bloqueio endógeno das angiotensinas no PVN sobre a manutenção do tônus simpático e da pressão arterial durante hiperosmolaridade plasmática.....	135
8.2 Premiações	
8.3 Publicações	

LISTA DE FIGURAS:

Introdução:

- Figura 01 Esquema ilustrativo demonstrando os 5 principais grupos de neurônios premotores simpáticos do SNC e suas projeções para os neurônios preganglionares simpáticos da coluna IML.... 2
- Figura 02 Ilustração da subdivisão do PVN em 2 regiões distintas: região magnocelular e parvicelular..... 3
- Figura 03 Exemplo ilustrativo das respostas de PAM, FC e atividade simpática evocadas pela microinjeção unilateral de GABA em 5 locais seqüenciados através da extensão dorso-ventral do PVN 6
- Figura 04 Ilustração simplificada das vias proteolíticas de formação dos peptídeos angiotensinérgicos biologicamente ativos do SRA..... 9

Materiais e Métodos:

- Figura 05 Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação dos efeitos da microinjeção de angiotensinas no PVN..... 33
- Figura 06 Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação dos efeitos do bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN..... 34
- Fugura 07 Esquema representando mudanças nas concentrações de O₂ e CO₂ inalados durante os ciclos de HI/HC intermitente..... 35
- Figura 08 Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação dos efeitos do bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN durante a exposição a ciclos de HI/HC intermitente..... 36
- Figura 09 Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação dos efeitos do bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN durante alterações de osmolaridade plasmática..... 37

Figura 10	Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos da microinjeção do agonista de receptor GABA _A no PVN de TGR(ASrAOGEN)	38
-----------	--	----

Resultados:

Figura 11	Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta às microinjeções bilaterais de veículo, Ang-(1-7) e Ang II no PVN.....	42
Figura 12	Registro ilustrando as respostas de PA, FC e RSNA produzidas pela microinjeção bilateral de A-779 no PVN.....	44
Figura 13	Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta as microinjeções bilaterais de salina, A-779 e muscimol no PVN.....	46
Figura 14	Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta às microinjeções bilaterais de salina, A-779, Losartan, CV11974 e PD123319 no PVN.....	48
Figura 15	Dados agrupados apresentando os efeitos da exposição HI/HC sobre os gases sanguíneos arteriais.....	50
Figura 16	Dados agrupados apresentando a ARP em ratos submetidos à exposição HI/HC ou sham após 14 dias de tratamento.....	51
Figura 17	Alterações de PAM e FC durante exposição a ciclos de E-HI ou sham, e simultânea infusão crônica de salina ou muscimol no PVN.....	52
Figura 18	Alterações de PAM e FC durante exposição a ciclos de E-HI ou sham e simultânea infusão crônica de salina ou A-779 no PVN..	54
Figura 19	Alterações de PAM e FC durante exposição a ciclos de E-HI ou sham e simultânea infusão crônica de salina, Losartan ou ZD7155 no PVN.....	56
Figura 20	Alterações de PAM e FC durante exposição a ciclos de E-HI ou sham e simultânea infusão crônica de salina ou PD123319 no PVN.....	58

Figura 21	Alterações de PAM e FC durante exposição a ciclos sham (normoxia) e simultânea infusão crônica de A-779, Losartan, ZD7155, PD123319 e salina no PVN.....	60
Figura 22	Alterações de PAM e FC durante exposição a ciclos E-HI e simultânea infusão crônica de A-779, Losartan, ZD7155, PD123319 e salina no PVN.....	62
Figura 23	Dados agrupados apresentando as alterações de osmolaridade plasmática induzidas pela infusão de SIT (0.15M) e SHT (1M e 2.5M) em ratos submetidos à microinjeção de A-779 no PVN.....	63
Figura 24	Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta à infusão de SIT (0.15M) e SHT (1M e 2.5M) seguidas por microinjeções bilaterais de A-779 no PVN.....	65
Figura 25	Dados agrupados mostrando alterações de osmolaridade plasmática induzidas pela infusão de SHT2.5M em ratos submetidos à microinjeção de A-779, Losartan e salina no PVN.	66
Figura 26	Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta à infusão de SHT (2.5M) e à microinjeções bilaterais de A-779, Losartan e salina no PVN.....	67
Figura 27	Registro de RSNA (V) ilustrando basal e redução média máxima após microinjeções de salina ou muscimol no PVN de ratos SD e TGR.....	69
Figura 28	RSNA basal e redução média máxima após microinjeções de salina ou muscimol no PVN de ratos SD e TGR.....	69
Figura 29	Registro ilustrando as respostas de PA, FC e RSNA produzidas pela microinjeção unilateral e bilateral de Muscimol no PVN de ratos SD e TGR.....	70
Figura 30	Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta à microinjeções unilaterais e bilaterais de muscimol ou salina no PVN de ratos SD e TGR.....	72

Figura 31	Diagrama esquemático e fotografia de cortes frontais do encéfalo de ratos mostrando a localização e as lesões causadas pelas microinjeções bilaterais no PVN.....	74
Figura 32	Representação esquemática dos sítios de microinjeção dos grupos em que foi administrado A-779 atingindo a região intermediária posterior entre PVN e o DMH.....	75
Figura 33	Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta às microinjeções bilaterais de salina e A-779 no PVN e na região intermediária posterior a este núcleo.....	76
Figura 34	Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta às microinjeções bilaterais de salina e muscimol no PVN e na região intermediária posterior a este núcleo.....	77
 Discussão		
Figura 35	Esquema sumarizando os principais achados do estudo.....	106

LISTA DE TABELAS:

Resultados

Tabela 01	Valores basais de PAM e FC antes das microinjeções de muscimol no PVN de ratos SD e TGR.....	68
-----------	--	----

Anexo

Tabela 02	Valores basais de PAM e FC antes da microinjeção de veículo e Angiotensinas no PVN.....	131
Tabela 03	Valores basais de PAM e FC antes da microinjeção de veículo salina, A-779 e muscimol no PVN.....	132
Tabela 04	Valores basais de PAM e FC antes da microinjeção de veículo salina e dos antagonistas angiotensinérgicos A-779, Losartan, CV11974 e PD123319 no PVN.....	133
Tabela 05	Valores basais de PAM e FC antes da exposição a E-HI ou sham.....	134
Tabela 06	Valores basais de PAM e FC antes e após a infusão de SHT (1M ou 2.5M) ou SIT (0.15M).....	135

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocórticotrófico
Ang	Angiotensina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
Ang IV	Angiotensina IV
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
AOGEN	Angiotensinogênio
AP	Área postrema
ARP	Atividade da renina plasmática
ASM	Área septal média
AT ₁	Receptor de Angiotensina Tipo 1
AT ₂	Receptor de Angiotensina Tipo 2
AT ₄	Receptor de Angiotensina Tipo 4
AVP	Arginina Vasopressina
BCVL	Bulbo ventrolateral caudal
Bpm	Batimentos por minuto
BRVL	Bulbo rostroventrolateral
BRVM	Bulbo rostroventromedial
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEBIO	Centro de Bioterismo
Cl ⁻	Íon cloreto
CSF	Fluido Cérebro Espinhal
DMH	Hipotálamo dorsomedial
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
E-HI	Eucapnia e hipóxia intermitente
EPI	Epinefrina
EPM	Erro padrão da média

EUA	Estados Unidos da América
EPN	Endopeptidase neutra
FC	Freqüência cardíaca
GABA	Ácido γ aminobutírico
GABA _A	Receptor de ácido γ aminobutírico tipo A
GLU	Glutamato
HI	Hipóxia intermitente
HI/HC	Hipóxia e hipercapnia intermitente
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IC	Insuficiência cardíaca
ICV	Intracerebroventricular
iECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IML	Intermediolateral
mmHg	Milímetros de mercúrio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	Cloreto do sódio
NE	Norepinefrina
NEP	Endopeptidase Neutra
NMDA	N-metil-D-ácido aspártico
nNOS	NO sintase na sua forma neural
NO	Óxido Nítrico
NOs	NO sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
NSO	Núcleo supra óptico
NTS	Núcleo do trato solitário
MAS	Receptor Mas acoplado à proteína G
OCV	Órgãos circunventriculares
OSF	Órgão subfornical
OT	Ocitocina
OVLT	Órgão vascularizado da lâmina terminal
PA	Pressão arterial

PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PEP	Prolil-endopeptidase
PCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PO ₂	Pressão parcial de Oxigênio
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RSNA	Atividade simpática do nervo renal
SD	Sprague Dawley
SHT	Salina hipertônica
SIT	Salina isotônica
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRA	Sistema renina angiotensina
TGR	Rato transgênico
TGR(ASrAOGEN)	Rato transgênico com baixo AOGEN cerebral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Vs	versus

RESUMO:

O Núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) constitui um dos grupos de neurônios premotores simpáticos reguladores do tônus simpático vasomotor. Inibição destes neurônios com microinjeções do agonista de receptor GABA_A, muscimol, reduz a pressão arterial (PA) e a atividade simpática. Este efeito é mais pronunciado em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sugerindo que uma hiperatividade dos neurônios do PVN pode ser responsável pelos altos níveis de PA e atividade simpática observados nestes animais. A Ang-(1-7) está presente em diversas áreas do sistema nervoso central (SNC), incluindo PVN. Aplicação deste peptídeo por microinjeção aumenta a taxa de disparo neuronal no PVN.

Este estudo teve por principal objetivo avaliar o possível envolvimento da Ang-(1-7), atuando sobre os neurônios do PVN, na manutenção do tônus simpático e da PA em condições fisiológicas normais e alteradas caracterizadas por elevados níveis de PA e atividade simpática. Adicionalmente, no sentido de confirmar a importância das angiotensinas cerebrais na modulação do tônus simpático gerado pelo PVN, utilizamos o modelo TGR(ASrAOGEN) (TGR), que apresenta baixos níveis de angiotensinogênio (AOGEN) cerebral.

Sob o efeito de anestesia (uretana, 1.2-1.4 g/kg de peso corporal i.p.), ratos Wistar machos (300-350g) foram preparados para o registro de PA, frequência cardíaca (FC), atividade simpática do nervo renal (RSNA) e submetidos a uma craniotomia para permitir a introdução de agulhas de microinjeção no PVN.

Microinjeções bilaterais de Ang-(1-7) e de Ang II no PVN, promoveram elevação acentuada de RSNA e em magnitude similar [Ang-(1-7): +24±8%, Ang II: +22±2% vs salina: +3±3%; $P < 0.05$]. O bloqueio endógeno da Ang-(1-7), utilizando o antagonista seletivo desta Ang, A-779, em duas doses (0,1nmol e 1nmol) induziu queda de RSNA comparável àquela induzida pelo potente agonista de receptor GABA_A, muscimol (dose baixa: -26±6%, dose alta: -21±5%, Mus: -24±4% vs salina: -2±3%). O bloqueio dos receptores AT₁ da Ang II, utilizando o antagonista seletivo, Losartan, reduziu os níveis de PA sem alterar a atividade simpática. Curiosamente, o bloqueio dos receptores AT₂, promoveu redução de RSNA (-

22±5%), que embora na mesma magnitude induzida pelo A-779 apresentou um padrão de resposta diferente.

A exposição à ciclos de eucapnia e hipóxia intermitente (E-HI) por 14 dias promoveu aumento de PA em ratos Sprague-Dawley (SD) cronicamente infundidos com salina no PVN (E-HI salina: +12±2 mmHg vs sham salina: -2±1 mmHg; $P<0.01$), comparado a animais sham (expostos ao ar ambiente). A inibição do PVN através da infusão crônica de muscimol preveniu a elevação de PA (E-IH Mus: -9±4 mmHg), reduzindo também os níveis de FC (E-IH Mus: -32±12 bpm vs E-IH salina: 5±9 bpm; $P<0.05$). O bloqueio crônico dos receptores da Ang-(1-7) (*Mas*) e da Ang II (AT₁ e AT₂) preveniu o aumento de PA induzido por E-HI (E-IH A-779: -5±1 mmHg, E-IH Los: -9±4 mmHg, E-IH ZD7155: -11±4 mmHg e E-IH PD123319: -4±3 mmHg vs E-IH salina: 12±2 mmHg; $P<0.05$). Em animais sham, houve redução de PA somente nos grupos tratados com antagonistas de receptor AT₁ (sham Los: -9±2 mmHg, sham ZD7155: -6±1 mmHg vs sham salina: -2±1 mmHg; $P<0.05$).

A hiperosmolaridade plasmática, induzida através da infusão periférica de salina hipertônica (SHT, 2,5M) durante 30 minutos em animais anestesiados, promoveu aumento dos níveis de PA e redução de RSNA. O bloqueio da Ang-(1-7) endógena, após este estímulo, resultou em queda acentuada de PA (SHT A-779: -40±9 mmHg vs SHT salina: -7±3 mmHg; $P<0.01$) e RSNA (SHT A-779: -37±6% vs SHT salina: -2±3 %; $P<0.01$). O bloqueio da Ang II através dos receptores AT₁, também promoveu redução destas variáveis, porém em menor magnitude (SHT Los: -16±7 mmHg; $P<0.01$ e SHT Los: -12±5 %; $P<0.05$). Vale ressaltar que os efeitos do Losartan e do A-779 nesta condição foram mais pronunciados do que em animais normais.

A inibição neuronal do PVN em TGR(ASrAOGEN), através da microinjeção bilateral de muscimol, resultou em queda atenuada de PA (TGR: -17±5 mmHg vs SD: -32±3 mmHg), FC (TGR: -23±6 bpm vs SD: -77±9 bpm) e RSNA (TGR: -3±10% vs SD: -29±8%) comparado a animais SD submetidos ao mesmo protocolo. Estes resultados sugerem que o tônus simpático gerado pelo PVN seja suprimido neste modelo TGR.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a Ang-(1-7) participa da manutenção tônica simpática e de PA exercida pelo PVN através de um efeito possivelmente excitatório. Adicionalmente, este efeito parece ser mais pronunciado durante E-HI simulando a apnéia do sono e na hiperosmolaridade plasmática, sugerindo que o aumento de PA observado nestas condições é, pelo menos parcialmente dependente da ação da Ang-(1-7) e também da Ang II sobre os neurônios do PVN. Finalmente, a importância das angiotensinas cerebrais, particularmente da Ang-(1-7) na modulação simpática foi confirmada uma vez que o tônus simpático vasomotor gerado pelo PVN parece estar suprimido no modelo TGR(ASrAOGEN).

ABSTRACT:

The hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) is a premotor neuron cell group regulating the sympathetic vasomotor tone. Inhibition of PVN neurons with microinjection of the GABA_A agonist, muscimol, reduces blood pressure (BP) and sympathetic activity. This effect is enhanced in spontaneously hypertensive rats (SHR), suggesting that hyperactivity of PVN neurons might be involved in the maintenance of the hypertensive state in these animals. Immunohistochemistry for Ang-(1-7) has been identified in several areas of the central nervous system (CNS), including PVN. Application of this peptide by microiontophoresis increases the neuronal firing rate in the PVN.

The main aim of this study was to evaluate the contribution of Ang-(1-7), acting on PVN neurons, in the maintenance of sympathetic tone and BP under normal conditions or during altered states, characterized by heightened BP and sympathetic activity. Additionally, to confirm the importance of brain Ang modulating the sympathetic outflow generated by PVN neurons, we used the TGR(ASrAOGEN) (TGR) model, which expresses low levels of brain angiotensinogen (AOGEN). Under anesthesia (urethane, 1.2-1.4 g/kg of body weight i.p.), male Wistar rats (300-350g) were prepared for BP, heart rate (HR), renal sympathetic nerve activity (RSNA) recordings and craniotomy was performed to allow for microinjections into the PVN.

Bilateral microinjections of Ang-(1-7) and Ang II into the PVN evoked a substantial increase in RSNA and in a similar magnitude [Ang-(1-7): +24±8%, Ang II: +22±2% vs saline: +3±3%; *P*<0.05]. The blockade of endogenous Ang-(1-7) using its selective antagonist, A-779, in two doses (0.1 nmol and 1 nmol) induced a fall in RSNA comparable to that evoked by muscimol, a potent GABA_A receptor agonist (low dose: -26±6%, high dose: -21±5%, Mus: -24±4% vs saline: -2±3%). Blockade of AT₁ receptors for Ang II, using its selective antagonist, Losartan, reduced BP levels without changing sympathetic activity. Curiously, the blockade of AT₂ receptors induced a reduction in RSNA (-22±5%), in the same magnitude, although to a different baseline response.

Eucapnia and intermittent hypoxia (E-IH) cycling exposures for 14 days induced an increase in BP in Sprague-Dawley (SD) rats chronically infused with saline into the PVN (E-IH saline: $+12\pm 2$ mmHg vs sham saline: -2 ± 1 mmHg; $P<0.01$) compared to sham rats (room air exposure). Inhibition of PVN through chronic infusion of muscimol prevented the rise in BP (E-IH Mus: -9 ± 4 mmHg), and reduced HR (E-IH Mus: -32 ± 12 bpm vs E-IH saline: 5 ± 9 bpm; $P<0.05$). The chronic blockade of Ang-(1-7) (Mas) and Ang II (AT_1 and AT_2) receptors prevented the increase in BP induced by E-IH exposure (E-IH A-779: -5 ± 1 mmHg, E-IH Los: -9 ± 4 mmHg, E-IH ZD7155: -11 ± 4 mmHg e E-IH PD123319: -4 ± 3 mmHg vs E-IH saline: 12 ± 2 mmHg; $P<0.05$). In sham animals, BP was reduced only in the group treated with AT_1 receptor antagonists (sham Los: -9 ± 2 mmHg, sham ZD7155: -6 ± 1 mmHg vs sham saline: -2 ± 1 mmHg; $P<0.05$).

Plasma hyperosmolarity, induced through peripheral infusion of hypertonic saline (HTS, 2.5M) during 30 minutes in anaesthetized rats evoked an increase in BP and a reduction in RSNA levels. The blockade of endogenous Ang-(1-7), after this stimulus, induced a pronounced fall in BP (HTS A-779: -40 ± 9 mmHg vs HTS saline: -7 ± 3 mmHg; $P<0.01$) and RSNA (HTS A-779: $-37\pm 6\%$ vs HTS saline: $-2\pm 3\%$; $P<0.01$). Ang II blockade through AT_1 receptors also induced a fall in these variables, although in a smaller magnitude (HTS Los: -16 ± 7 mmHg; $P<0.01$ and HTS Los: $-12\pm 5\%$; $P<0.05$). It is important to note that the effects of both A-779 and Losartan in this condition were greater than in normal animals.

Neuronal inhibition of PVN in TGR(ASrAOGEN), through muscimol microinjections, evoked an attenuated fall in BP (TGR: -17 ± 5 mmHg vs SD: -32 ± 3 mmHg), HR (TGR: -23 ± 6 bpm vs SD: -77 ± 9 bpm) and RSNA (TGR: $-3\pm 10\%$ vs SD: $-29\pm 8\%$) compared to SD animals submitted to the same protocol. These results suggest that the sympathetic tone generated by PVN is suppressed in this TGR model.

Together, our results demonstrate that Ang-(1-7) contributes to the maintenance of sympathetic tone and BP exerted by PVN, through an excitatory effect. Additionally, this effect is more pronounced during E-IH exposure simulating sleep apnea and hyperosmolar conditions, suggesting that the rise in

BP observed in these conditions is, at least partially, dependent upon the actions of Ang-(1-7) on PVN neurons. Finally, the importance of brain Ang, particularly Ang-(1-7), in sympathetic regulation was confirmed in that sympathetic vasomotor tone appears to be reduced in the TGR(ASrAOGEN) model.

1. INTRODUÇÃO

1.1 GRUPAMENTOS DE NEURÔNIOS PREMOTORES SIMPÁTICOS ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL:

O Sistema Nervoso Simpático (SNS) desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase do organismo sob condições normais ou sob condições de estresse agudo ou crônico (Kenney e cols., 2003).

O tônus simpático, particularmente para o sistema cardiovascular, é gerado por descargas simpáticas originadas em áreas específicas do tronco encefálico e diencefalo. Alguns dos grupamentos neuronais localizados nestas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC), denominados neurônios premotores simpáticos, enviam projeções diretas para os neurônios preganglionares simpáticos da coluna intermediolateral da medula (IML). A coluna IML constitui uma das 4 regiões dentro da coluna torácica e lombar superior que contém os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares simpáticos, mediadores do tônus simpático para o organismo (Dampney, 1994; Kenney e cols., 2003; Dampney e cols., 2003).

Historicamente o estudo de Amendt e cols. (1979) foi o pioneiro em demonstrar a existência de grupamentos neuronais que regulam o fluxo simpático para a coluna IML e daí para os principais gânglios simpáticos e medula adrenal em ratos. Estudos posteriores, utilizando a técnica de traçador transneuronal retrógrado (Jansen e cols., 1995), possibilitaram a identificação de pelo menos 5 grupos de neurônios premotores simpáticos conforme pode ser observado na Figura 01. Estes grupos são o Bulbo Rostroventrolateral (BRVL), Bulbo Rostroventromedial (BRVM), Núcleo Caudal da Rafe, Área A5 (A5) e Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) (Dampney, 1994).

Entre estes, o PVN desempenha um importante papel na manutenção do tônus simpático direcionado para o sistema cardiovascular, e por ser foco deste estudo, será descrito a seguir.

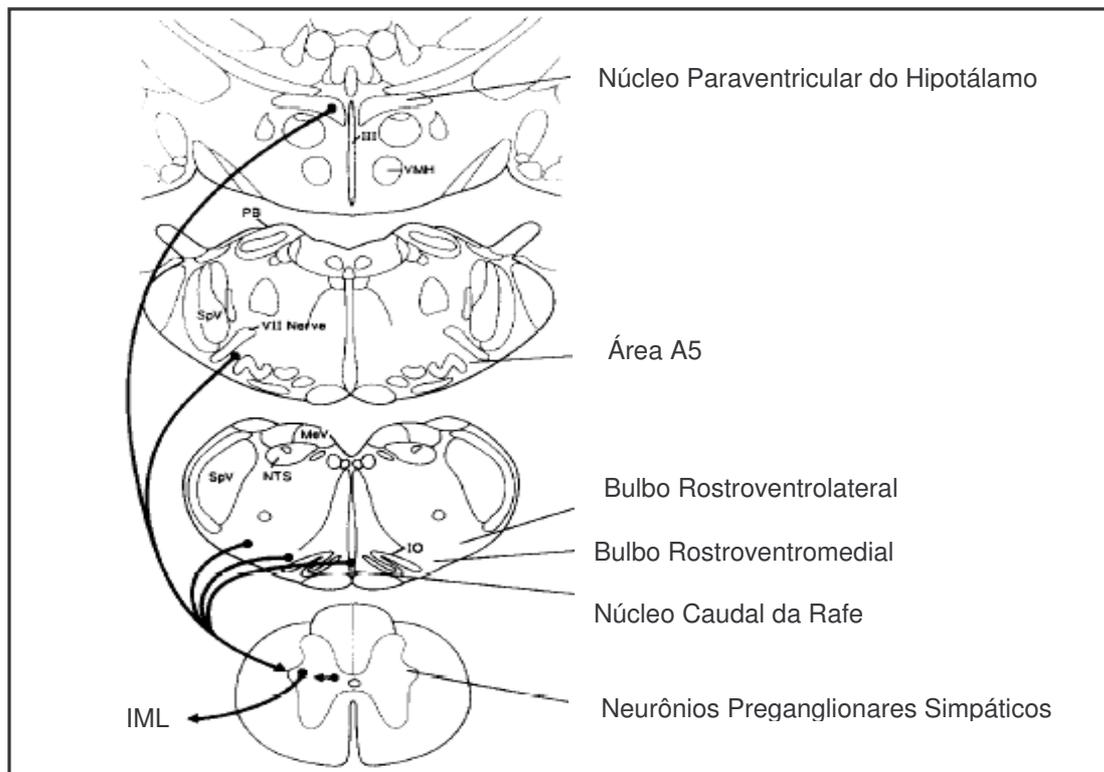


Figura 01. Esquema ilustrativo dos 5 principais grupos de neurônios premotores simpáticos do SNC e suas projeções para os neurônios preganglionares simpáticos da coluna IML. Adaptado de Dampney, *Physiological Review* vol. 74, n°2, April, 1994.

1.2 O NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO E A MANUTENÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E DA PRESSÃO ARTERIAL:

O PVN localiza-se bilateralmente ao 3º ventrículo, e pode ser dividido em duas regiões principais: magnocelular e parvicelular (Figura 02). Os neurônios magnocelulares localizam-se nas porções laterais do PVN e são especializados na síntese de vasopressina (AVP). Este hormônio é transportado através de projeções axonais até a hipófise posterior, onde é liberado na circulação (Blair e cols., 1996; Badoer, 2001). Dessa forma, o PVN participa do controle hidro-eletrolítico dos fluidos corporais (Chen e Toney, 2001; Ambuhl e cols., 1994). Os neurônios parvicelulares localizam-se medialmente e constituem uma população heterogênea de neurônios, contendo múltiplos neurotransmissores destinados à realização de diversas funções. Parte desses neurônios, especificamente aqueles localizados nas porções dorsal e ventral da região parvicelular, projetam-se para outras regiões do SNC envolvidas no controle das funções autonômicas, como o BRVL, e a coluna IML (Blair e cols., 1996; Badoer, 2001).

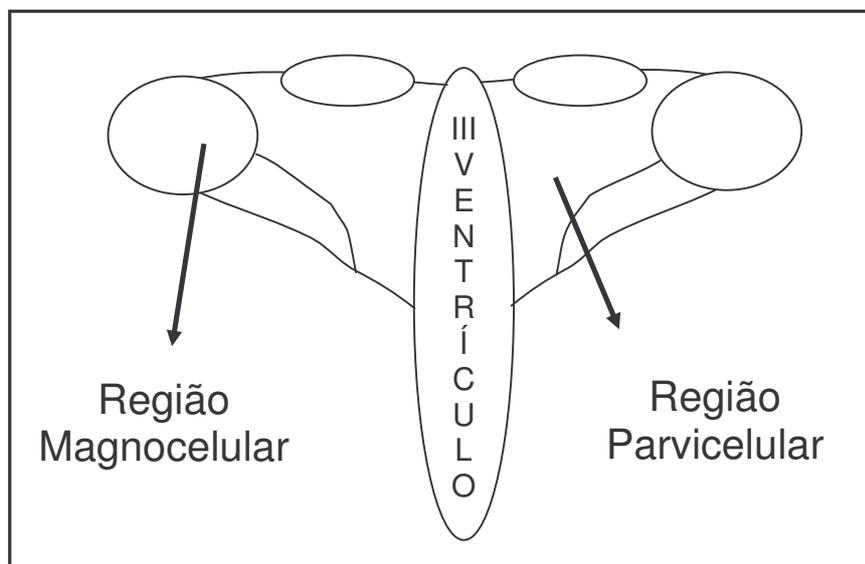


Figura 02. Desenho ilustrando a divisão do PVN em 2 regiões distintas: região magnocelular e parvicelular. Adaptado de Blair e cols., *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 23: 161-165, 1996.

Os neurônios do PVN que enviam projeções para os neurônios do BRVL têm sido alvo de muitos estudos, devido à importância deste núcleo na regulação simpática para o sistema cardiovascular (Dampney, 1994). O BRVL é uma área crítica para a manutenção do tônus simpático e dos níveis basais de pressão arterial (PA) (Dampney, 1994). Estudos com traçador neuronal anterógrado mostraram que as células do BRVL enviam projeções para núcleos pré-motores simpáticos específicos, e para os neurônios pré-ganglionares simpáticos em todos os níveis da coluna IML, podendo assim, exercer um potente e difundido controle do fluxo simpático (Dampney e cols., 1987; Ross e cols., 1984). Badoer (2001) demonstrou que a maioria dos neurônios de um lado do PVN projeta-se para o BRVL ipsilateral, sendo a maior concentração de neurônios relacionados a esta projeção, encontrados na porção rostro-dorsal do PVN. Badoer (2001) observou ainda, que a distribuição dos neurônios do PVN que enviam projeções para a coluna IML foi bastante similar, possibilitando afirmar pela primeira vez que existem neurônios do PVN que enviam projeções tanto para o BRVL quanto para os neurônios preganglionares simpáticos da coluna IML, inclusive aqueles que se projetam para coração, medula adrenal e rins (Sawchenko & Swanson 1982, Strack e cols., 1989, Schramm e cols., 1993). Dessa forma, os neurônios do PVN podem influenciar o tônus simpático através de suas conexões diretas com a coluna IML, indiretamente, através de suas conexões com o BRVL, que subsequente também inerva a coluna IML, e das duas formas simultaneamente (Badoer, 2001; Blair e cols., 1996; Swanson & McKellar, 1979; Swanson & Sawchenko, 1980; Taylor & Weaver, 1992).

Quanto às aferências, sabe-se que os neurônios do PVN recebem projeções de várias áreas bulbares envolvidas na regulação do sistema cardiovascular. O Núcleo do Trato Solitário (NTS), uma área envolvida com a regulação reflexa da PA, envia projeções primariamente para os neurônios da região parvicelular, enquanto que o BRVL, envia projeções tanto para os neurônios da região parvicelular quanto da magnocelular (Cunningham & Sawchenko, 1988; Cunningham e cols., 1990; Swanson & Swachenko, 1983). Estas conexões neuroanatômicas permitem que informações determinantes para

o sistema cardiovascular oriundas, do NTS e BRVL, áreas críticas envolvidas na regulação reflexa da PA, sejam provavelmente moduladas pelos neurônios do PVN (Blair e cols., 1996; Dampney, 1994). O PVN recebe ainda, aferências de outras áreas hipotalâmicas importantes na regulação cardiovascular, como o Hipotálamo Dorsomedial (DMH), um núcleo envolvido na resposta cardiovascular ao estresse (DiMicco e cols., 2002).

Além das inter-relações dos neurônios paraventriculares com outras áreas do SNC envolvidas na regulação autonômica, o PVN têm sido implicado em funções diversas como controle da osmolaridade, termogênese e secreção de hormônios (Martin & Haywood, 1992). Dessa forma o PVN pode ser reconhecido como um local de integração de respostas autonômicas, neuroendócrinas, e comportamentais (Swanson & Sawchenko, 1980; Blair e cols., 1996), exibindo um grande número de neurotransmissores inibitórios e excitatórios para a realização destas funções (Swanson & Sawchenko, 1983). Numerosos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes neurotransmissores na região do PVN sobre os níveis de atividade eferente simpática e controle cardiovascular (Kenney e cols., 2003).

A maioria dos neurotransmissores centrais é encontrada no PVN. Entre estes, γ -ácido aminobutírico (GABA) (Zhang & Patel, 1998; Zhang e cols., 2002; Allen, 2002) e Óxido Nítrico (NO) atuam como mediadores inibitórios no PVN para influenciar respostas cardiovasculares, enquanto que glutamato (GLU) (Bains & Ferguson, 1997 a, b) e angiotensinas (Ang) (Li & Ferguson, 1996; Pfister e cols., 1997) exercem efeitos excitatórios sobre reflexos cardiovasculares (Miyawaki e cols., 1996) e atividade simpática.

Os mecanismos GABAérgicos no PVN são de grande importância para o controle do fluxo simpático de forma que qualquer alteração destes, pode resultar em alterações dos níveis de atividade simpática. O bloqueio GABAérgico no PVN promove elevação acentuada de descargas simpáticas, indicando que existe uma potente inibição tônica simpática, mediada por GABA nesta região (Li & Patel, 2003). Isto foi evidenciado através de estudos em que a desinibição do PVN através de microinjeções do antagonista de receptor GABA_A, bicuculina, promoveu

uma elevação acentuada de descarga simpática e dos níveis de PA e FC (Martin e cols., 1991; Kannan e cols., 1988; Chen & Toney, 2003). Por outro lado, a inibição do PVN com agonista de receptor GABA_A, muscimol, reduziu os níveis de atividade simpática e de PA em animais normotensos anestesiados (Allen, 2002). Allen (2002) demonstrou inclusive, que subregiões do PVN apresentam um efeito mais pronunciado de redução destas variáveis quando inibidas por agonista de receptor GABA_A (Allen, 2002), como observado na Figura 03. Quanto mais próximas ou dentro do PVN forem as microinjeções mais acentuado é o efeito de inibição simpática e cardiovascular demonstrando que este efeito deve-se à interação do muscimol com os receptores GABA_A no PVN, e não devido a um efeito inespecífico (Allen, 2002).

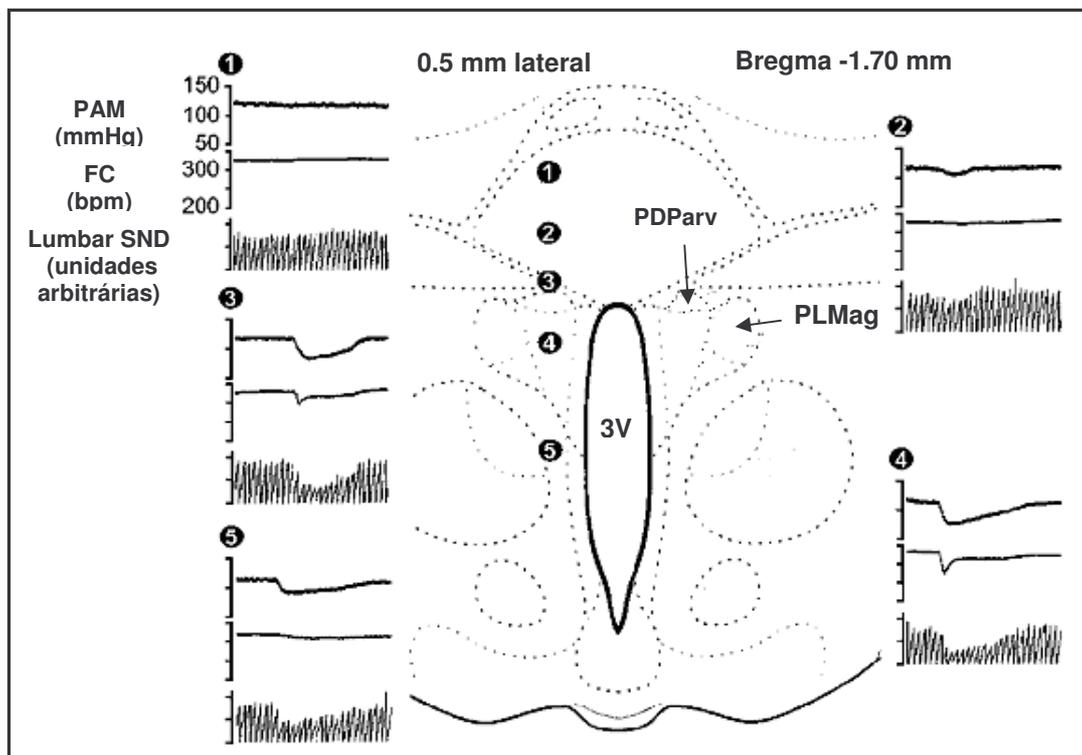


Figura 03. Exemplo ilustrativo das respostas de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e atividade simpática evocadas pela microinjeção unilateral de GABA em 5 locais seqüenciados através de toda a extensão dorso-ventral do PVN (1,7mm caudal à superfície posterior do bregma e 0,5mm lateral à linha média). Os centros de cada microinjeção são apresentados no mapa esquemático. GABA, ácido γ -aminobutírico; PDParv, Porção dorsal da região parvicelular; PLMag, Porção lateral da região magnocelular; 3V, 3º ventrículo. Adaptado de Allen e cols., *Hypertension* 39: 275-280, 2002.

O Óxido Nítrico (NO), um neurotransmissor atípico no SNC (Schuman & Madison, 1994), é sintetizado pela NO sintase (NOs) em sua forma neural (nNOS). Por ser uma substância gasosa, o NO difunde-se facilmente através das membranas celulares para realização de seus efeitos biológicos (Li & Patel, 2003).

O nNOS distribui-se em altas concentrações em áreas distintas do cérebro, incluindo regiões que regulam o sistema cardiovascular. No Hipotálamo, neurônios positivos para a nNOS são encontrados primariamente no PVN e Núcleo Supra Óptico (NSO) (Bredt e cols., 1990; Vincent & Kimura, 1992; Miyagawa e cols., 1994; Sanchez e cols., 1994). A administração do doador de NO, Nitroprussiato de Sódio (NPS), no PVN de ratos promove respostas depressoras (Horn e cols., 1994), sugerindo o envolvimento do NO na regulação cardiovascular exercida por este núcleo (Li & Patel, 2003; Stern e cols., 2003). Adicionalmente, foi observado uma redução na atividade simpática do nervo renal (RSNA) em resposta à administração de doador de NO no PVN (Zhang e cols., 1997; Li & Patel, 2001).

O Glutamato é conhecidamente um neurotransmissor excitatório no SNC e no PVN (Bains & Ferguson, 1997a). Martin & Haywood (1992) observaram que microinjeções de glutamato no PVN de ratos acordados, promoveram aumentos de PA e FC. Adicionalmente, foram observados aumentos de Norepinefrina (NE) e Epinefrina (EPI) circulantes, sugerindo que a elevação de PA e FC seja devido a uma maior descarga simpática (Katafuchi e cols., 1988) com consequente elevação da secreção de catecolaminas pela medula adrenal (Matsui, 1984).

A Angiotensina II (Ang II) tem sido descrita como um neurotransmissor excitatório no SNC (Ferguson e cols., 2001; Oldfield e cols., 2001). A identificação dos componentes mediadores centrais da resposta hipertensiva a Ang II foi fundamental para a demonstração do papel da Ang II tanto circulante, quanto produzida centralmente, na regulação da função cardiovascular (Ferguson e cols., 2001). A aplicação de Ang II por microiontoforese no PVN promove aumento da taxa de disparo neuronal, evidenciando o papel excitatório exercido sobre estas células (Ambuhl e cols., 1992; Ambuhl e cols., 1994; Harding & Felix, 1987). Como as angiotensinas e seus receptores são foco deste estudo, serão abordados em detalhes no tópico a seguir.

1.3 O SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA:

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) desempenha um papel fundamental na regulação da homeostase cardiovascular, exercendo importante influência sobre a regulação da PA, especialmente à longo prazo (Stoll & Unger, 2001; Santos e cols., 2000a).

A visão clássica do SRA consiste em uma cascata de reações que têm início quando o angiotensinogênio (AOGEN), secretado pelo fígado, é liberado na circulação sanguínea. A partir daí, esta substância é catalisada pela renina, secretada pelos rins, originando o decapeptídeo, Angiotensina I (Ang I). A Ang I é clivada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), presente no endotélio vascular, principalmente em vasos pulmonares, formando o octapeptídeo Ang II. A Ang II foi por muito tempo considerada como o único produto biologicamente ativo deste sistema (Peach, 1977; Atlas, 1998; Santos & Sampaio, 2002).

Recentemente este conceito foi ampliado em dois importantes aspectos. Inicialmente, foram descritas ações biológicas para vários outros peptídeos formados a partir da Ang I, caracterizando o SRA como um sistema com a formação de múltiplos mediadores. Entre os peptídeos angiotensinérgicos com ação biológica incluídos neste sistema, além da Ang II, podem ser citados a Angiotensina (2-8) (Ang III), Angiotensina (3-8) (Ang IV), Angiotensina (3-7) e a Angiotensina (1-7) [Ang-(1-7)] (Ardailou, 1997).

AT_{1A} e AT_{1B} em roedores) e AT₂, com 34% de homologia entre si (Stoll & Unger, 2001). Estes receptores têm igual afinidade pela Ang II ou pelos antagonistas peptídicos [Sar¹, Thr⁸] Ang II (sarthran) ou [Sar¹, Ala⁸] Ang II (saralasin). Recentemente, Timmermans e cols. (1993) descreveram alguns antagonistas não peptídicos da Ang II, sendo divididos farmacologicamente em duas classes de acordo com o tipo de receptor pelo qual apresentam maior afinidade: Losartan (antagonista para receptor AT₁) e PD123319 (antagonista para receptor AT₂) (Allen e cols., 1998; Timmermans e cols., 1993).

Entre os peptídeos formados pela cascata do SRA, com ação biológica incluídos recentemente, encontra-se a Ang III. Este peptídeo apresenta afinidade para os receptores AT₁ e AT₂, semelhante à Ang II. No PVN, a aplicação de Ang III mostrou-se mais potente que a Ang II em aumentar a taxa de disparo neuronal (Harding & Felix, 1987; Ambuhl e cols., 1992).

Ang IV, tem suas ações mediadas pelo receptor específico AT₄, (Allen e cols., 1998). No SNC, este peptídeo está envolvido com a facilitação do processo de memória de retenção e dilatação de vasos sanguíneos cerebrais (Brasko e cols., 1988; Moeller e cols., 1996; Naveri e cols., 1994; Wright e cols., 1995).

Um último peptídeo do SRA a ser considerado e que tem recebido atenção especial tornando-se foco de estudos por diversos grupos de pesquisa, é a Ang-(1-7). Uma das razões para este interesse deve-se a possibilidade de sua formação ocorrer diretamente da Ang I pela ação da Prolil-endopeptidase (PEP) e da Endopeptidase Neutra (EPN), consistindo em uma via enzimática independente da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) (Santos e cols., 2000b; Ferrario & Iyer, 1998). Além desta via, a Ang-(1-7) pode ser originada a partir da Ang-(1-9), agora por vias dependentes da ação da ECA, e também a partir da Ang II pela ação da ECA2, uma enzima recentemente identificada que apresenta 70% de homologia com a ECA, e não é bloqueada por inibidores da ECA (Donoghue e cols., 2000; Tipnis e cols., 2000; Burrell e cols., 2004; Crackower, 2002; Santos e cols., 2000b; Ferrario & Iyer, 1998).

Uma vez formada, a Ang-(1-7) pode ser hidrolisada por aminopeptidases originando as Ang-(2-7) e Ang-(3-7) (Chappell e cols., 1990; Welches e cols., 1991; Neves e cols., 1995). Pode ainda ser hidrolisada pela ECA formando a Ang-(1-5) (Chappell e cols., 1998; Deddish e cols., 1998), que constitui uma importante forma de inativação da Ang-(1-7) circulante e possivelmente, também tecidual (Santos e cols., 2000b).

Outros fatores que têm despertado a atenção de grupos de pesquisadores para a o papel da Ang-(1-7) são a sua alta seletividade e o fato de exercer várias ações cardiovasculares (Santos e cols., 2000b). Estudos têm demonstrado que a Ang-(1-7) pode realizar ações similares, distintas e até mesmo opostas às ações da Ang II (Santos e cols., 2000b).

Estudos realizados em ratos, mostraram que o tratamento crônico com inibidores da ECA (iECA) resultou em aumentos dos níveis circulantes da Ang-(1-7) (Iyer e cols., 1998 a,b). Iyer e cols., (1998) observaram que a inibição da síntese de Ang-(1-7), em ratos hipertensos, reverteu os efeitos anti-hipertensivos promovidos pelo tratamento com iECA somente ou em combinação com Losartan (Iyer e cols., 1998 a,b). Estes dados sugerem que a Ang-(1-7) contribui para os efeitos anti-hipertensivos induzidos por antagonista de receptor AT₁ e iECA.

Em ratos submetidos à sobrecarga de água, a administração periférica de Ang-(1-7) produziu um potente efeito antidiurético que não foi bloqueado pela administração do antagonista de vasopressina (AVP) (Baracho e cols., 1998). Adicionalmente, Botelho e cols. (1994) observaram que situações de desbalanço osmótico, causados por privação de água, ou sobrecarga de sal, são potentes estímulos para o aumento da Ang-(1-7) plasmática.

Santos & Baracho (1992), avaliaram o papel da Ang-(1-7) na manutenção do balanço hidro-eletrolítico através de seu efeito antidiurético, realizando injeções intraperitoniais deste peptídeo, de Ang II e de AVP, em ratos normotensos. A administração de Ang-(1-7) apresentou um efeito mais potente que a Ang II em reduzir a diurese destes animais. Quando comparada com a AVP, não foram observadas diferenças significativas e, ao serem administradas simultaneamente, os níveis de diurese chegaram a zero (Santos & Baracho, 1992). Adicionalmente,

Moriguchi e cols. (1994), avaliando a atuação da Ang-(1-7) no controle da síntese de AVP pelo PVN em ratos hipertensos, observaram que a infusão intracerebroventricular (ICV) de Ang-(1-7) através de microdiálise mostrou ser tão potente quanto a Ang II em estimular a síntese de AVP, reforçando o papel da Ang-(1-7) no controle hidro-eletrolítico realizado pelo PVN (Moriguchi e cols., 1994).

As ações da Ang-(1-7) puderam ser melhor avaliadas após a caracterização do [7-D-ALA]-Angiotensina-(1-7) (A-779), como um antagonista seletivo para este peptídeo (Santos e cols., 1994). Santos e cols. (1994) observaram que a administração do A-779 promoveu inibição do efeito antidiurético evocado pela Ang-(1-7), sem alterar a resposta induzida pela AVP (Santos e cols., 1994). No SNC, o efeito vasodepressor gerado pela micronejeção de Ang-(1-7) no NTS foi reduzido pela microinjeção do A-779, que em contrapartida, não alterou a resposta obtida pela microinjeção de Ang II (Santos e cols., 1994). Adicionalmente, foi observado que a resposta pressora induzida pela administração de Ang-(1-7), mas não pela Ang II, no BRVL de ratos, foi também bloqueada pelo A-779 (Santos e cols., 1994). Estes dados provêm evidências consistentes de que as ações da Ang-(1-7) podem ser bloqueadas pelo seu antagonista seletivo A-779 e, sugerem que ambos tenham suas ações mediadas por um receptor específico.

O *Mas* protooncogene, inicialmente detectado *in vivo* por suas propriedades oncogênicas, codifica uma proteína com sete domínios transmembrana hidrofóbicos, e era, até recentemente, considerado um receptor órfão acoplado à proteína G. Através de estudos de binding utilizando camundongos, Santos e cols (2003) demonstraram que a Ang-(1-7) liga-se à proteína G do receptor *Mas*, possibilitando assim, suas ações (Santos e cols., 2003).

Outro aspecto importante para a ampliação do conhecimento do SRA foi a identificação de seus componentes em vários tecidos. Apartir daí, o SRA deixou de ser considerado apenas como um sistema hormonal circulante, mas também um sistema tecidual, desempenhando ações autócrinas e parácrinas em diferentes tecidos, em muitos casos complementando as ações sistêmicas (Santos e cols., 2000a; Allen e cols., 1998). Atualmente o SRA é descrito em vários tecidos, a

citar vasos, rins, glândulas adrenais, órgãos reprodutores, coração e cérebro (Ganong, 1994). A caracterização de um SRA cerebral é de especial interesse, uma vez que os produtos formados neste sistema podem atuar como moduladores no controle simpático em nível central, para o sistema cardiovascular.

1.4 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA CEREBRAL, ANGIOTENSINAS E NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO:

As primeiras evidências quanto às relações do SRA clássico com o SNC foram suscitadas pelos estudos de Bickerton e Buckley (1961), através da demonstração de que a Ang II, além de atuar sobre estruturas cardiovasculares periféricas, podia interagir com o sistema nervoso autônomo, particularmente nas terminações nervosas pós-ganglionares, nos gânglios simpáticos e dentro do SNC, promovendo aumentos dos níveis pressóricos (Bickerton & Buckley, 1961).

Adicionalmente, Epstein e cols. (1970) demonstraram que a administração da Ang II no SNC induzia a sede. Pesquisas subseqüentes realizaram a clonagem do cDNA para renina e angiotensinogênio permitindo a identificação de seus RNA mensageiros (mRNA) no cérebro, sugerindo então, a existência do SRA cerebral (Ferrario e cols., 1991; Moffet e cols., 1987; Printz, 1988).

Atualmente, a maioria dos precursores e enzimas necessários para a formação e metabolismo das angiotensinas, é identificada no cérebro (Ferguson & Washburn, 1998). Apesar de o SRA cerebral parecer atuar de maneira independente da regulação do SRA periférico, angiotensinas circulantes podem influenciar o SRA central através da interação com receptores localizados nos Órgãos Circunventriculares (OCV). As estruturas que constituem os OCV, são altamente vascularizadas, localizam-se nas proximidades dos ventrículos cerebrais e possuem redução da barreira hemato-encefálica permitindo o contato com hormônios da circulação (Wright & Harding, 1994). O angiotensinogênio (AOPEN) participa da composição do fluido espinhal (CSF), sendo uma das proteínas mais abundantes, cerca de 3% das proteínas totais (Wright & Harding, 1992; McKinley e cols., 2003). Evidências têm indicado que o AOPEN cerebral

seja de origem não neuronal, sendo sintetizado em células gliais e astrócitos (Stornetta, 1988; Milsted e cols., 1990; Sernia, 1995; Monti e cols., 2001). Entretanto, estudos de imunohistoquímica realizados em ratos e camundongos transgênicos mostraram haver expressão de AOPEN também em neurônios, embora em menor magnitude (Wright & Harding, 1992; McKinley e cols., 2003).

No SNC, a renina encontra-se em baixas concentrações e sua relação com o AOPEN sintetizado centralmente ainda não está completamente caracterizada. Em estudos realizados com linhagens de camundongos transgênicos nos quais parte do gene que codifica a renina humana foi incorporada em um cromossomo artificial, pôde-se observar que a expressão da renina ocorreu principalmente em cérebro e rins (McKinley e cols., 2003). No cérebro, a renina é expressa em tálamo e hipotálamo, entre outras regiões (Wright & Harding, 1994). A ECA, responsável pela conversão de Ang I em Ang II, é encontrada extensivamente no SNC, apresentando concentrações bastante elevadas nos OCV, gânglios basais, hipófise posterior, CSF, tálamo e hipotálamo, inclusive no PVN (Wright & Harding, 1994; Ferguson e cols., 2001).

A Ang II, principal produto do SRA, é encontrada em diversas áreas do SNC, envolvidas na regulação autonômica (Ferguson e cols., 2001). Estudos de imunohistoquímica demonstram haver extensa distribuição de fibras e terminações nervosas contendo Ang II em várias regiões do cérebro. As maiores concentrações de Ang II são identificadas no sistema límbico, bulbo, medula espinhal e hipotálamo, particularmente no Núcleo Supraóptico (NSO) e PVN (Wright & Harding, 1994; Ferguson e cols., 2001). No PVN, a Ang II atua como um neurotransmissor, causando excitabilidade destes neurônios (Ferguson e cols., 2001). A administração de Ang II no PVN produz efeitos semelhantes aos induzidos pela estimulação química ou elétrica (Ferguson e cols., 2001; Ambuhl e cols., 1994), evidenciando um provável papel excitatório para este peptídeo sobre os neurônios desta região (Ambuhl e cols., 1992). Estes efeitos podem ser abolidos pela administração de antagonistas de receptor AT₁ (Ferguson e cols., 2001).

Os receptores para Ang II têm sido identificados em diversas áreas do SNC e da medula espinhal, importantes na regulação cardiovascular e da homeostase

dos fluidos corporais (McKinley e cols., 2003). Estudos utilizando angiotensinas marcadas com isótopo radioativo demonstraram haver uma distribuição heterogênea dos receptores AT₁ e AT₂ nas diferentes áreas cerebrais (Leung e cols., 1991). Apesar de a maioria das áreas do SNC expressarem apenas um dos receptores, alguns núcleos cerebrais expressam os dois subtipos. O PVN é um destes núcleos, apresentando um predomínio do subtipo AT₁. Este receptor é encontrado em maior densidade nos neurônios da região parvicelular e em menor quantidade na região magnocelular (McKinley e cols., 2003; Allen e cols., 1998). É importante ressaltar que na medula espinhal os receptores AT₁ são encontrados na coluna IML e corno dorsal (McKinley e cols., 2003).

A ativação de receptores AT₁ no PVN parece estar relacionada com várias funções como secreção de hormônio liberador de corticotropina, e controle de ações autonômicas como aumento dos níveis de PA e atividade simpática para os rins (Coote, 1995). O papel funcional destes receptores na regulação do sistema cardiovascular pode ser evidenciado através do estudo de Zhu e cols. (2002), demonstrando que microinjeções de Ang II no PVN de ratos produziram um aumento da atividade simpática do nervo renal (RSNA) e dos níveis de PA, sendo este efeito bloqueado pela administração do Losartan. A microinjeção isolada de Losartan no PVN reduziu os níveis basais de PA, mas não alterou a RSNA, demonstrando que os receptores AT₁ mediam os efeitos excitatórios da Ang II neste núcleo, mas não exercem atuação relevante na manutenção dos níveis simpáticos basais (Zhu e cols., 2002; Egli e cols., 2002).

Em condições normais, os receptores AT₁, localizados nos neurônios do PVN, não parecem ser influenciados diretamente pela Ang II circulante, uma vez que esta não atravessa a barreira hemato-encefálica. Entretanto, podem receber Ang II liberada sinapticamente de aferências oriundas de outras áreas do SNC como *organulum vasculosum* da lâmina terminalis (OVLT), NTS, eminência mediana, Órgão Subfornical (OSF), BRVL e medula espinhal (Li & Ferguson, 1993; Lind e cols., 1985; Ferguson e cols., 2001).

Os receptores AT₂ são encontrados em relativamente poucas regiões do SNC de ratos adultos, não apresentando funções tão bem estabelecidas como os

receptores AT₁ (McKinley e cols., 2003). Existem muitas evidências da expressão do receptor AT₂ em fetos de ratos, macacos e humanos (Grady e cols., 1991; Viswanathan e cols., 1991; Tsutsumi & Saavedra, 1991), sugerindo que este receptor desempenha importante função nos primeiros estágios do desenvolvimento, ou que seja o precursor dos receptores AT₁ (Timmermans e cols., 1993). Especificamente no PVN, estudos têm demonstrado que a ação excitatória da Ang II pode ser bloqueada pelo antagonista de receptor AT₂, PD123319 (Prado e cols., 1996; Camargo e cols., 2002; Saad & Camargo, 2003).

A identificação da Ang-(1-7) como um peptídeo biologicamente ativo do SRA e a caracterização deste sistema em nível cerebral, levaram a especulações quanto à possibilidade de a Ang-(1-7) ser encontrada no SNC. Estudos demonstrando a distribuição neuroanatômica da Ang-(1-7) no cérebro de ratos constataram que imunorreatividade para este peptídeo está restrita a neurônios do diencéfalo (Block e cols., 1989). Além disso, foi encontrada imunorreatividade para Ang II e AVP em áreas semelhantes às aquelas identificadas para Ang-(1-7) como, OSF, Núcleo Supra-quiasmático e PVN (Block e cols., 1989). No PVN, a Ang-(1-7) encontra-se em concentrações equivalentes às Ang I e Ang II, sendo identificada nas regiões magnocelular e parvicelular (Block e cols., 1989; Krob e cols., 1998). Krob e cols., observaram que em ratos hipertensos [(mRen-2d)27], Ang-(1-7) e AVP apresentam-se co-localizadas nas regiões descritas acima, sendo co-liberadas e possivelmente exercendo ações combinadas em órgãos alvo comuns (Krob e cols., 1998). Estes dados sugerem que a Ang-(1-7) participe da via secretora hipotálamo-neuro-hipófise (Block e cols., 1989; Krob e cols., 1998). Historicamente, o primeiro estudo demonstrando a ação biológica da Ang-(1-7) mostrou que este peptídeo é tão potente quanto a Ang II em estimular a liberação de AVP em explantes hipotálamo-hipofisários, sendo isto consistente com o seu papel como um neuromodulador (Schiaivone e cols., 1988).

Estudos demonstraram que a microinjeção de Ang-(1-7) no BRVL de ratos anestesiados produz aumento de PA (Fontes e cols., 1994; Silva e cols., 1993), enquanto que a microinjeção do A-779 reduz a PA e FC (Fontes e cols., 1994). Estudos subsequentes realizados em ratos acordados mostraram que a

microinjeção tanto de Ang-(1-7) quanto de Ang II no BRVL promove aumento de PA sem alterações de FC (Fontes e cols., 1997). Visando avaliar os receptores angiotensinérgicos mediadores das respostas da Ang-(1-7) no BRVL, Fontes e cols., (1994) observaram que a microinjeção de A-779 bloqueou completamente os efeitos produzidos pela Ang-(1-7) nesta região. A microinjeção de antagonistas de receptores AT₁, (Losartan) ou AT₂ (CGP42112A), não apresentou qualquer influência sobre os efeitos da Ang-(1-7), reforçando as evidências quanto a existência de um receptor distinto para a Ang-(1-7) (Fontes e cols., 1994).

Especificamente no PVN, Ambuhl e cols. (1994), demonstraram que aplicações por microiontoforese de Ang-(1-7) resultaram em um aumento da taxa de disparo ou excitabilidade dos neurônios desta região, sendo este efeito seletivamente bloqueado pelo A-779 (Ambuhl e cols., 1994). Em conjunto, estes estudos sugerem que a Ang-(1-7) exerce ações excitatórias em núcleos do SNC envolvidos no controle tônico e reflexo da PA, incluindo o PVN, e que suas ações sejam mediadas por um receptor específico.

O receptor *Mas*, expresso em diversas áreas do SNC como regiões límbicas, estruturas talâmicas e corticais, amígdala (Halbach e cols., 2000) foi apenas recentemente identificado especificamente no PVN (Becker e cols. 2007). Adicionalmente, a identificação do *Mas* áreas como BRVL e NTS, reforçam as evidências sobre a participação da Ang-(1-7) em modular a PA e a atividade simpática para o sistema cardiovascular.

Dessa forma, o primeiro objetivo do nosso estudo foi investigar um possível papel endógeno da Ang-(1-7) sobre parâmetros cardiovasculares e de atividade simpática exercidos pelo PVN.

1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A MODULAÇÃO SIMPÁTICA E DE PRESSÃO ARTERIAL EXERCIDAS PELO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO DURANTE CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS ALTERADAS:

1.5.1 HIPERTENSÃO INDUZIDA POR HIPÓXIA E HIPERCAPNIA INTERMITENTE:

A apnéia do sono é caracterizada por episódios repetidos de cessação do fluxo respiratório durante o período do sono levando à diminuição da saturação de oxigênio (Wolk e cols., 2003). Estima-se que 24% e 9% dos homens e mulheres em idade média tenham apnéia do sono (Young e cols., 1993). Adicionalmente, a apnéia do sono está relacionada a altos níveis de morbidade e mortalidade (Nieto e cols., 2000), por estar geralmente associada a doenças cardiovasculares, especialmente à hipertensão arterial (Peppard e cols, 2000; Fletcher e cols, 1985).

Um dos possíveis mecanismos implicados na indução da hipertensão arterial deve-se à persistente elevação de atividade simpática (Hedner e cols., 1988). Durante os períodos de apnéia, ocorre uma redução da pressão parcial de Oxigênio (PO_2) acompanhada ou não por aumento da pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) no sangue arterial (Fletcher, 2001; Prabhakar e cols., 2005). Nesse sentido, modelos de hipóxia intermitente (HI) em ratos, têm sido desenvolvidos para simular os efeitos da apnéia do sono (Fletcher e cols., 1992; Kanagy e cols., 2001, Allahdadi e cols., 2005). A hipóxia e a hipercapnia são poderosos estímulos para os quimiorreceptores, que através de projeções enviadas para áreas específicas do SNC, induzem aumento das descargas simpáticas (Prabhakar e cols., 2005). O PVN participa das vias neuroanatômicas envolvidas na modulação de respostas cardiovasculares e de atividade simpática à ativação dos quimiorreflexos por hipóxia e hipercapnia (Kubo e cols., 1997; Oliven e cols., 2001; Berquin e cols., 2000). A hiperatividade simpática estimula o SRA, causando aumento da secreção de renina e dos níveis circulantes de Ang II (DiBona, 2001). A Ang II induz vasoconstrição periférica, aumento da resistência vascular renal e da secreção de catecolaminas que levam, finalmente, à elevação

dos níveis de PA (Kara e cols., 2003; Fletcher e cols., 1999). Embora estes efeitos ocorram agudamente (Cuttler e cols., 2004), a frequência do estímulo pode prejudicar a sensibilidade barorreflexa (Narkiewicz e cols., 1998) e a persistência destas respostas finalmente induzem à instalação da hipertensão arterial sistêmica (Fletcher e cols., 1999, Fletcher e cols., 2001).

Várias formas de bloqueio simpático reduzem os efeitos agudos ou crônicos da HI, a citar a denervação dos corpúsculos carotídeos (Fletcher e cols., 2001), simpatectomia renal (Fletcher e cols., 1999), desnervação adrenal (Fletcher e cols., 1999), ablação de nervo simpático (Fletcher e cols., 1999) e administração de antagonistas de receptor AT_1 (Fletcher e cols., 2002). Adicionalmente, a importância da regulação autonômica central em mediar a hipertensão induzida por apnéia do sono pôde ser evidenciada através do estudo de Lahana e cols. (2005), onde a indução de apnéias respiratórias em pacientes com morte cerebral resultou em vasodilatação periférica (Lahana e cols., 2005).

Os neurônios pós-ganglionares simpáticos, mediadores do tônus simpático para todo o organismo, são modulados por descargas simpáticas geradas por grupamentos de neurônios premotores simpáticos, incluindo especificamente o PVN (Allen, 2002; Tagawa & Dampney, 1999; Dampney, 1994). Estudos têm descrito a participação do PVN em estados patológicos que apresentam elevação da atividade simpática e indução de hipertensão como insuficiência cardíaca (IC) (Zucker e cols., 2004), infarto (Zhang & Patel, 1998; Zhu e cols., 2002), sensibilidade Dahl (Weiss e cols., 2007) e SHR (Allen, 2002). Dessa forma, alterações dos mecanismos moduladores das descargas simpáticas geradas no PVN, podem ser responsáveis por induzir simpatoexcitação. Em estudo recente, Weiss e cols. mostraram que a expressão de nNOS está reduzida no PVN, enquanto a de receptores AT_1 está aumentada nos OCV de ratos expostos à HI (Weiss e cols., 2007).

A Ang II têm sido descrita com um componente mediador da hipertensão induzida por apnéia do sono (Fletcher e cols., 1999). Durante a HI, os níveis plasmáticos de Ang II encontram-se elevados, podendo produzir efeitos periféricos e centrais (Fletcher e cols., 1999). A Ang-(1-7) assim como a Ang II, exerce um

efeito excitatório sobre os neurônios do PVN. Dessa forma, o segundo objetivo do nosso estudo consistiu em avaliar se a Ang-(1-7) e Ang II participam da modulação simpática e de PA exercida pelos neurônios do PVN durante a hipertensão induzida por modelo de hipercapnia e HI simulando a apnéia do sono.

1.5.2 HIPEROSMOLARIDADE PLASMÁTICA:

Um dos principais fatores pré-disponentes ao desenvolvimento da hipertensão é o aumento da concentração de sódio no plasma, determinando uma condição de hiperosmolaridade plasmática. O aumento do sódio plasmático ativa osmorreceptores localizados nos OCV promovendo respostas de núcleos centrais especializados na regulação osmótica (Toney e cols., 2003; McKinley e cols., 1999). O PVN participa do eixo hipotálamo-hipofisário, constituindo um local de integração de respostas endócrinas ou neurohumorais e, conseqüentemente, um importante regulador da osmolaridade (Blair e cols., 1996, Badoer 2001, Block e cols., 1989). Os neurônios magnocelulares sintetizam a AVP enviando-a até a hipófise posterior através de projeções neuronais, para ser armazenada e liberada na circulação (Blair e cols., 1996; Badoer, 2001). Adicionalmente, o PVN recebe projeções do OVLT e do OSF, áreas que contêm os corpos celulares dos osmorreceptores (Larsen & Mikkelsen, 1995). O OVLT e o OSF constituem os OCV e estão localizados numa região que apresenta redução da barreira hematoencefálica (Wright & Harding, 1994). Dessa forma, os osmorreceptores estão em contato praticamente direto com o plasma circulante, sendo sensíveis a alterações deste, especialmente à hiperosmolaridade (McKinley e cols, 1999). A principal fonte de estimulação simpática mediando respostas osmóticas parece ser de projeções glutamatérgicas e angiotensinérgicas originadas no OVLT e OSF (Renaud, 1994; Bains & Ferguson, 1997a). Estas projeções, críticas para a produção de AVP, ocorrem devido ao aumento da Ang II plasmática (Iovino & Steardo 1984, Ferguson & Renaud 1986) e envolvem a ativação dos receptores AT₁ no PVN (Bains e cols., 1992).

O PVN participa também do controle autonômico simpático (Blair e cols., 1996; Badoer, 2001), como descrito anteriormente. Os neurônios parvicelulares, através de projeções enviadas tanto para outros grupos de neurônios premotores simpáticos, assim como diretamente para a coluna intermediolateral, modulam o tônus simpático em condições basais e durante alterações de osmolaridade plasmática (Badoer e cols., 2003; Sawchenko & Swanson, 1982; Strack e cols., 1989; Schramm e cols., 1993). A resposta de tônus simpático gerada pelo PVN pode influenciar as funções de outro importante regulador da osmolaridade plasmática, os rins (Sawchenko & Swanson, 1982; Strack e cols., 1989; Schramm e cols., 1993). A inervação simpática renal afeta diretamente túbulos, vasos renais e as células justaglomerulares, podendo influenciar a função de cada uma destas unidades efectoras (DiBona, 2000a). Por exemplo, um aumento de RSNA provoca redução da excreção urinária de água e sódio, por aumentar sua reabsorção tubular nos néfrons, reduz o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular por induzir vasoconstrição renal e aumenta a atividade do SRA, por estimular a secreção de renina pelas células justaglomerulares (DiBona, 2000a).

Nesse sentido, o PVN é uma região integrativa, capaz de influenciar cada um dos três principais sistemas envolvidos na regulação da pressão arterial do controle renal dos fluidos corporais e do balanço hidro-eletrolítico: o sistema nervoso simpático, o sistema renina angiotensina e o sistema vasopressinérgico (Blair e cols., 1996; Toney e cols., 2003).

As Ang podem influenciar núcleos centrais de maneira direta e indireta. Diretamente através de sua produção endógena no tecido cerebral, uma vez que todos os constituintes do SRA estão presentes no cérebro (Ferguson & Washburn, 1998; Wright & Harding, 1994; Ferguson e cols., 2001; McKinley e cols., 2003) e, indiretamente, através dos OCV que têm contato com as Ang circulantes e ao mesmo tempo enviam eferências para áreas como o PVN (DiBona, 2000; Ferguson & Bains 1997). A maioria das ações angiotensinérgicas descritas no PVN são mediadas pela Ang II, agindo através dos receptores AT₁ (Unger e cols., 1988; Chen & Toney, 2001). A Ang-(1-7) exerce um papel excitatório sobre os neurônios do PVN (Ambuhl e cols., 1992; Ambuhl e cols., 1994) e participa do eixo

hipotálamo-hipofisário por estimular a secreção de AVP (Schiavone e cols., 1988; Block e cols., 1988). Botelho e cols (1994) demonstraram que durante situações de desbalanço osmótico tanto a privação de água quanto a sobrecarga de sal, são potentes estímulos para o aumento da Ang-(1-7) plasmática.

Nesse sentido, o terceiro objetivo do nosso estudo consistiu em avaliar o possível envolvimento da Ang-(1-7) agindo sobre os neurônios do PVN, na modulação simpática e de PA durante a hiperosmolaridade plasmática.

1.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO TGR(ASrAOGEN):

A identificação do Angiotensinogênio (AOGEN), único precursor do SRA, no cérebro foi determinante para a caracterização do SRA cerebral (Ganten e cols., 1971; Campbell e cols., 1984; Sernia & Mowchanuk, 1983; Ohkubo e cols., 1986). O AOGEN é encontrado em diversas regiões cerebrais apresentando-se em elevados níveis particularmente no hipotálamo (Sernia, 1995; Sernia e cols., 1997; Bader e cols., 2001) uma área conhecidamente importante na regulação cardiovascular e sítio de ação das angiotensinas (Bader e cols., 2001).

O avanço da tecnologia de manipulação genética permitiu o desenvolvimento de um animal transgênico com alterações do SRA somente no tecido cerebral (Bader & Ganten, 1996; Baltatu & Bader, 2003; Schinke e cols., 1999). O modelo, denominado TGR(ASrAOGEN), expressa um RNA antisense para o AOGEN (Schinke e cols., 1999), suprimindo sua produção pelos astrócitos, principal fonte de AOGEN cerebral (Stornetta, 1988; Sernia, 1995; Yang e cols., 1999). O TGR(ASrAOGEN) apresenta redução de aproximadamente 90% nos níveis de AOGEN cerebral, particularmente no hipotálamo, enquanto que os níveis plasmáticos permanecem inalterados (Schinke e cols., 1999). Como consequência, estes animais apresentam valores de PA e FC reduzidos, e diabetes insipidus-síndrome com baixos níveis plasmáticos de AVP (Schinke e cols., 1999). Adicionalmente, apresentam diminuição da atividade da renina plasmática (ARP) e menor reatividade cardiovascular ao estresse, sugerindo a

importância do SRA cerebral na mediação dos mecanismos de reação ao estresse, modulados pelo sistema nervoso simpático (Baltatu e cols., 2004).

O PVN constitui um dos núcleos premotores simpáticos moduladores do tônus simpático para o sistema cardiovascular, assim como dos níveis de PA (Dampney, 1994; Allen, 2002; Zhang & Patel, 1998; Li & Patel, 2003; Bains & Ferguson, 1997a). Ang-(1-7) e Ang II exercem efeitos excitatórios sobre os neurônios do PVN (Ambuhl e cols., 1992; Ambuhl e cols., 1994). Nesse sentido, o último objetivo do nosso estudo visou avaliar o tônus simpático para o sistema cardiovascular nos TGR(ASrAOGEN) e, adicionalmente, verificar se a redução dos níveis de Ang cerebrais implica em uma redução das descargas simpáticas geradas pelos neurônios do PVN.

Em suma, como descrito anteriormente, embora existam evidências quanto à presença da Ang-(1-7) no PVN e ao efeito de excitatório neuronal induzido nesta região, os efeitos funcionais da microinjeção, e do bloqueio endógeno da Ang-(1-7) sobre a atividade simpática e parâmetros cardiovasculares neste núcleo, não são descritos na literatura. Dessa forma, nosso trabalho visou avaliar a participação da Ang-(1-7) endógena agindo sobre os neurônios do PVN, para a manutenção da PA e da atividade simpática em condições normais e durante condições fisiológicas alteradas, simulando a apnéia do sono e hiperosmolaridade plasmática. Adicionalmente, a participação do SRA cerebral e especificamente das angiotensinas atuando sobre os neurônios do PVN na modulação tônica simpática para o sistema cardiovascular, foi avaliada através da utilização de um modelo de rato transgênico TGR(ASrAOGEN).

2. OBJETIVO:

2.1 OBJETIVO GERAL:

Este estudo teve como objetivo avaliar o possível envolvimento da Ang-(1-7) agindo sobre os neurônios do PVN para a manutenção do tônus simpático e da pressão arterial (PA).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Caracterizar os efeitos cardiovasculares produzidos pela microinjeção de Ang-(1-7) no PVN sobre a PA, FC e atividade simpática; comparar aos efeitos da Ang II;
2. Avaliar uma possível contribuição da Ang-(1-7) endógena ao nível do PVN, na manutenção do tônus simpático e da PA; comparar aos efeitos do bloqueio endógeno da Ang II e à ativação dos receptores GABA_A.
3. Avaliar a participação da Ang-(1-7) endógena em mediar a hipertensão induzida por hipercapnia e hipóxia intermitentes; comparar ao bloqueio da Ang II endógena;
4. Avaliar a participação da Ang-(1-7) endógena na modulação do tônus simpático e da PA durante alterações de osmolaridade plasmática; comparar ao bloqueio da Ang II endógena;
5. Avaliar os efeitos de PA, FC e atividade simpática renal induzidos pela ativação dos receptores GABA_A no PVN de TGR(ASrAOGEN).

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 ANIMAIS:

Para a realização deste projeto foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 250g a 350g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Foram utilizados também ratos transgênicos TGR(ASrAOGEN) e Sprague-Dawley (SD) Hanover, de 4 meses de idade, fornecidos pelo Biotério de Transgênicos do Laboratório de Hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para o estudo da hipertensão induzida por eucapnia e hipóxia intermitente, realizado na Universidade do Novo México, foram utilizados ratos SD machos, pesando entre 250g a 350g fornecidos por Harlan Sprague-Dawley, Indianápolis, IN, EUA.

3.2 ANESTESIA:

Durante todos os procedimentos cirúrgicos e experimentais em que foi avaliada a atividade simpática do nervo renal (RSNA), os animais foram mantidos sob anestesia, utilizando-se uretana (SIGMA) na dose de 1.2 a 1.4 g / kg de peso corpóreo administrada intra-peritonealmente (i.p.). Quantidades adicionais foram administradas intra-venosamente (i.v.; 0.1 g/Kg), quando necessário. A eficácia da anestesia foi verificada pela ausência de reflexo de retirada, após estímulo nociceptivo plantar.

Para a implantação de probe de telemetria, assim como de cânulas de microinjeção utilizadas durante o estudo da hipertensão induzida por hipercapnia e hipóxia intermitente, os animais foram anestesiados com isoflurano, USP (Phoenix Pharmaceutical, INC).

3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS:

3.3.1 ANIMAIS ANESTESIADOS:

3.3.1.1 CANULAÇÃO DE ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS:

Catéteres de polietileno flexíveis com diâmetro de PE 50 foram introduzidos nas veia e artéria femorais. O catéter inserido na veia femoral foi preenchido com salina 0.9% e utilizado posteriormente para a infusão de drogas, durante os procedimentos experimentais. O catéter inserido na artéria femoral foi preenchido com salina heparinizada (0,1ml de 25.000 U.I. de heparina + 0,4ml de salina estéril 0,9%) sendo utilizado posteriormente para o registro de parâmetros cardiovasculares a citar pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM).

3.3.1.2 TRAQUEOSTOMIA:

Um catéter JELCO* Plus (n° 14G 7068 Johnson & Johnson MEDICAL, 4cm) foi introduzido e fixado na traquéia do animal, visando a manutenção da perviedade das vias aéreas, durante os procedimentos experimentais.

3.3.1.3 CRANIOTOMIA PARA INTRODUÇÃO DE AGULHAS DE MICROINJEÇÃO NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO:

Sob efeito de anestesia os animais foram posicionados em decúbito ventral em aparelho estereotáxico (Stoelting IL, USA), com os dentes fixos a -3.3 mm da linha interaural. O crânio foi exposto na linha média para visualização do Bregma, e na região do PVN, localizada a 1.8 mm posterior e 0.5 mm látero-lateral ao Bregma, foi realizada pequena craniotomia. A craniotomia permitiu a introdução de agulhas no cérebro dos ratos (profundidade de 8.0 mm ventral ao Bregma), possibilitando a microinjeção de diferentes drogas bilateralmente no PVN. As

coordenadas estereotáticas adotadas seguiram a padronização do atlas de Paxinos e Watson (1986).

Para a realização de microinjeções no PVN, foram utilizadas agulhas odontológicas (GENGIVAL 30G curta – Becton Dickinson Ind). Estas agulhas foram fixadas à torre do estereotáxico por um suporte contendo uma cânula guia, impedindo sua movimentação. Posteriormente, foram conectadas a um polietileno com diâmetro de PE 10 preenchido com a droga a ser microinjetada. Para a microinjeção das drogas foram utilizadas seringas Hamilton (5 μ L - Reno, Nevada, USA), devidamente posicionadas em um suporte especificamente projetado para permitir a administração exata do volume determinado. O volume injetado foi sempre de 100nl e o tempo entre as microinjeções foi de 2 minutos.

3.3.1.4 EXPOSIÇÃO DO NERVO SIMPÁTICO RENAL:

A área delimitada entre as últimas costelas e a pata traseira esquerda do rato foi exposta com a retirada da pele que a recobre. A musculatura desta região foi divulsionada até a localização do rim esquerdo. As extremidades desta abertura foram fixadas a um campo cirúrgico, permitindo a visualização da aorta, artéria e veia renais e rim esquerdo do animal. Com a utilização de uma lupa (Microscópio cirúrgico Opto sm 2002), o nervo renal foi localizado, isolado e posicionado sobre um par de eletrodos de prata fixos a um micromanipulador, para identificação e registro da atividade simpática. Esta preparação permaneceu imersa em óleo mineral (Nujol) a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ durante todo o experimento. A colocação do óleo mineral teve como objetivos evitar o ressecamento do nervo, proporcionar melhor contato do nervo com o eletrodo e isolar eletricamente o registro da atividade simpática de ruídos externos (Zhang e cols. 2001), possibilitando melhor condução e registro do sinal da atividade simpática deste nervo. A preparação permaneceu em observação por cerca de 20 minutos, para estabilização da atividade simpática do nervo renal, antes do início do experimento.

3.3.2 ANIMAIS NÃO ANESTESIADOS:

3.3.2.1 IMPLANTE DE PROBE DE TELEMETRIA:

Probes de telemetria (DSI modelo PA-C40, Arden Hills, MN) foram implantados na aorta abdominal, através da artéria femoral. A porção sensora foi fixada à parede abdominal interna da cavidade peritoneal, segundo especificação do produtor (DSI Systems). Os animais foram deixados em recuperação por um período de 5 dias até o início dos procedimentos experimentais.

3.3.2.2 CRANIOTOMIA PARA IMPLANTE DE AGULHAS DE MICROINJEÇÃO NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO:

Os animais foram posicionados em decúbito ventral em aparelho estereotáxico (Stoelting IL, USA) sob efeito de anestesia, em procedimento similar ao descrito anteriormente. Adicionalmente, as agulhas foram fixadas e protegidas com material acrílico (Fastcure, KERR e Coralite, Bosworth Company). As cânulas injetoras foram conectadas a uma mini-bomba osmótica (Alzet modelo 2002), fixada subcutaneamente na região dorso-medial entre as escápulas, possibilitando a infusão crônica de drogas no PVN. O volume injetado foi bombeado numa taxa de aproximadamente 0.475 μ L/h, sendo administrado bilateralmente.

3.4 REGISTRO DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E DE ATIVIDADE SIMPÁTICA:

3.4.1 ANIMAIS ANESTESIADOS:

3.4.1.1 REGISTRO DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES:

Para obtenção do registro dos parâmetros cardiovasculares, a cânula inserida na artéria femoral dos ratos foi conectada a um transdutor, que ligado a um sistema de aquisição de dados Power Lab 4/20 (ADInstruments) possibilitou o registro da PAP. As oscilações de pressão captadas foram amplificadas e convertidas em sinais enviados a uma placa de aquisição de dados, através de uma placa de conversão analógico/digital. O software de leitura Chart 4 for Windows realizou uma coleta contínua da PAP, calculando a partir desta, os valores de FC e PAM.

3.4.1.2 REGISTRO DE ATIVIDADE SIMPÁTICA:

O sinal de atividade simpática do nervo renal (RSNA) captado pelo eletrodo foi filtrado (100-1000 Hz), amplificado, e enviado simultaneamente a um osciloscópio (Tektronix 564B) e a um amplificador de som, possibilitando a visualização e identificação da frequência de descarga característica de atividade simpática. As oscilações de descargas simpáticas coletadas passaram por uma placa de conversão analógico / digital, e os sinais foram enviados a uma placa de aquisição de dados. O registro da RSNA realizou-se com a utilização do programa Chart 4 for windows (Power Lab). O sinal captado foi apresentado como sinal bruto, expresso em unidades arbitrárias, e simultaneamente convertido em RSNA integrada, expressa em Volts / segundo, permitindo a quantificação das variações. As atividades simpáticas bruta e integrada, juntamente com as demais variáveis cardiovasculares, foram registradas e apresentadas simultaneamente em diferentes canais do monitor a cada experimento. Ao término dos experimentos os animais foram sacrificados por uma overdose de anestésico administrado i.v.. O ruído residual foi também registrado.

3.4.2 ANIMAIS NÃO ANESTESIADOS:

O probe de telemetria (C-40, DSI systems), inserido na Aorta abdominal através da artéria femoral possibilitou o registro da PAP calculando a partir desta, os valores de FC e PAM. As oscilações de pressão captadas foram amplificadas e, convertidas através de uma placa de conversão analógico/digital em sinais enviados a uma placa de aquisição de dados. O sistema de aquisição de dados da DSI systems realizou uma coleta contínua da PAP, calculando a partir desta, os valores de FC e PAM.

3.4.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ATIVIDADE SIMPÁTICA EFERENTE DESTINADA AOS RINS:

Os rins são órgãos primariamente responsáveis pela manutenção do volume e da composição do fluido extracelular, mantendo estreita correlação com a função circulatória. Adicionalmente, através do SRA, os rins participam da regulação da PA arterial sistêmica, constituindo importante aliado do sistema cardiovascular na manutenção da homeostase.

Grupos de neurônios premotores simpáticos do SNC, conforme citados anteriormente, enviam projeções diretas para os neurônios preganglionares simpáticos localizados na coluna IML. Destes, partem projeções para os neurônios pós-ganglionares simpáticos que vão inervar órgãos específicos diretamente, como intestino, fígado, coração e rins. Dessa forma, o nível de RSNA pode ser utilizado com um indicador do tônus simpático.

A inervação simpática para os rins atua como importante regulador da função renal. Esta inervação distribui-se para diferentes estruturas intra-renais como arteríolas, túbulos e células justaglomerulares. Dessa forma, são responsáveis por promover alterações na hemodinâmica renal, reabsorção tubular e níveis de secreção de renina, que provêm importante contribuição para a adaptação renal em diferentes condições fisiológicas (DiBona, 2000a).

3.5 DROGAS:

Para comparação do efeito da simples administração do volume na região do PVN foi microinjetada solução salina (NaCl 0,9%) estéril, em volume semelhante às demais drogas. Para comparação da magnitude do efeito das drogas, assim como para os experimentos realizados nos TGR(ASrAOGEN) e seu controle (SD), foi microinjetado o agonista de receptor GABA_A, muscimol. O muscimol foi administrado sempre na concentração de 1nmol / 100nl, nos animais anestesiados, por ser considerada uma dose efetiva em reduzir a PA e a atividade simpática, quando injetado no PVN (Allen, 2002; Zhang e cols., 2002). Nos animais não anestesiados, a concentração foi reduzida para 20pmol / 100nl, permitindo a comparação dos efeitos do muscimol com as demais drogas utilizadas.

Todas as drogas foram preparadas em solução salina (NaCl 0,9%) estéril, acondicionadas e posteriormente congeladas em alíquotas de 10µL, não sendo reutilizadas após o seu descongelamento. As drogas administradas através de mini-bombas osmóticas foram preparadas imediatamente antes de serem acondicionadas no compartimento da mini-bomba osmótica.

Os peptídeos angiotensinérgicos administrados foram:

Angiotensina-(1-7):

- PM= 898,1;
- 25pmol / 100nl e 1nmol / 100nl;
- BACHEM.

Angiotensina II:

- PM=1046,2;
- 25pmol / 100nl;
- BACHEM.

Os antagonistas angiotensinérgicos utilizados foram:

A-779 [antagonista seletivo da Ang-(1-7)]:

- PM= 873,1;
- 0,1nmol / 100nl e 1nmol / 100nl;
- BACHEM.

Losartan (antagonista de receptor angiotensinérgico subtipo AT₁):

- PM= 461,1;
- 1nmol / 100nl;
- Departamento de Química – ICEX – UFMG.

CV11974 (antagonista específico do receptor angiotensinérgico subtipo AT₁):

- PM= 440;
- 1nmol / 100nl;
- Takeda Chemical Industries.

ZD7155 (antagonista específico do receptor angiotensinérgico subtipo AT₁):

- PM= 475;
- 0.1nmol / 100nl;
- Tocris bioscience.

PD123319 (antagonista de receptor angiotensinérgico subtipo AT₂):

- PM= 736,7;
- 1nmol / 100nl;
- Cedido gentilmente pelo Dr. Navar (Toulane University – New Orleans, U.S.A.).

3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS:

3.6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES E DE ATIVIDADE SIMPÁTICA INDUZIDOS PELA AÇÃO DE ANGIOTENSINAS SOBRE NEURÔNIOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO, EM CONDIÇÕES NORMAIS:

3.6.1.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES E DE ATIVIDADE SIMPÁTICA INDUZIDOS PELA MICROINJEÇÃO DE ANGIOTENSINAS NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO:

Esta etapa de experimentos visou caracterizar os efeitos cardiovasculares e de atividade simpática produzidos pela microinjeção de angiotensinas no PVN em ratos anestesiados. Para isso, Ang-(1-7) (25pmol/100nl), Ang II (25pmol/100nl) ou veículo salina 0.9% (100nl) foram microinjectados bilateralmente neste núcleo.

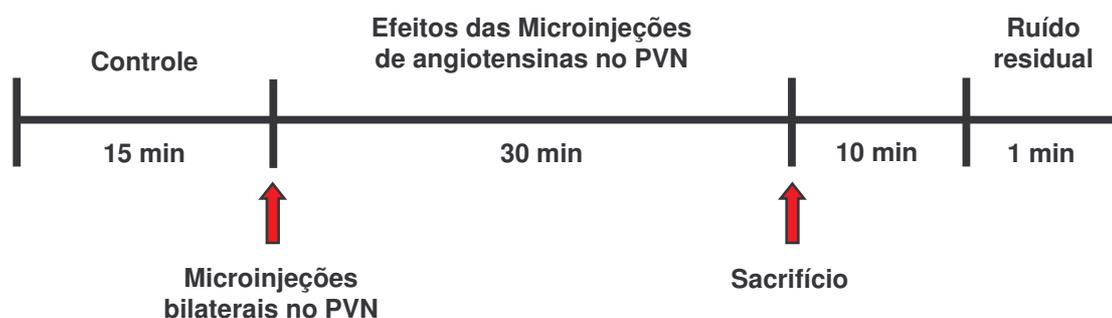


Figura 05. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação dos efeitos da microinjeção de angiotensinas no PVN.

3.6.1.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES E DE ATIVIDADE SIMPÁTICA INDUZIDOS PELO BLOQUEIO DAS ANGIOTENSINAS ENDÓGENAS NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO:

Esta etapa de experimentos teve por objetivo bloquear a ação das angiotensinas endógenas, revelando uma possível atuação destas sobre os níveis basais de PA e de atividade simpática modulados pelos neurônios do PVN. Inicialmente, o antagonista seletivo da Ang-(1-7), A-779, foi microinjectado bilateralmente no PVN nas concentrações de 0,1nmol / 100nl e 1nmol / 100nl. Os efeitos do bloqueio da Ang-(1-7) no PVN foram comparados aos efeitos induzidos pela microinjeção de veículo no mesmo volume e do agonista de receptor GABA_A, muscimol (1nmol / 100nl). Os antagonistas dos receptores da Ang II subtipos AT₁, Losartan e CV11974, e AT₂, PD123319, foram também microinjectados bilateralmente no PVN, na concentração equimolar de 1nmol / 100nl.

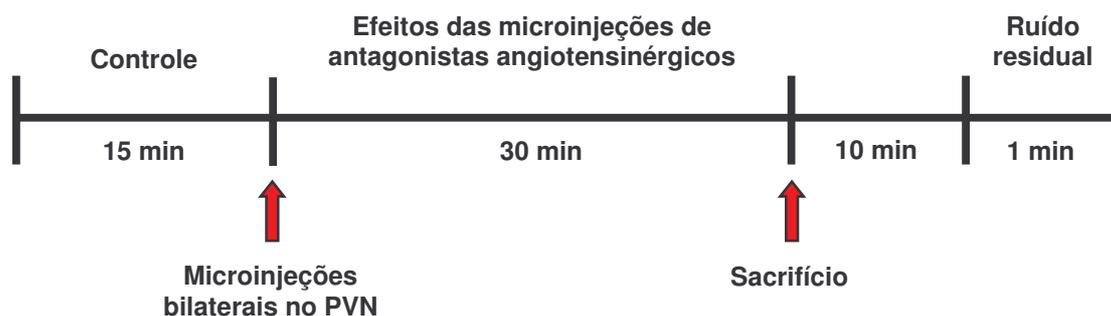


Figura 06. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação dos efeitos do bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN.

3.6.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES E DE ATIVIDADE SIMPÁTICA INDUZIDOS PELO BLOQUEIO DAS ANGIOTENSINAS ENDÓGENAS NO PVN, EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS ALTERADAS:

3.6.2.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELA AÇÃO DAS ANGIOTENSINAS ENDÓGENAS NO PVN, DURANTE A HIPERTENSÃO INDUZIDA POR HIPÓXIA E HIPERCAPNIA INTERMITENTE:

Para avaliar a participação das angiotensinas endógenas no PVN, na modulação da hipertensão induzida pela apnéia do sono, os animais foram submetidos a um modelo de hipóxia e hipercapnia intermitentes (HI/HC) em ratos, desenvolvido na Universidade do Novo México, EUA. O protocolo consistiu em simular as alterações dos gases sanguíneos experimentadas por pacientes durante as pausas respiratórias. Os ratos foram colocados em caixas fechadas com aberturas somente para permitir as mudanças de fluxo de ar no interior destas e para colocação de garrafa de água. O ar dentro das caixas foi controlado e predeterminado para infundir ar ambiente ou uma mistura de CO₂ e N₂ a cada 90 segundos. Cada ciclo completo teve duração de 3 minutos, sendo repetido durante 7 horas / dia no período de repouso dos animais. Como consequência, a concentração dos gases no interior das caixas variou de: 21%-5% para o O₂ e de 0%-5% para o CO₂, impondo a exposição à HI/HC (Figura 07).

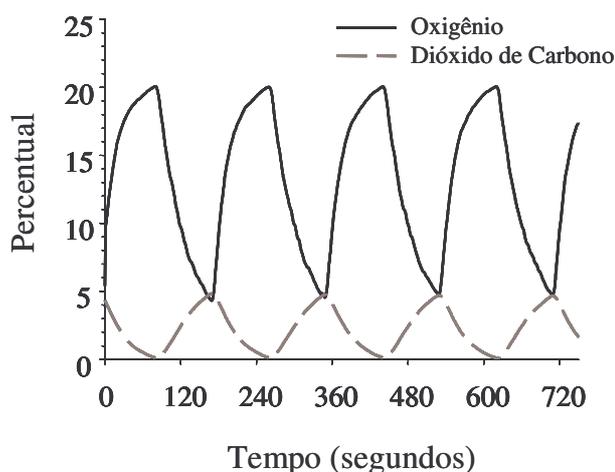


Figura 07. Esquema representando mudanças nas concentrações de O_2 e CO_2 inalados durante os ciclos de hipóxia e hipercapnia intermitentes. Cada ciclo completo teve duração de 3 minutos, sendo repetido por 7 horas / dia, durante o período de repouso dos ratos, simulando a apnéia do sono.

Simultaneamente à realização do protocolo de HI/HC, os animais receberam infusão de antagonistas angiotensinérgicos diretamente no PVN como descrito anteriormente. As drogas infundidas foram A-779 (2nmol/h), Losartan (2nmol/h), ZD7155 (0.2nmol/h) e PD123319 (2nmol/h). Adicionalmente, muscimol (20pmol/h) e salina (≈ 475 nl/h) foram infundidos como controle adicionais. Todas as drogas foram administradas tanto em animais submetidos a HI/HC quanto nos animais que receberam somente alterações de fluxo de ar ambiente (sham). Dessa forma, foi possível a caracterização dos efeitos do bloqueio crônico das angiotensinas endógenas no PVN em condições normais, ou na hipertensão induzida por HI/HC. Os valores de PAM e FC foram registrados por telemetria.

Para a análise da atividade da renina plasmática (ARP), um grupo separado de animais foi submetido à exposição HI/HC por 15 dias. Ao término deste período os animais foram sacrificados com uma overdose de anestésico (sodium pentobarbital, 50mg/Kg) para a coleta de sangue. O sangue foi então centrifugado a 3.500 rpm por 10 minutos a 4°C. O plasma sobrenadante foi congelado e utilizado posteriormente para medir a ARP (Gamma Coat Plasma Renin Activity).

Em outro grupo de animais, foi coletado sangue arterial (0.3ml), através de cânula inserida na artéria femoral, antes do início da ciclagem dos gases e durante

a exposição à HI/HC, especificamente nos picos de hipóxia / hipercapnia e de normóxia. As amostras de sangue foram utilizadas para medir as alterações nas pressões parciais de O₂ e CO₂ (PO₂ e PCO₂) induzidas pela HI/HC.

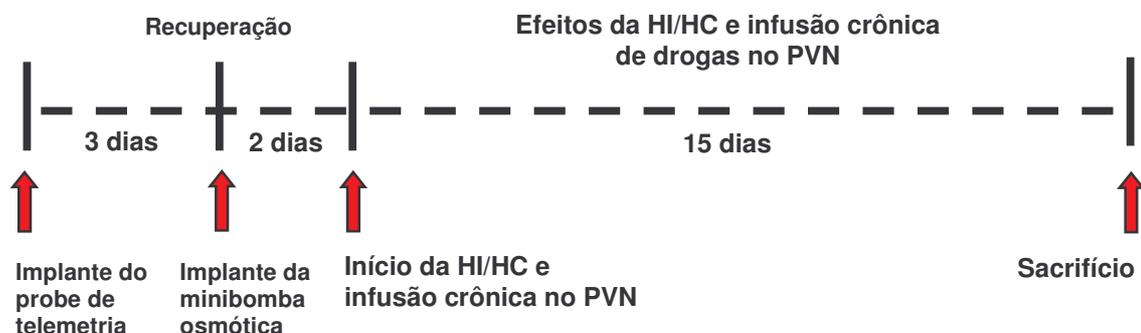


Figura 08. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação dos efeitos do bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN durante a exposição a ciclos de HI/HC.

3.6.2.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES E DE ATIVIDADE SIMPÁTICA INDUZIDOS PELO BLOQUEIO DAS ANGIOTENSINAS ENDÓGENAS NO PVN, DURANTE ALTERAÇÕES DE OSMOLARIDADE:

Esta etapa de experimentos visou caracterizar a participação das angiotensinas endógenas agindo sobre os neurônios do PVN, na modulação do tônus simpático e de variáveis cardiovasculares, durante hiperosmolaridade plasmática. A indução da hiperosmolaridade plasmática foi realizada através da infusão de salina hipertônica (SHT, 1M e 2.5M) i.v. durante os procedimentos experimentais. Após o período inicial de coleta dos valores basais, os animais foram infundidos com SHT (10µl/100g peso corporal por minuto) durante 30 minutos, sendo então, realizadas microinjeções bilaterais no PVN. As drogas utilizadas foram A-779 (1nmol/100nl) e Losartan (1nmol/100nl). Os efeitos sobre a MAP, FC e RSNA foram avaliados durante 30 minutos. Em um grupo separado de animais, foi realizada a infusão de salina isotônica (SIT, 0.15M) para possibilitar a comparação do efeito da simples administração de volume. Uma amostra de

sangue venoso (0.1ml) foi coletada imediatamente antes e após a infusão de SIT ou SHT, e uma vez mais ao término do experimento. O sangue foi colocado em tubos heparinizados e centrifugado a 3.500 rpm (Centrifuge 5417R Eppendorf) por 10 minutos a 4°C. O plasma sobrenadante foi separado, congelado a -20°C e utilizado posteriormente para a determinação da osmolaridade plasmática (Osmometer Precision Systems).

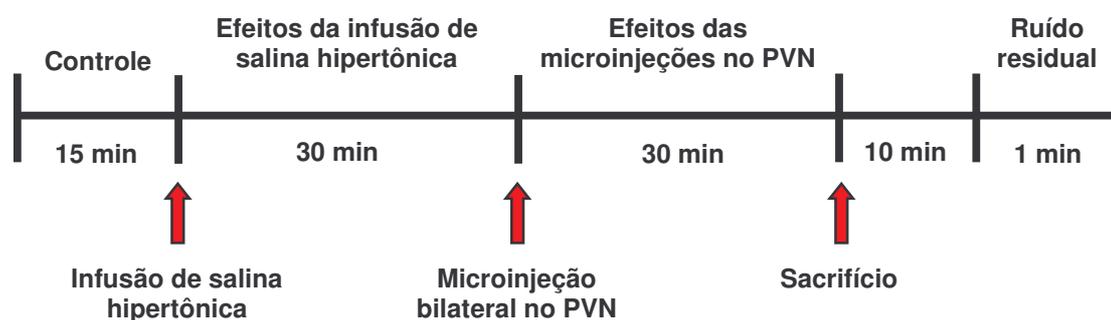


Figura 09. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para avaliação dos efeitos do bloqueio das angiotensinas endógenas no PVN durante alterações de osmolaridade plasmática.

3.6.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA CEREBRAL NA MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE SIMPÁTICA E DA PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS TRANSGÊNICOS (ASRAOGEN) (TGR).

3.6.3.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELA INIBIÇÃO DOS NEURÔNIOS DO PVN EM TGR E RATOS SD:

Esta etapa de experimentos foi realizada no sentido de avaliar a importância do SRA cerebral e especificamente a das angiotensinas atuando sobre os neurônios do PVN para a manutenção do tônus simpático destinado ao sistema cardiovascular. Para isso foi utilizado um modelo de rato transgênico TGR(ASrAOGEN) (TGR) que apresenta baixos níveis de angiotensinogênio (AOGEN) cerebral (Schinke e cols., 1999).

A participação das angiotensinas agindo sobre os neurônios do PVN para a manutenção do tônus simpático e da PA foi avaliada ao se comparar os efeitos da inibição destes neurônios em ratos TGR e SD. Para isso foram realizadas microinjeções de muscimol no PVN de ratos TGR e SD. Salina 0.9% foi injetada em um grupo separado de ratos SD, como um controle adicional, para demonstração dos efeitos da administração de volume no PVN.

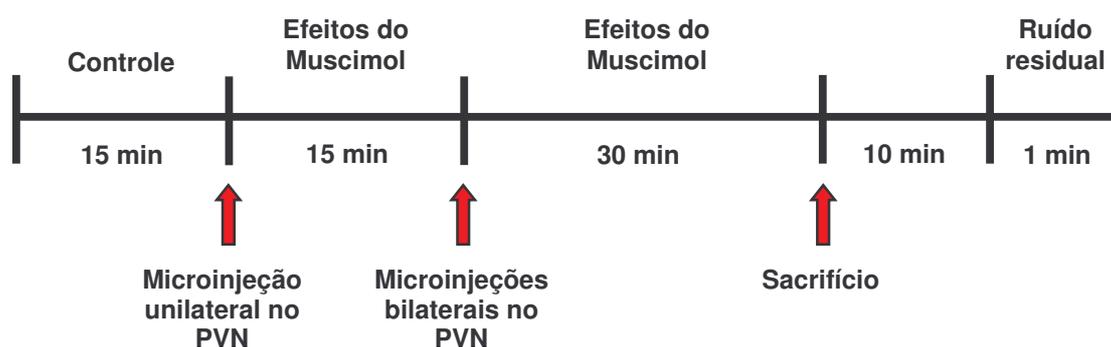


Figura 10. Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental utilizado para a avaliação dos efeitos da microinjeção do agonista de receptor $GABA_A$ no PVN de TGR(ASrAOGEN).

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA:

Ao término dos procedimentos experimentais, microinjeções de corante Alcian Blue (100nl) foram realizadas nas mesmas coordenadas utilizadas para as microinjeções das diferentes drogas utilizadas. Os cérebros foram removidos e colocados em uma solução de Formolaldeído a 10%, seguido de Sucrose 4%. Após 3 dias os cérebros foram seccionados em um micrótomo, em fatias de aproximadamente 50 μ m de espessura. Os cortes foram colocados em lâminas de histologia previamente gelatinizadas para serem, então, corados através da técnica de vermelho neutro. Os sítios de injeção marcados pelo corante foram utilizados para confirmação do local da microinjeção com o auxílio de um microscópio, através da comparação com o atlas de Paxinos e Watson (1986).

3.8 ANÁLISE DOS DADOS:

3.8.1 ANIMAIS ANESTESIADOS:

3.8.1.1 ANÁLISE DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA:

Os valores basais de PAM e FC foram considerados como as médias destes, coletadas pelo período de 1 minuto dentro dos 5 minutos que antecederam a infusão da salina hipertônica, assim como as microinjeções no PVN. Similarmente, foram calculadas as médias dessas variáveis aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após estes procedimentos.

3.8.1.2 ANÁLISE DE ATIVIDADE SIMPÁTICA DO NERVO RENAL BASAL:

A análise da RSNA basal foi realizada utilizando-se o programa Spike Histogram (versão Chart 5 for windons). O valor do ruído foi considerado como a média de número de spikes a cada segundo da RSNA bruta, após o sacrifício dos animais. Em seguida, o valor do ruído foi subtraído dos valores basais e após a microinjeção de muscimol no PVN, obtendo-se o número de spikes por segundo nos períodos respectivos. Os valores basais e após as microinjeções foram considerados sempre por um período fixo para a comparação entre os grupos (Morgan e cols., 1995a).

3.8.1.3 ANÁLISE DE ATIVIDADE SIMPÁTICA DO NERVO RENAL:

Para a análise da RSNA, foram consideradas as variações do registro da RSNA integrada. De forma semelhante à coleta de PAM e FC, o valor basal, foi coletado por 1 minuto dentro dos 5 minutos antecedentes à infusão de salina hipertônica, assim como às microinjeções no PVN. Os valores seguintes foram

avaliados aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após estes procedimentos. Os valores encontrados foram calculados pela média de 5 picos consecutivos, nos tempos considerados. A média do ruído foi subtraída de todos os pontos analisados e o resultado desta, considerado como o valor absoluto. As variações dos valores de RSNA foram expressas como variação percentual do valor basal.

3.8.2 ANIMAIS NÃO ANESTESIADOS:

Os valores PAM e FC foram considerados como as médias destes, coletadas no período de 1 dia durante todo o período em que os animais foram submetidos a HI/HC ou sham com simultânea infusão de drogas no PVN.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Para a análise estatística foram utilizados testes *two-way* ANOVA seguido pelo teste de correção de Bonferroni, *one-way* ANOVA com post-test Newman Keuls e teste *t* de *Student*, empregados de acordo com o protocolo realizado. Todos os valores foram expressos como médias \pm Erro Padrão da Média (EPM). $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS:

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DE ANGIOTENSINAS AGINDO SOBRE OS NEURÔNIOS DO PVN NA MODULAÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E DA PRESSÃO ARTERIAL.

4.1.1 EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE ANGIOTENSINAS NO PVN SOBRE O TÔNUS SIMPÁTICO E A PRESSÃO ARTERIAL.

A realização de microinjeções bilaterais de Ang-(1-7) e de Ang II, no PVN de ratos anestesiados, não promoveu alterações significativas de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC). Em relação a atividade simpática do nervo renal (RSNA), a administração de Ang-(1-7) promoveu uma elevação significativa desta variável, atingindo seus valores máximos aos 10 minutos ($+24\pm 8\%$ vs $+3\pm 3\%$ salina) e retornando, já aos 15 minutos, aos níveis basais. A microinjeção de Ang II também promoveu um aumento de RSNA, em magnitude similar à elevação induzida pela Ang-(1-7), e que atingiu seus valores máximos aproximadamente aos 10 minutos ($+22\pm 2\%$). Vale destacar que o aumento de RSNA produzido pela Ang II, foi mais prolongado, sendo mantido durante todo o período experimental avaliado (Figura 11). Os valores de PAM e FC destes grupos estão apresentados na Tabela 02 do Anexo.

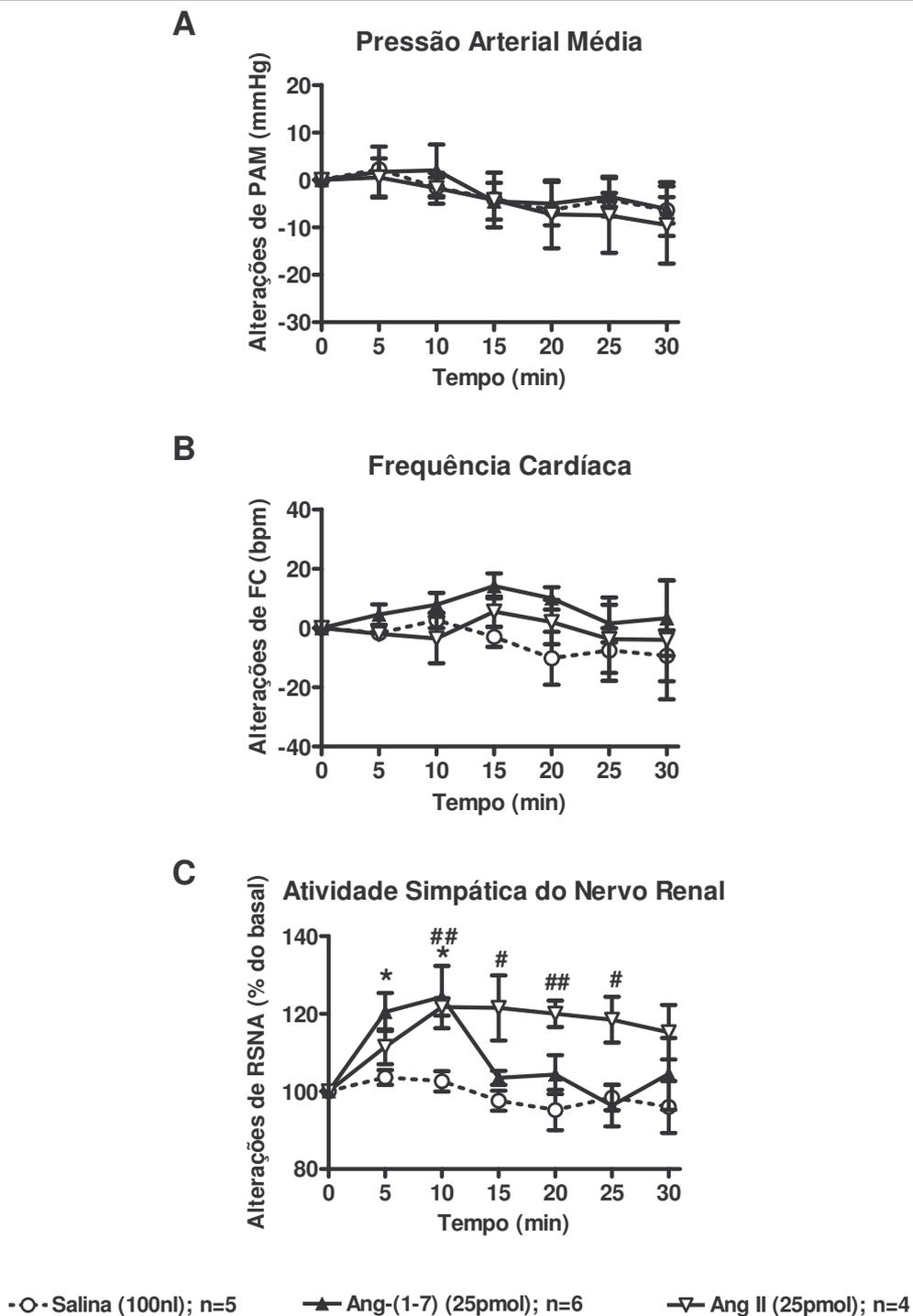


Figura 11. Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta às microinjeções bilaterais de veículo (100nl), Ang-(1-7) (25pmol) e Ang II (25pmol) no PVN. Valores referentes às médias coletadas a cada 5 minutos após as microinjeções, comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores absolutos (A e B) e valores percentuais (C). * $P < 0.05$ para Ang-(1-7) vs salina; # $P < 0.05$ e ## $P < 0.01$ para Ang II vs salina (Two-way ANOVA com post-test Bonferroni).

4.1.2 EFEITOS DO BLOQUEIO DAS ANGIOTENSINAS ENDÓGENAS NO PVN SOBRE O TÔNUS SIMPÁTICO E PRESSÃO ARTERIAL.

A Figura 12 ilustra os efeitos do bloqueio da Ang-(1-7) endógena no PVN, através da microinjeção bilateral do antagonista seletivo da Ang-(1-7), A-779 na concentração de 0,1nmol / 100nl, comparado à microinjeção de salina (100nl). Pode-se observar que a administração do A-779 não produziu alterações nos valores basais de PA e de FC. Entretanto, os níveis basais de RSNA foram acentuadamente reduzidos. Este efeito foi evidente já aos 5 minutos após a microinjeção, com redução máxima, de aproximadamente 25%, aos 10 minutos, seguidos de uma tendência à recuperação dos valores basais.

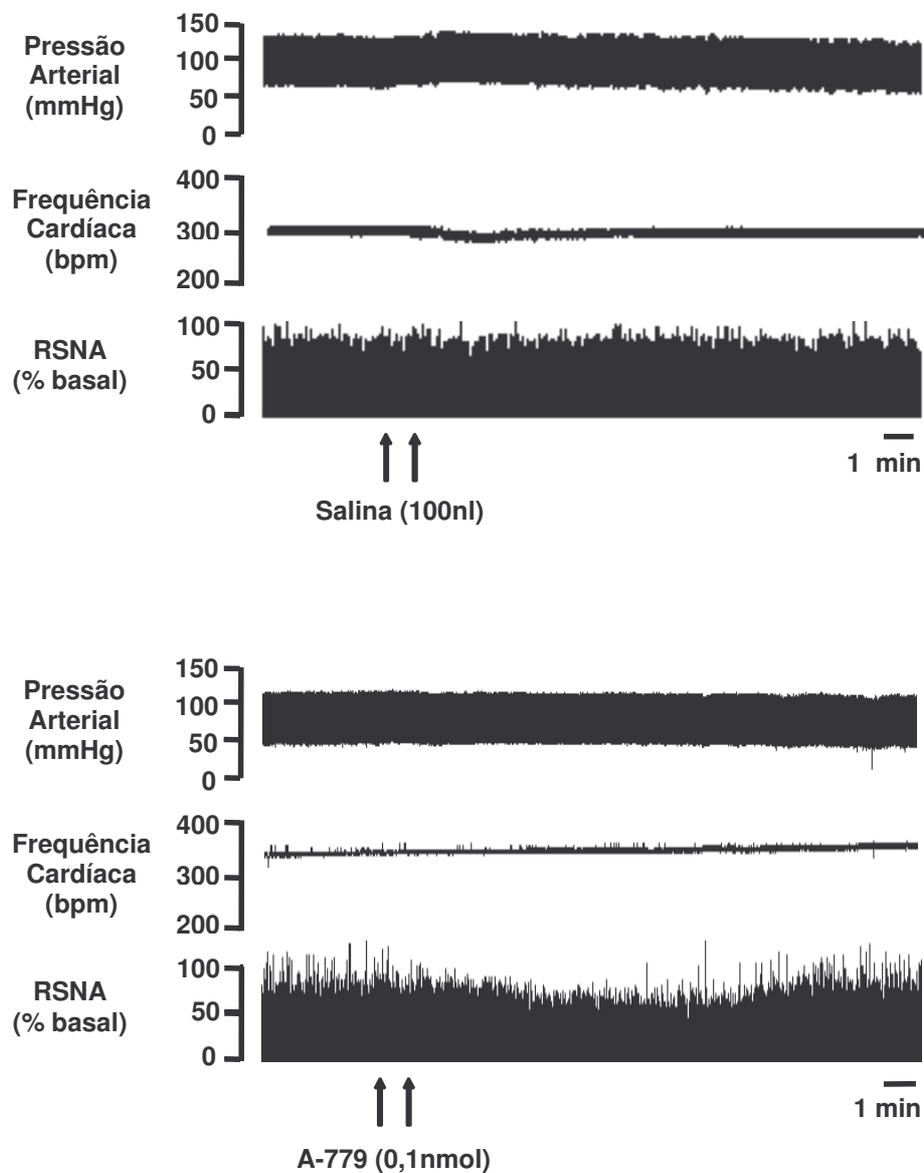
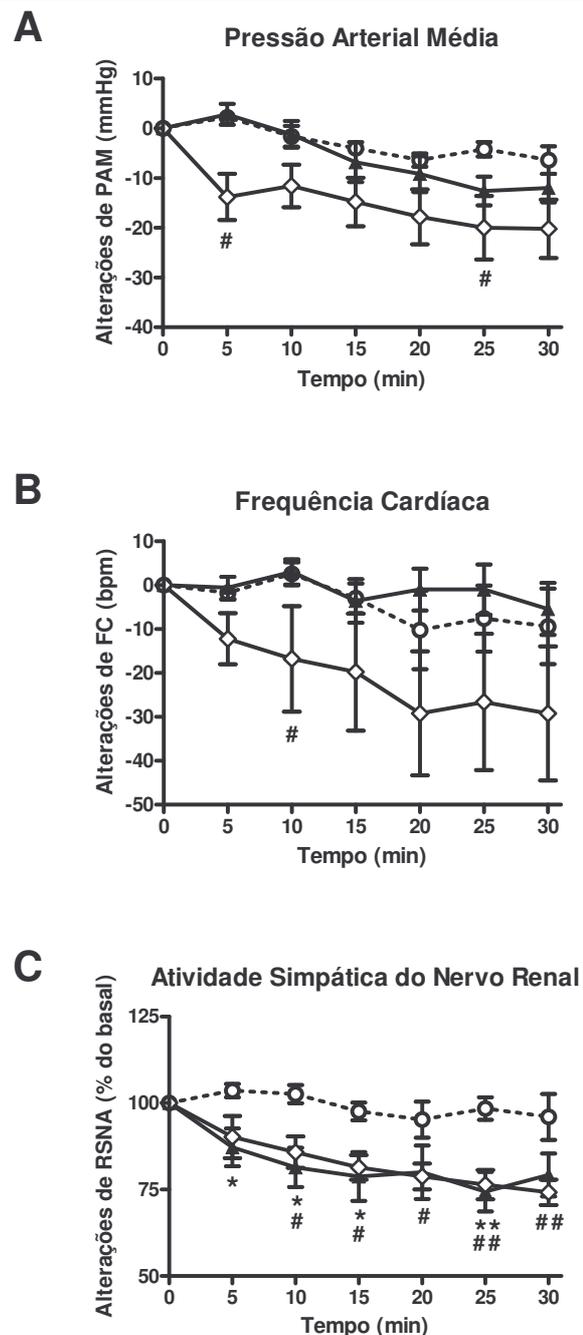


Figura 12. Registro ilustrando as respostas de PA, FC e RSNA produzidas pela microinjeção bilateral de A-779 (0,1nmol) no PVN. As setas indicam o momento da microinjeção.

As microinjeções bilaterais de A-779 na concentração de 0,1nmol no PVN não produziram alterações de PAM e FC quando comparadas ao grupo controle. Entretanto, ao se avaliar a resposta da RSNA, pôde-se observar uma redução acentuada e significativa em relação aos níveis basais desta variável. A queda de atividade simpática ocorreu imediatamente após a microinjeção do A-779 e alcançou redução máxima aos 25 minutos ($-26\pm 6\%$ vs $-2\pm 3\%$ salina).

A Figura 13 mostra que a magnitude da redução de RSNA produzida pela microinjeção do A-779 foi comparável àquela induzida pela microinjeção de muscimol ($-24\pm 4\%$), também significativa quando comparado ao grupo controle.

Paralelamente à queda de RSNA, a microinjeção de muscimol no PVN, produziu redução significativa de PAM (redução máxima aos 25 minutos: -20 ± 6 mmHg vs -4 ± 2 mmHg salina) e FC (aos 10 minutos: -17 ± 12 bpm vs 3 ± 3 bpm salina) em relação ao grupo controle (Figura 13). Os valores de PAM e FC destes grupos estão apresentados na Tabela 03 do Anexo.



-○- Salina (100nl); n = 5 -▲- A-779 (0.1nmol); n = 5 -◇- Muscimol (1nmol); n = 5

Figura 13. Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta às microinjeções bilaterais de salina (100nl), A-779 (0,1nmol) e muscimol (1nmol) no PVN. Valores referentes às médias coletadas a cada 5 minutos após as microinjeções, comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores absolutos (A e B) e valores percentuais (C). * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ para A-779 vs salina; # $P < 0.05$ e ## $P < 0.01$ para muscimol vs salina (*Two-way ANOVA* com post-test Bonferroni).

A Figura 14 mostra as alterações de PAM, FC e RSNA produzidas pela microinjeção bilateral dos diferentes antagonistas angiotensinérgicos no PVN de ratos anestesiados.

Para avaliar a efetividade do bloqueio da Ang-(1-7) endógena no PVN, foram realizadas microinjeções do A-779 na concentração mais elevada de 1nmol/100nl. Adicionalmente, para avaliar a contribuição da Ang II no PVN, para a manutenção da atividade simpática e da PA, foram microinjetados os antagonistas de receptor subtipo AT₁, Losartan e CV11974, e o antagonista de receptor subtipo AT₂, PD123319. A concentração utilizada para todos os antagonistas foi 1nmol/100nl, e os efeitos sobre a PA, FC e RSNA produzidos pela microinjeção destes foram comparados com a microinjeção de veículo salina (100nl).

A microinjeção do A-779, desta vez, promoveu redução discreta, mas significativa dos níveis basais de PAM (-2 ± 1 mmHg vs salina: 2 ± 1 mmHg; $P<0.05$), não sendo acompanhada por alterações de FC. Adicionalmente, o A-779 (1nmol) induziu uma redução gradativa e significativa de RSNA (redução média máxima: -21 ± 4 % vs salina: -2 ± 3 %; $P<0.01$), de maneira similar à redução induzida pela microinjeção em concentração mais baixa (0,1nmol)

O bloqueio dos receptores AT₁, através da microinjeção de Losartan, como esperado, induziu uma redução significativa de PAM (-13 ± 2 mmHg vs salina: -4 ± 1 mmHg; $P<0.05$) sem alterações de FC e RSNA. Por outro lado, a microinjeção de CV11974 resultou em um aumento significativo de RSNA (21 ± 5 % vs salina: 4 ± 2 %; $P<0.05$), observado somente aos 5 minutos após a administração desta droga, não sendo acompanhado por quaisquer alterações de PAM ou FC.

O bloqueio dos receptores AT₂, através da microinjeção de PD123319 reduziu significativamente os níveis basais de RSNA (-18 ± 3 % vs salina: -2 ± 3 %; $P<0.05$), sem alterar os valores basais de PAM e FC. A magnitude de redução de RSNA produzida pela microinjeção do PD123319, pôde ser comparada à redução induzida pelo A-779 (redução máxima: -21 ± 4 %), sendo diferenciada apenas por atingir significância somente aos 25 minutos após sua administração. Os valores de PAM e FC destes grupos são apresentados na Tabela 04 do Anexo.

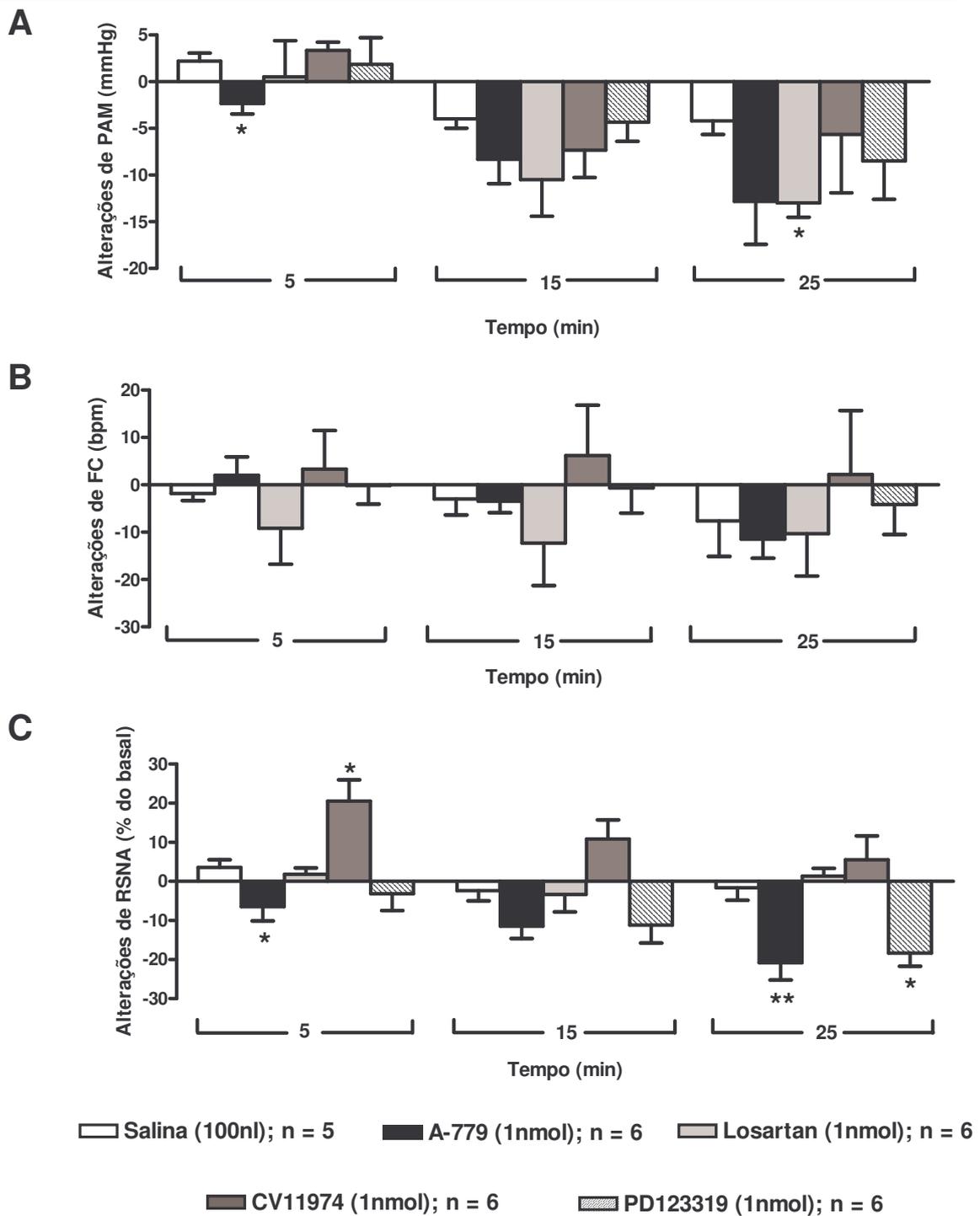


Figura 14. Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta às microinjeções bilaterais de salina (100nl), A-779 (1nmol), Losartan (1nmol), CV11974 (1nmol) e PD123319 (1nmol) no PVN. Valores referentes às médias coletadas aos 5, 15 e 25 minutos após as microinjeções, comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores absolutos (A e B) e percentuais (C). * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ comparado com salina (*Two-way ANOVA* com post-test de Bonferroni).

4.2 ENVOLVIMENTO DAS ANGIOTENSINAS ENDÓGENAS NOS NEURÔNIOS DO PVN PARA A MANUTENÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E DA PRESSÃO ARTERIAL EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS ALTERADAS:

Diferentes condições fisiológicas ou patofisiológicas, podem alterar a participação tanto dos peptídeos quanto dos receptores angiotensinérgicos na modulação tônica simpática e de PA exercida pelo PVN. No intuito de avaliar a participação das angiotensinas atuando sobre os neurônios do PVN em condições fisiológicas alteradas nós realizamos 2 metodologias, simulando situações comumente observadas em humanos: hipertensão arterial sistêmica induzida por hipóxia e hipercapnia intermitentes (HI/HC) ou por hiperosmolaridade plasmática.

4.2.1 EFEITOS DO BLOQUEIO DAS ANGIOTENSINAS ENDÓGENAS NO PVN SOBRE O TÔNUS SIMPÁTICO E PRESSÃO ARTERIAL, DURANTE A HIPERTENSÃO INDUZIDA POR HIPÓXIA E HIPERCAPNIA INTERMITENTES.

4.2.1.1 MEDIDA DA PO₂ E DA PCO₂ ARTERIAL:

Em um grupo separado de animais (n=5) foi coletado sangue arterial no momento de máxima redução de O₂ e aumento de CO₂ ofertado durante o período de exposição à HI/HC. A PO₂ foi significativamente reduzida (Hipóxia: 36±4 mmHg vs normoxia: 63±3 mmHg; $P<0.05$) enquanto que a PCO₂ apresentou um aumento discreto, mas significativo somente quando comparado aos valores de normóxia enquanto os animais estavam expostos à HI/HC (hipercapnia: 32±1 mmHg vs normoxia: 26±1 mmHg; $P<0.05$; Figura 15). Porque os animais não se tornaram hipercápnicos em relação a seu padrão normal (antes da exposição), mas apenas mantiveram os valores de CO₂, denominamos a exposição como resultando em eucapnia e hipóxia intermitente (E-HI). Dessa forma os efeitos obtidos por esta exposição serão descritos como em decorrência de E-HI.

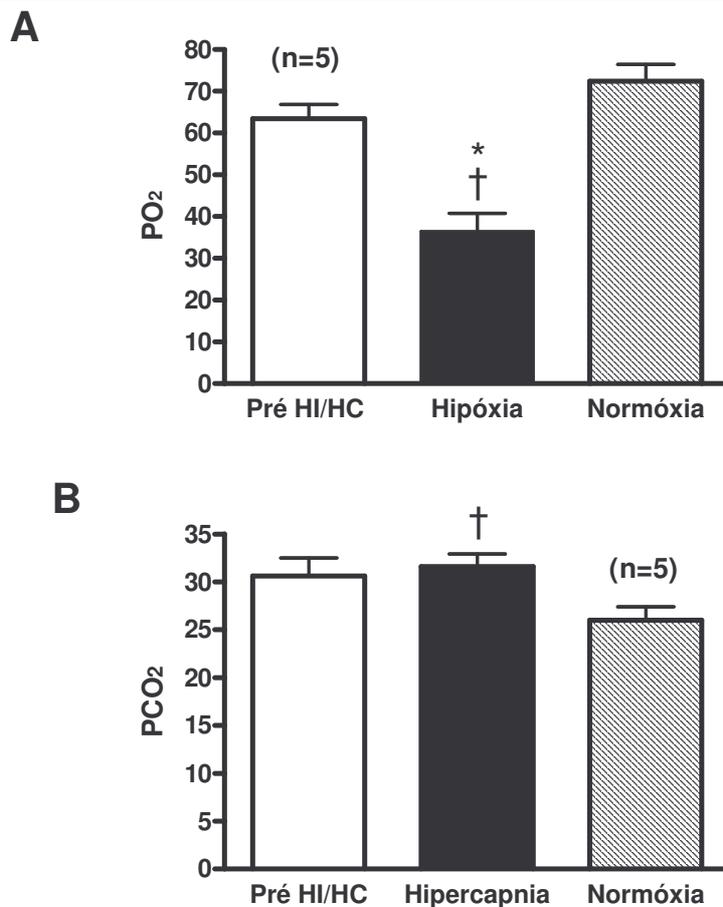


Figura 15. Dados agrupados apresentando os efeitos da exposição HI/HC (n=5) sobre os gases sanguíneos arteriais (A) PO₂ e (B) PCO₂. * $P < 0.05$ para período de hipóxia e hipercapnia comparado ao período de normoxia anterior à exposição HI/HC e † $P < 0.05$ para o período de hipóxia e hipercapnia comparado ao período de normoxia durante a exposição à HI/HC (*One-way ANOVA* com post-test de Newman-Keuls).

4.2.1.2 MEDIDA DA ATIVIDADE DA RENINA PLASMÁTICA:

A Figura 16 mostra os níveis de atividade da renina plasmática (ARP). Esta medida foi realizada no sentido de demonstrar a ativação do SRA induzida pela exposição a E-HI simulando a apnéia do sono. A ARP foi significativamente aumentada nos animais expostos aos ciclos E-HI (n=5) comparado aos animais sham (n=6) após 14 dias de tratamento (E-HI: 20 ± 2 ng/ml/h vs sham: 11 ± 0 ng/ml/h).

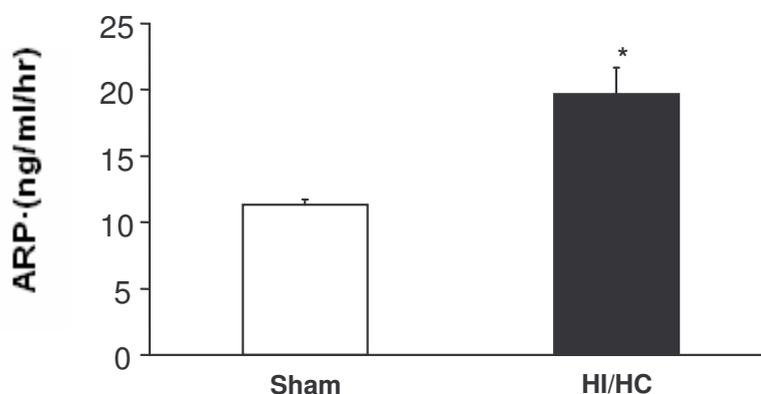


Figura 16. Dados agrupados apresentando a ARP em ratos submetidos à exposição Sham ou E-HI após 14 dias de tratamento. * $P < 0.05$ para E-HI vs sham (Teste *t* de Student).

4.2.1.3 EXPOSIÇÃO À E-HI E INFUSÃO CRÔNICA DE DROGAS NO PVN:

A Figura 17 mostra que a exposição à ciclos de E-HI em animais recebendo infusão crônica de veículo salina ($n=5$) no PVN, induziu um aumento gradual e significativo da PAM (E-HI salina: $+12 \pm 2$ mmHg vs Sham salina: -2 ± 1 mmHg; $P < 0.01$), quando comparado a animais sham também infundidos com salina ($n=4$). Este aumento de PAM não foi acompanhado por alterações de FC (Figura 17). A infusão crônica de muscimol ($n=5$) no PVN de animais expostos à E-HI bloqueou completamente o aumento de PAM observado nos animais controle (infundidos com salina) submetidos ao mesmo protocolo (E-HI MUS: -9 ± 4 mmHg vs E-HI salina: 12 ± 2 mmHg; $P < 0.01$), sendo acompanhado, desta vez por uma redução significativa de FC (E-HI MUS: -32 ± 12 bpm vs E-HI salina: 5 ± 9 bpm; $P < 0.05$). A redução de FC nos animais infundidos com muscimol foi também significativa em relação aos animais Sham infundidos com salina (E-HI MUS: -43 ± 14 bpm vs Sham salina: 2 ± 3 bpm; $P < 0.05$). Os valores de PAM e FC de todos os grupos submetidos a E-HI estão apresentados na Tabela 05 do Anexo.

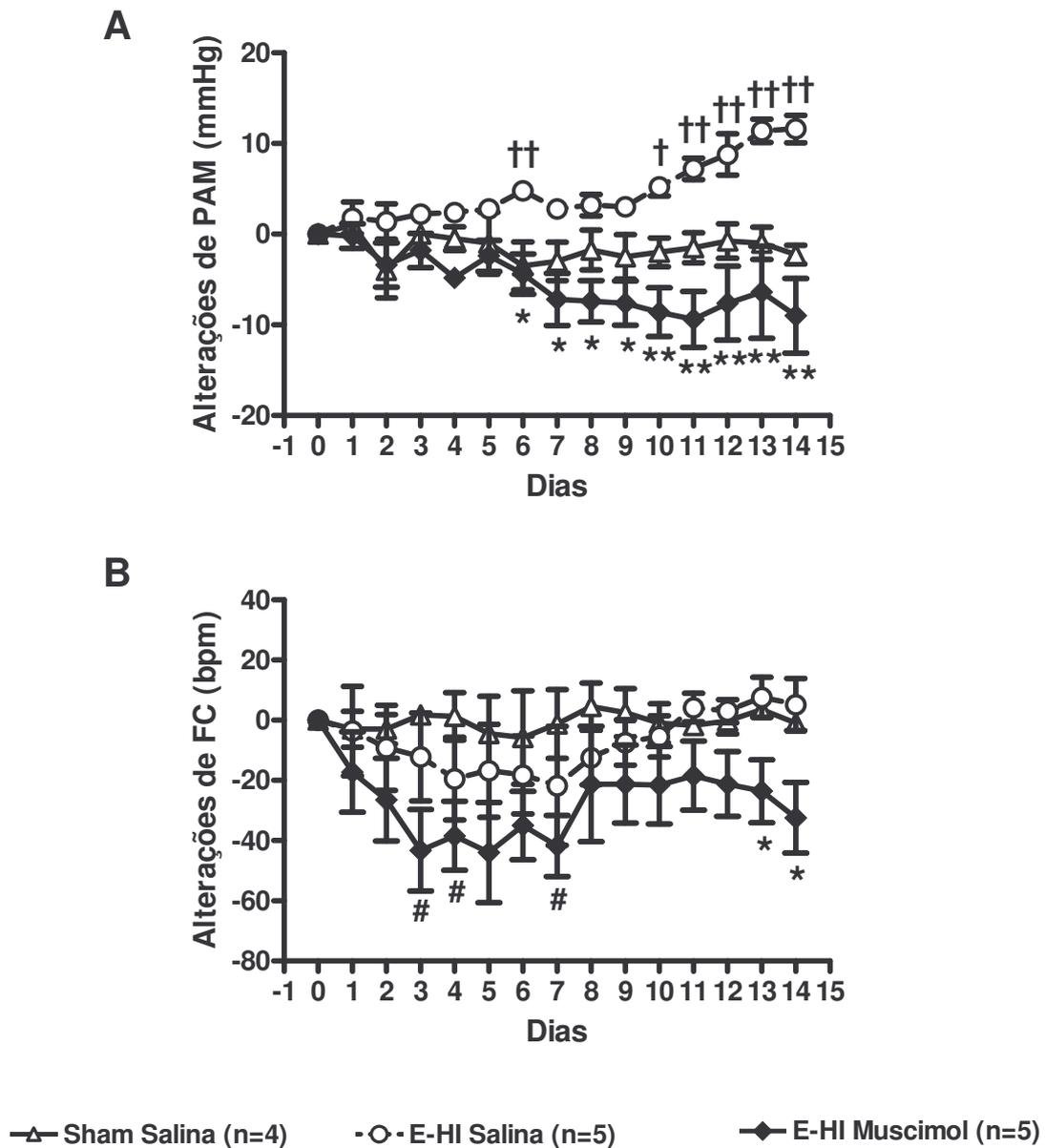


Figura 17. Alterações de PAM (A) e FC (B) durante exposição a ciclos de E-HI ou sham, e simultânea infusão crônica de veículo salina ($\approx 400\text{nL/h}$) ou muscimol (20pmol/h) no PVN. Valores referentes às médias coletadas diariamente (24h) comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores absolutos. † $P < 0.05$ e †† $P < 0.01$ para E-HI salina vs Sham salina; * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ para E-HI Mus vs E-HI salina; # $P < 0.05$ para E-HI Mus vs Sham salina (*Two-way ANOVA* com post-test de Bonferroni)

A Figura 18 apresenta as alterações de PAM e FC em animais expostos a ciclos de E-HI ou sham, recebendo infusão crônica de A-779 no PVN. A administração de A-779 em animais E-IH (n=6) bloqueou completamente o aumento de PA induzido pela exposição à E-HI no grupo controle infundido com salina no PVN (E-HI A-779: -4 ± 1 % vs E-HI salina: 11 ± 2 %; $P<0.05$, dia 14). Os animais tratados com A-779 submetidos à exposição sham (n=6) não apresentaram alterações significantes de PAM em relação ao grupo E-HI A-779, sendo diferentes somente comparado ao grupo E-HI salina (Sham A-779: -5 ± 2 %; $P<0.01$, dia 14). Não houveram diferenças em relação à FC entre os grupos.

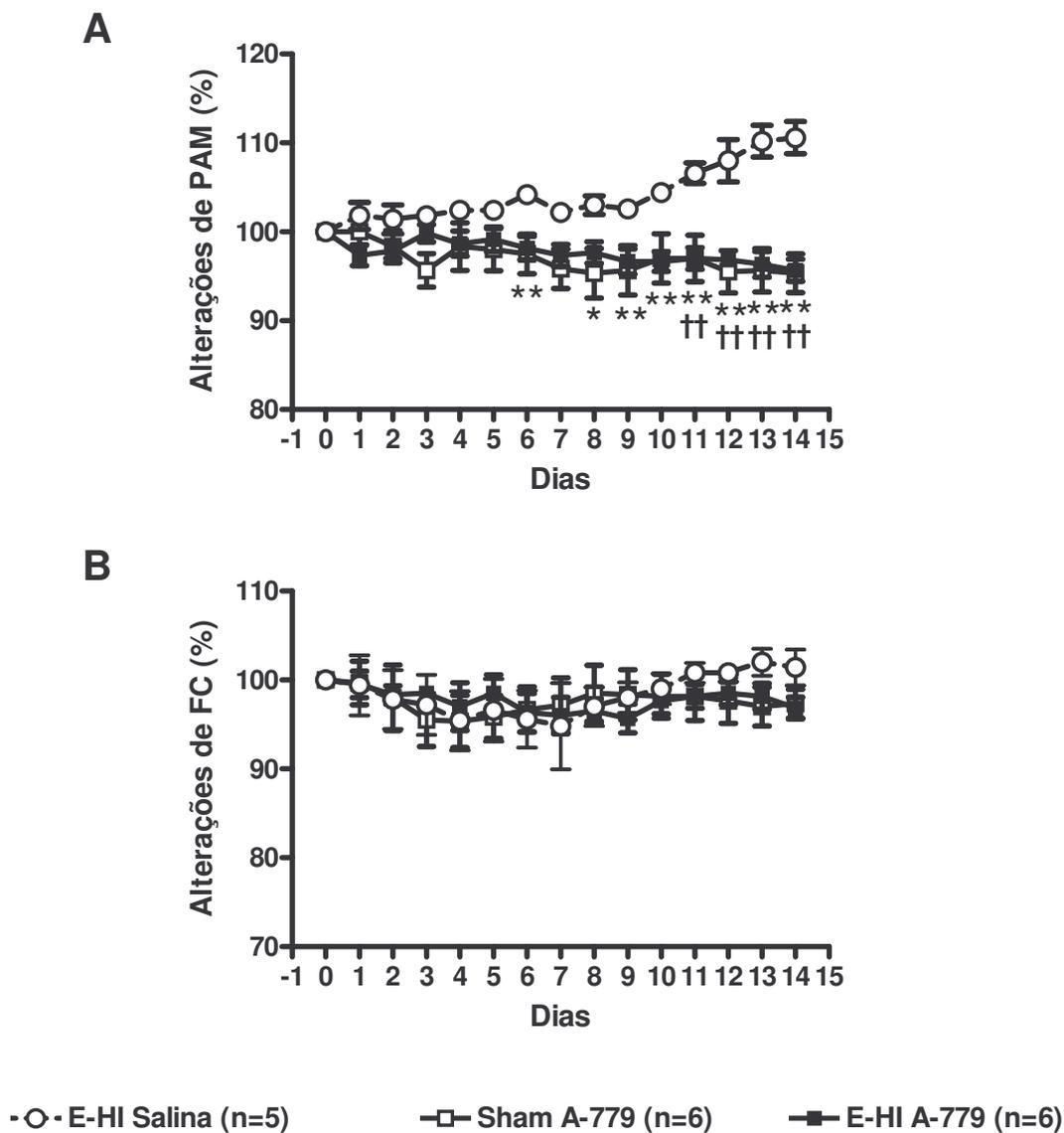


Figura 18. Alterações de PAM (A) e FC (B) durante exposição a ciclos de E-HI ou sham e simultânea infusão crônica de veículo salina ($\approx 400\text{nl/h}$) ou A-779 (2nmol/h) no PVN. Valores referentes às médias coletadas diariamente (24h) comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores percentuais. † $P < 0.05$ e †† $P < 0.01$ para Sham A-779 vs E-HI salina; * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ para E-HI A-779 vs E-HI salina (*Two-way ANOVA* com post-test Bonferroni).

Na Figura 19 podemos observar os efeitos do bloqueio crônico dos receptores AT_1 no PVN, através da infusão de Losartan ou ZD7155, durante a exposição à E-HI ou sham. Em animais E-HI, tanto a infusão de Losartan (n=5) quanto de ZD7155 (n=6) preveniu e praticamente reverteu o aumento de PA observado no grupo infundido com salina (E-HI Los: $-8\pm 3\%$, E-HI ZD7155: $-10\pm 3\%$ vs E-HI salina: $11\pm 2\%$; $P<0.01$, dia 14). Estas alterações de PAM foram em magnitude similar àsquelas observadas nos animais sham infundidos com Losartan (n=4) e ZD7155 (n=5) (Sham Los: $-8\pm 2\%$ e Sham ZD7155: $-6\pm 1\%$). Em relação a FC não houveram diferenças estatísticas entre os grupos, exceto discreto aumento no grupo E-HI ZD7155 comparado ao seu controle (sham) (E-HI Los: $7\pm 3\%$ vs Sham Los: $-4\pm 2\%$, $P<0.05$).

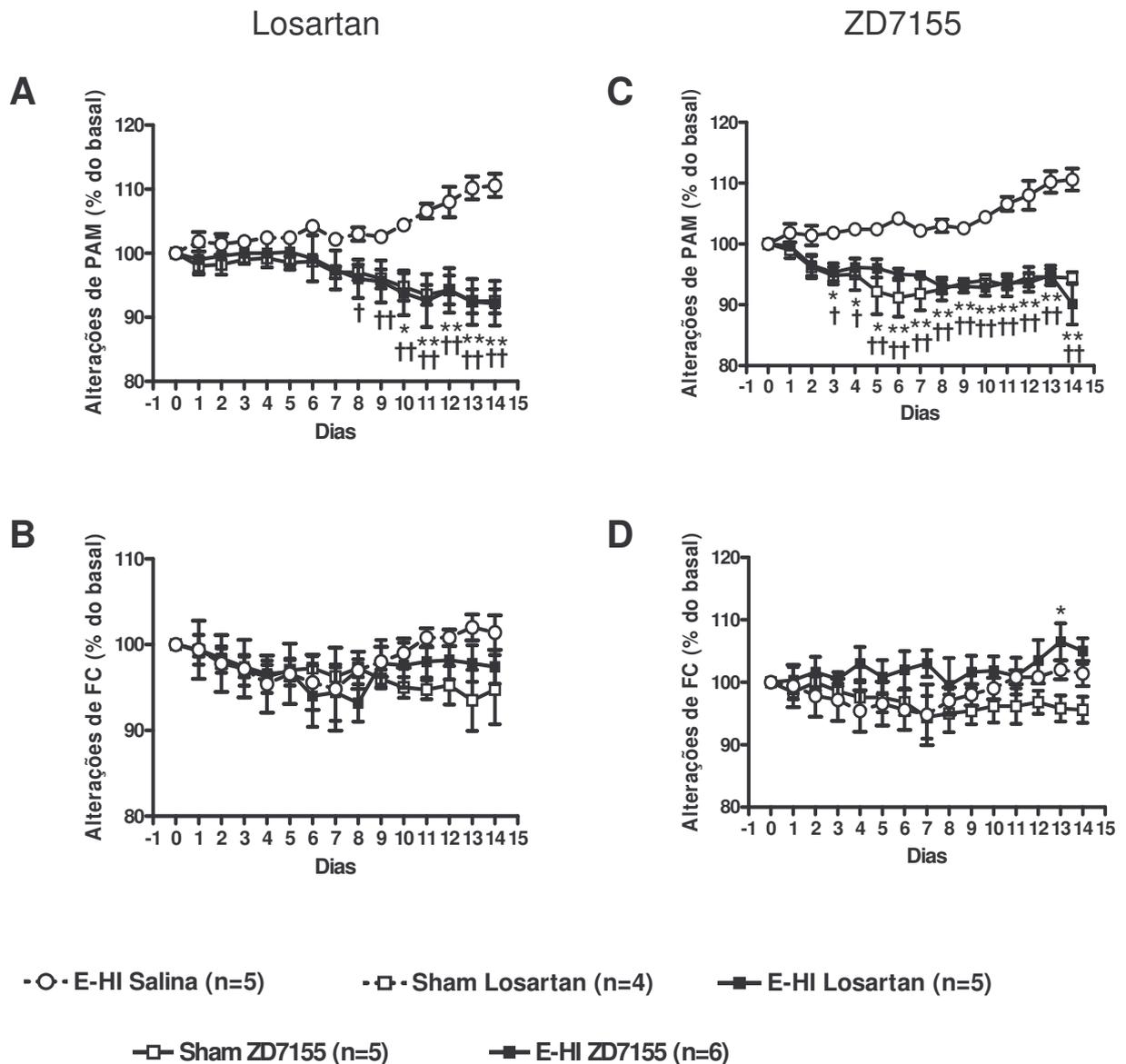


Figura 19. Alterações de PAM (A, C) e FC (B, D) durante exposição a ciclos de E-HI ou sham e simultânea infusão crônica de veículo salina ($\approx 400\text{nl/h}$), Losartan (2nmol/h) ou ZD7155 ($0,2\text{nmol/h}$) no PVN. Valores referentes às médias coletadas diariamente (24h) comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores percentuais. † $P < 0.05$ e †† $P < 0.01$ para Sham vs E-HI salina; * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ para E-HI Losartan ou ZD7155 vs E-HI salina (*Two-Way ANOVA* com post-test de Bonferroni).

A Figura 20 apresenta os efeitos sobre a PAM e FC induzidos pela exposição à E-HI ou sham e bloqueio simultâneo dos receptores AT₂ no PVN. A infusão de PD123319 em ratos submetidos à E-HI preveniu completamente o aumento de PA produzido por E-HI no grupo recebendo infusão de salina no PVN (E-HI PD123319: $-3\pm 3\%$ vs E-HI salina: $11\pm 2\%$, $P<0.01$). As alterações de PA observadas nos animais sham recebendo infusão de PD123319 foram em magnitude similar às aquelas obtidas no grupo E-HI submetido ao mesmo tratamento (Sham PD123319: $-4\pm 1\%$).

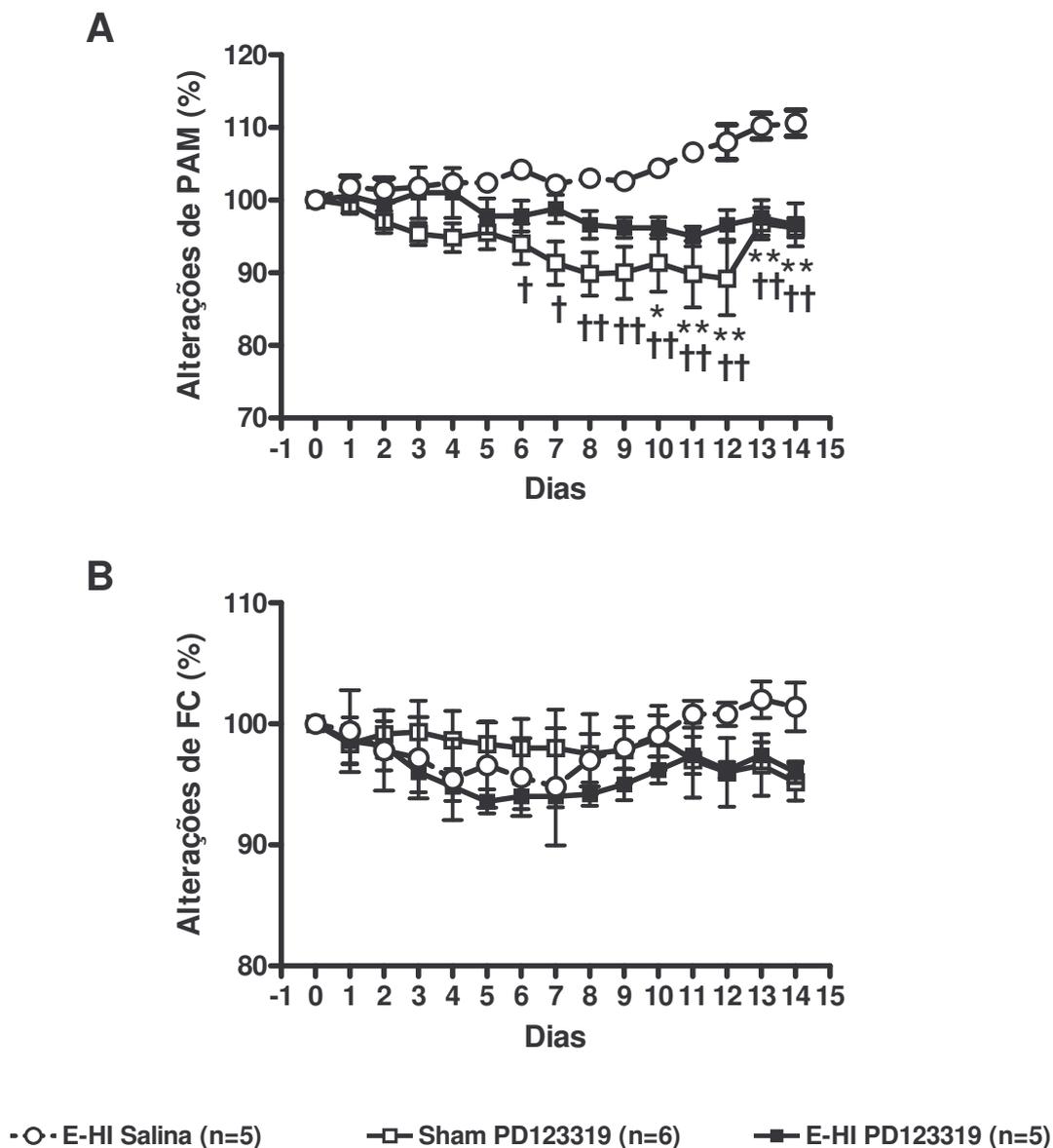


Figura 20. Alterações de PAM (A) e FC (B) durante exposição a ciclos de E-HI ou sham e simultânea infusão crônica de veículo salina ($\approx 400\text{nl/h}$) ou PD123319 (2nmol/h) no PVN. Valores referentes às médias coletadas diariamente (24h) comparadas aos valores basais. † $P < 0.05$ e †† $P < 0.01$ para Sham PD123319 vs E-HI salina; * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ para E-HI PD123319 vs E-HI salina (*Two-way ANOVA* com post-test Bonferroni).

Para facilitar a comparação entre os grupos submetidos a exposição Sham com o bloqueio crônico dos receptores angiotensinérgicos no PVN, apresentamos os valores de PAM e FC para todos os grupos sham somente no dia 14 de tratamento.

A Figura 21 mostra as alterações de PAM e FC em animais Sham à E-HI recebendo infusão crônica de veículo salina (n=4), A-779 (n=6), Losartan (n=4), ZD7155 (n=5) e PD123319 (n=6) no PVN. O bloqueio da Ang II através dos receptores AT₁ induziu uma redução nos níveis basais de PAM no dia 14 de tratamento, tanto para Losartan quanto para ZD7155, comparado aos animais infundidos com salina no PVN (Sham Los: -9 ± 2 mmHg, Sham ZD7155: -6 ± 1 mmHg vs Sham salina: -2 ± 1 mmHg; $P<0.05$), sem alterações de FC. O bloqueio da Ang II através dos receptores AT₂ induziu uma redução discreta, mas significativa de FC (Sham PD123319: -21 ± 7 bpm vs Sham salina: -1 ± 1 bpm; $P<0.05$) no dia 14 de tratamento, sem alterações de PAM.

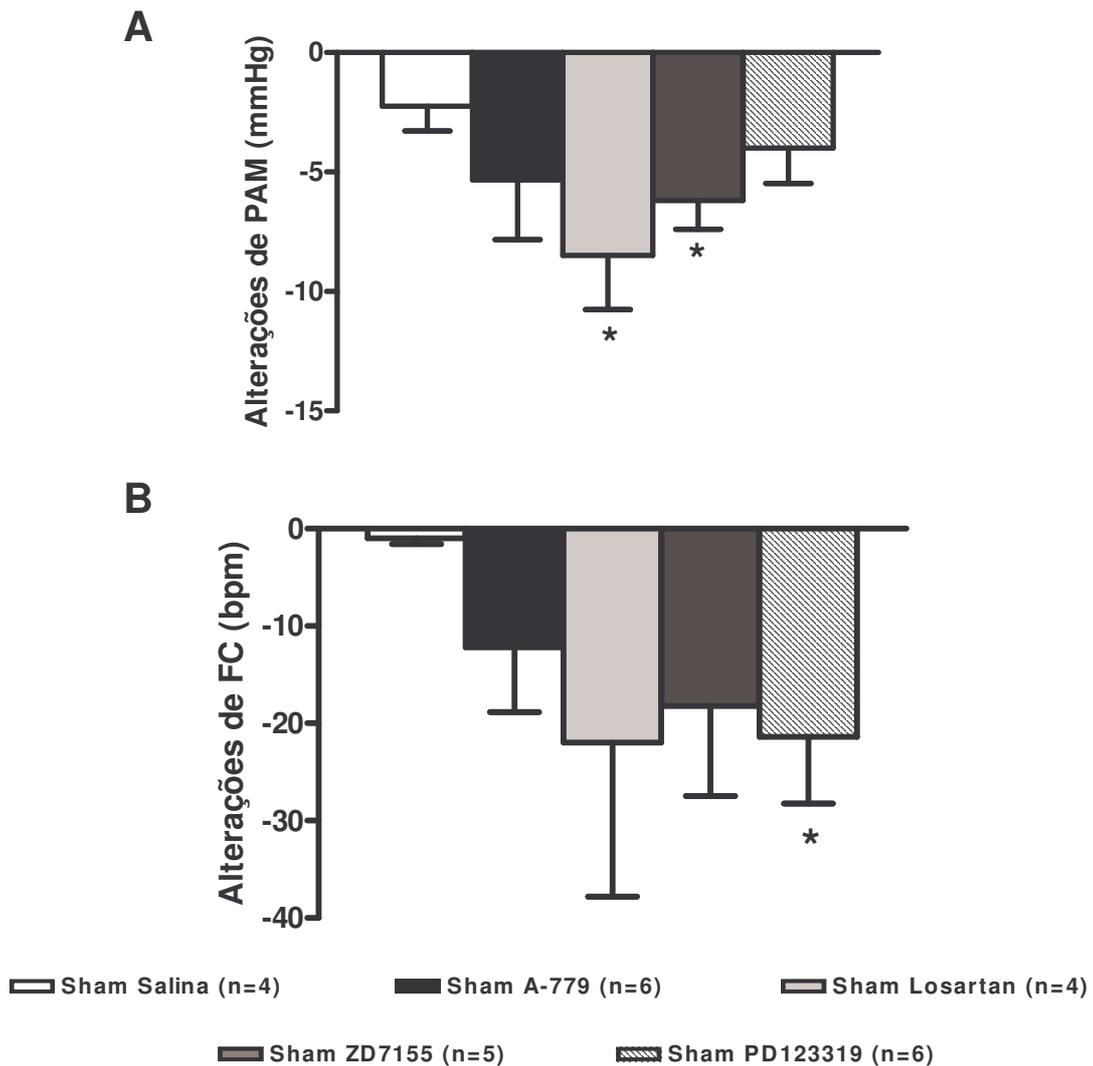


Figura 21. Alterações de PAM (A) e FC (B) durante exposição a ciclos sham (normoxia) e simultânea infusão crônica de A-779 (2nmol/h), Losartan (2nmol/h), ZD7155 (0.2nmol/h), PD123319 (2nmol/h) e veículo salina (≈ 400 nL/h) no PVN. Valores referentes às médias coletadas durante 24hs do dia 14, comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores absolutos. * $P < 0.05$ comparado a Sham salina (Teste *t* de Student).

Para facilitar a comparação entre os grupos submetidos a exposição E-HI com o bloqueio crônico dos receptores angiotensinérgicos no PVN, apresentamos os valores de PAM e FC para todos os grupos E-HI somente no dia 14.

A Figura 22 apresenta alterações de PAM e FC em animais submetidos à exposição E-HI e simultânea infusão crônica de salina (n=5), A-779 (n=6), Losartan (n=5), ZD7155 (n=6) e PD123319 (n=5) no PVN. Como descrito anteriormente, a exposição a ciclos E-HI, neste estudo, induziu um aumento gradual de PAM que atingiu seus valores mais elevados no dia 14, não sendo acompanhado por alterações de FC. A infusão crônica de todos os antagonistas angiotensinérgicos utilizados, bloqueou completamente o aumento de PAM observado no grupo controle (salina), ao término de 14 dias de tratamento (E-HI A-779: -5 ± 1 mmHg, E-HI Los: -9 ± 4 mmHg, E-HI ZD7155: -11 ± 4 mmHg e E-HI PD123319: -4 ± 3 mmHg vs E-HI salina: 12 ± 2 mmHg; $P < 0.05$). Embora nenhum dos grupos de animais tenha apresentado alterações nos níveis basais de FC comparado ao grupo controle, a infusão de ZD7155 induziu um aumento de FC significativo quando comparado ao tratamento com os outros antagonistas administrados (E-HI ZD7155: 21 ± 9 bpm vs E-HI A-779: -14 ± 6 bpm, E-HI Los: -12 ± 8 bpm, E-HI PD123319: -18 ± 4 bpm; $P < 0.05$).

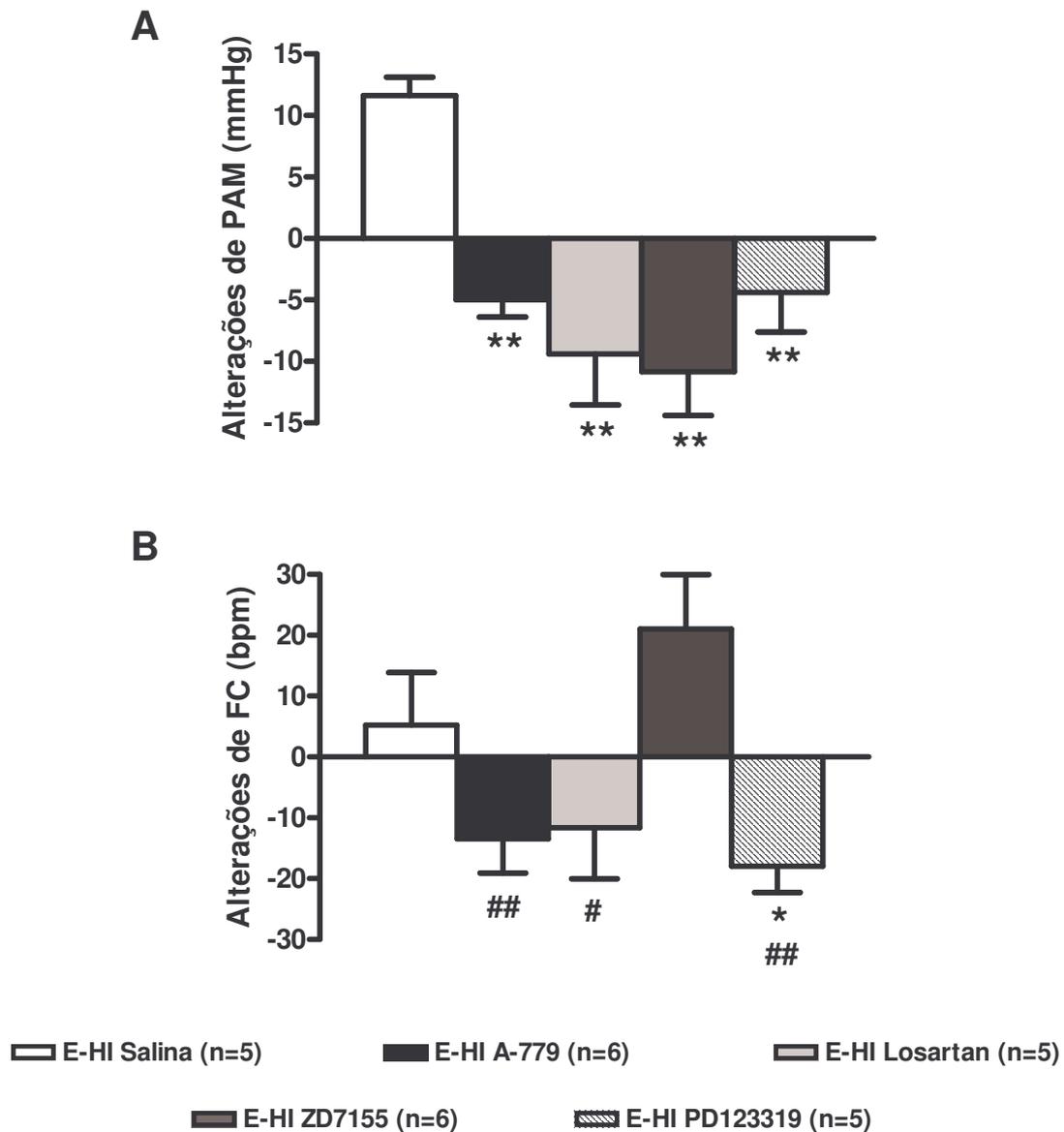


Figura 22. Alterações de PAM (A) e FC (B) durante exposição a ciclos E-HI e simultânea infusão crônica de A-779 (2nmol/h), Losartan (2nmol/h), ZD7155 (0.2nmol/h), PD123319 (2nmol/h) e veículo salina (≈400nl/h) no PVN. Valores referentes às médias coletadas durante 24hs no dia 14 comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores absolutos. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ comparado a E-HI salina; # $P < 0.05$ comparado a ZD7155 (Teste *t* de Student).

4.2.2 EFEITOS DO BLOQUEIO ENDÓGENO DAS ANGIOTENSINAS NO PVN SOBRE A MANUTENÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E DA PRESSÃO ARTERIAL DURANTE HIPEROSMOLARIDADE PLASMÁTICA:

Inicialmente 3 grupos de animais foram infundidos com 3 diferentes concentrações de solução salina (0.15M, 1M e 2.5M) (Figuras 23 e 24). A osmolaridade plasmática foi medida em todos os grupos experimentais para confirmação de que a metodologia utilizada estava sendo efetiva em induzir alterações nos níveis plasmáticos de NaCl. A Figura 23 apresenta os valores de osmolaridade plasmática antes e após a infusão de salina hipertônica (SHT) ou isotônica (SIT) e após o término dos 30 minutos seguintes à realização das microinjeções no PVN. A infusão de SIT, como esperado, não alterou os níveis plasmáticos de NaCl. A infusão de SHT induziu um aumento significativo e proporcional na osmolaridade plasmática (1M SHT: 411 ± 16 mOsm / Kg, 2.5M SHT: 554 ± 23 mOsm / Kg vs controle 0.15M SIT: 324 ± 9 mOsm / Kg; $P < 0.01$).

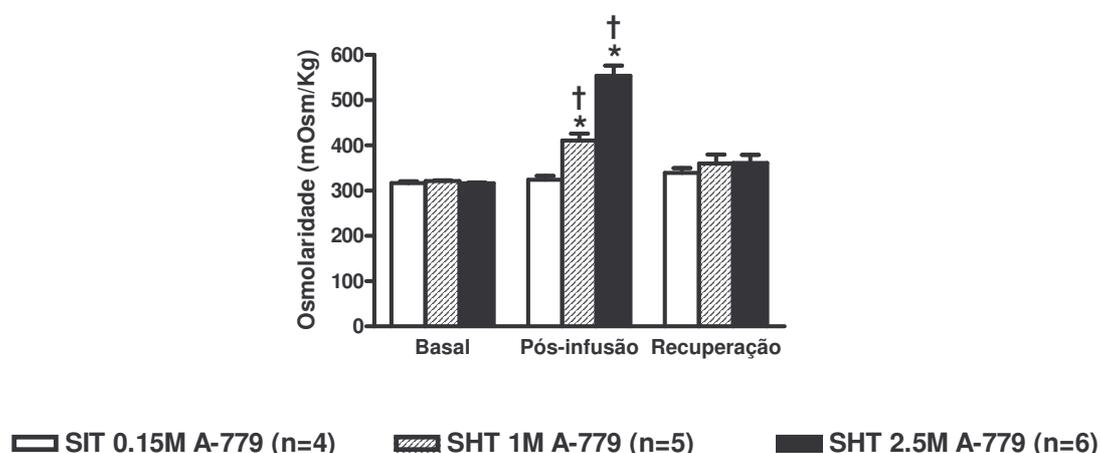


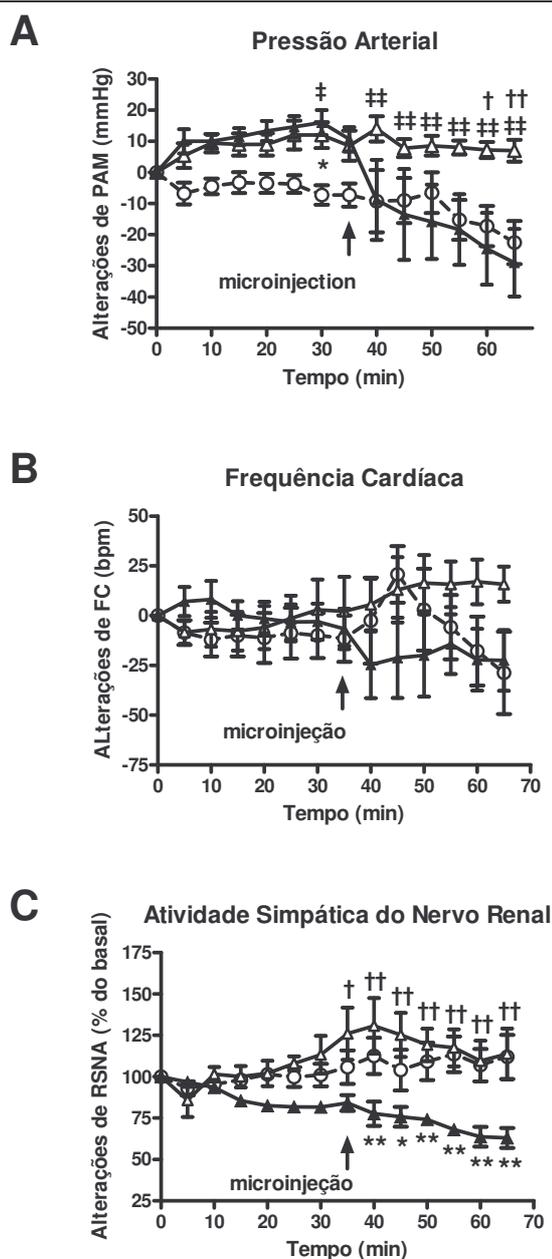
Figura 23. Dados agrupados apresentando as alterações de osmolaridade plasmática induzidas pela infusão de SIT (0.15M) e SHT (1M e 2.5M) em ratos submetidos à microinjeção de A-779 no PVN. * $P < 0.01$ para pós-infusão de SHT vs pós-infusão de SIT e † $P < 0.01$ para pós-infusão vs basal de ambos os grupos (One-way ANOVA com post-test de Newman-Keuls).

Na Figura 24, podemos observar que a infusão de SIT não induziu quaisquer alterações de PAM, FC e atividade simpática renal. A infusão de SHT nas duas concentrações administradas induziu um aumento nos níveis basais de PAM (SHT 1M: 12 ± 4 mmHg, SHT 2.5M: 16 ± 4 mmHg vs SIT 0.15M: -7 ± 3 mmHg; $P < 0.05$) não sendo acompanhado por alterações de FC. Em relação à RSNA, não houveram alterações nos níveis basais desta variável nos grupos infundidos com SIT e SHT 1M. O grupo infundido com SHT 2.5M apresentou uma redução significativa de RSNA comparada aos demais grupos (SHT 2.5M: -18 ± 3 % vs SHT 1M: 1 ± 7 % e SIT 0.15M: 13 ± 11 %).

Ao se avaliar os efeitos induzidos pela microinjeção do A-779 (1nmol), pôde-se observar que o grupo de animais infundidos com SIT, apresentou uma redução de PAM comparada aos valores anteriores às microinjeções no PVN. Efeito diferente foi observado no grupo infundido com SHT 1M, quando a microinjeção de A-779 no PVN não resultou em quaisquer alterações nos níveis basais de PAM (SHT 1M: 7 ± 4 mmHg vs SIT 0.15M: -23 ± 7 mmHg; $P < 0.01$). Os animais infundidos com SHT 2.5M apresentaram uma redução acentuada de PAM (SHT 2.5M: -40 ± 9 mmHg vs SHT 1M: -2 ± 4 mmHg e SIT 0.15M: -10 ± 8 mmHg; $P < 0.01$). Não houveram diferenças significativas de FC entre os grupos.

Ao se avaliar os efeitos da microinjeção de A-779 sobre a RSNA, pôde-se observar que nos animais SHT 2.5M apresentaram uma redução acentuada desta variável (SHT 2.5M: -37 ± 6 % vs SIT 0.15M: 14 ± 15 %; $P < 0.01$). Embora a microinjeção de A-779 nos animais infundidos com SHT 1M tenha induzido uma resposta similar de atividade simpática em relação ao grupo controle (SIT), esta foi significativamente diferente do grupo SHT 2.5M (SHT 1M: 12 ± 13 % vs SHT 2.5M: -37 ± 6 %; $P < 0.01$).

Os valores basais de PAM e FC de todos os grupos de animais submetidos à infusão de salina hipertônica (2.5M e 1M) ou isotônica (0.15M) são apresentados na Tabela 06 do Anexo.



-○- SIT A779 (1nmol); n=4 -△- SHT 1M A779 (1nmol); n=5 -▲- SHT 2.5M A779 (1nmol); n=6

Figura 24. Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta à infusão de SIT (0.15M) e SHT (1M e 2.5M) seguidas por microinjeções bilaterais de A-779 (1nmol/100nl) no PVN. Valores referentes às médias coletadas a cada 5 minutos após o início da infusão de SHT até o término do experimento, comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores absolutos (A e B) e valores percentuais (C). * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ para SHT 2.5M vs SIT 0.15M; † $P < 0.05$ e †† $P < 0.01$ para SHT 1M vs SHT 2.5M; ‡ $P < 0.05$ e ‡‡ $P < 0.01$ para SHT 1M vs SIT 0.15M (*Two-way ANOVA* com post-test de Bonferroni).

Os efeitos do bloqueio endógeno da Ang-(1-7) no PVN foram comparados aos efeitos induzidos pelo bloqueio dos receptores AT₁ da Ang II, após a infusão de SHT 2.5M. Esta concentração foi escolhida por ter causado efeitos mais pronunciados na primeira fase de experimentos. Salina estéril (NaCl 0.9%) foi microinjetada no PVN de um grupo separado de animais, utilizado como controle. A osmolaridade plasmática dos animais foi aumentada após a infusão de SHT, não havendo diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 25).

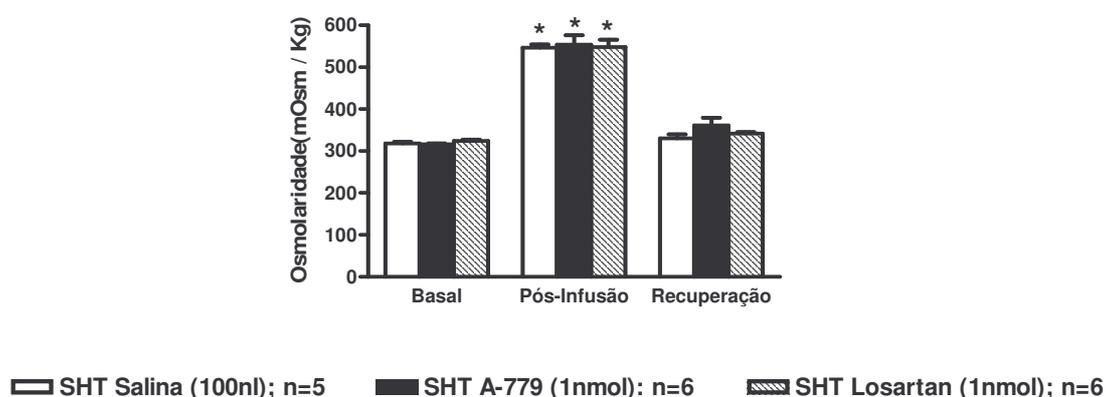
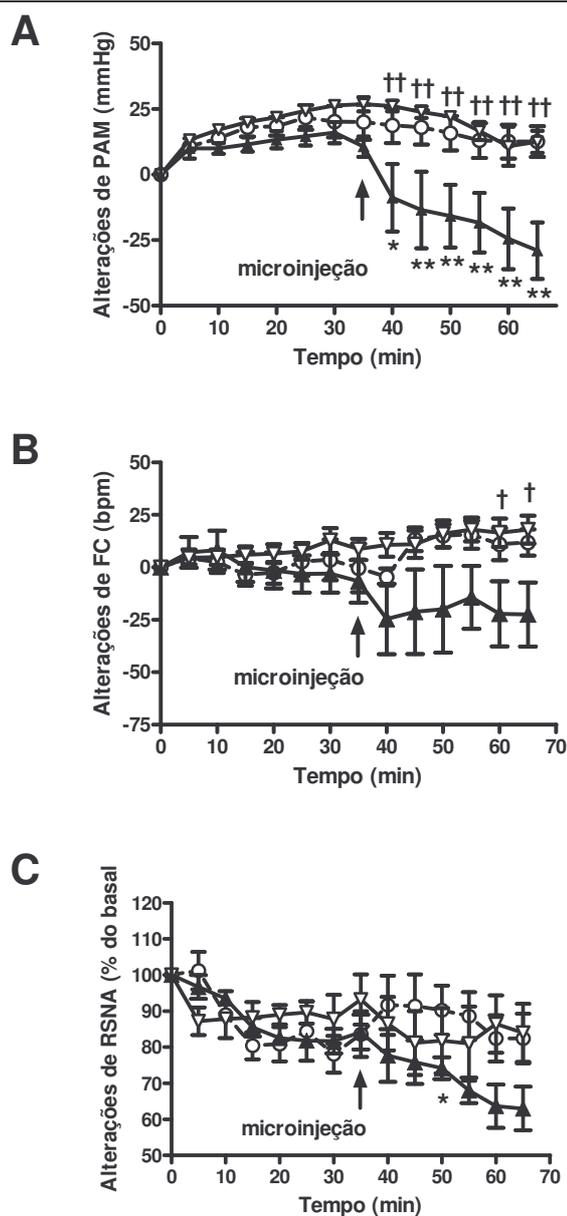


Figura 25. Dados agrupados mostrando alterações de osmolaridade plasmática induzidas pela infusão de SHT (2.5M) em ratos submetidos à microinjeção de A-779 (1nmol/100nl), Losartan (1nmol/100nl) e veículo (100nl) no PVN. * $P < 0.05$ para Pós-infusão vs basal (*One-way* ANOVA com post-test de Newma-Keuls).

A Figura 26 mostra que a infusão de SHT induziu um aumento de PAM acompanhado de redução de RSNA em todos os grupos avaliados. A microinjeção de A-779, como descrita acima, induziu uma redução acentuada de PAM (SHT A-779: -40 ± 9 mmHg vs SHT veículo: -7 ± 3 mmHg; $P < 0.01$) e de RSNA (SHT A-779: -26 ± 6 % vs SHT veículo -2 ± 3 %; $P < 0.05$). Embora a microinjeção de Losartan não tenha causado efeitos diferentes do grupo controle, estes foram significativamente diferentes do grupo microinjetado com A-779 (SHT Los: -16 ± 7 mmHg vs SHT A-779: -40 ± 9 mmHg; $P < 0.01$), FC (SHT Los: 18 ± 7 bpm vs SHT A-779: -23 ± 15 bpm; $P < 0.05$) e RSNA (SHT Los: -12 ± 5 % vs SHT A-779: -26 ± 6 %).



-○- SHT Salina (100nl); n = 5 -▲- SHT A-779 (1nmol); n = 6 -▽- SHT Losartan (1nmol); n = 6

Figura 26. Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta à infusão de SHT (2.5M NaCl) e à microinjeções bilaterais de A-779 (1nmol/100nl), Losartan (1nmol/100nl) e veículo (100nl) no PVN. Valores referentes às médias coletadas a cada 5 minutos após o início da infusão de salina até o término do experimento, comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores absolutos (A e B) e valores percentuais (C). * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ para SHT 2.5M A-779 vs SHT 2.5M veículo; † $P < 0.05$ e †† $P < 0.01$ para SHT 2.5M Losartan vs SHT 2.5M A-779 (Two-way ANOVA com post-test Bonferroni).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA CEREBRAL NA MANUTENÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E DA PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS TRANSGÊNICOS ASRAOGEN.

No sentido de confirmar a participação do SRA cerebral e especificamente das angiotensinas agindo sobre os neurônios do PVN para a modulação do tônus simpático e da PA, utilizamos o modelo TGR(ASrAOGEN) (TGR) que apresenta baixos níveis de angiotensinogênio (Aogen) cerebral (Schinke e cols., 1999). Foi realizada a inibição neuronal no PVN, através de microinjeções unilaterais e bilaterais de muscimol. A Tabela 01 apresenta os valores basais de PAM e FC dos animais submetidos à este protocolo. Os valores de PAM dos TGR (n=6) foram significativamente menores em relação aos ratos SD (n=5 para muscimol e salina).

Tabela 01. Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes das microinjeções de muscimol no PVN.

Grupo Experimental	n	PAM (mmHg)	FC (bpm)
SD Salina (100 nl)	5	113 ± 2	312 ± 9
SD Mus (1 nmol / 100 nl)	5	101 ± 3	299 ± 3
TGR Mus (1 nmol / 100 nl)	6	89 ± 4*	290 ± 20

Valores expressos como média ± EPM. * $P < 0.01$ para TGR vs SD (Teste *t* de Student).

A Figura 27 ilustra os efeitos sobre a RSNA basal induzidos pela microinjeção de salina ou muscimol no PVN de ratos SD e TGR. Como observado, a microinjeção de muscimol reduziu os valores de RSNA em ratos SD comparado ao grupo controle microinjetado com salina. O mesmo procedimento realizado nos TGR não reduziu a RSNA basal. Nos dados agrupados, (Figura 28), pode-se observar que a redução de RSNA ocorrida somente nos animais SD muscimol foi significativamente diferente dos demais grupos (SD Mus: 48 ± 5 vs TGR Mus: 64 ± 3 e SD Salina: 60 ± 7 , em spikes / segundo, $P < 0.05$).

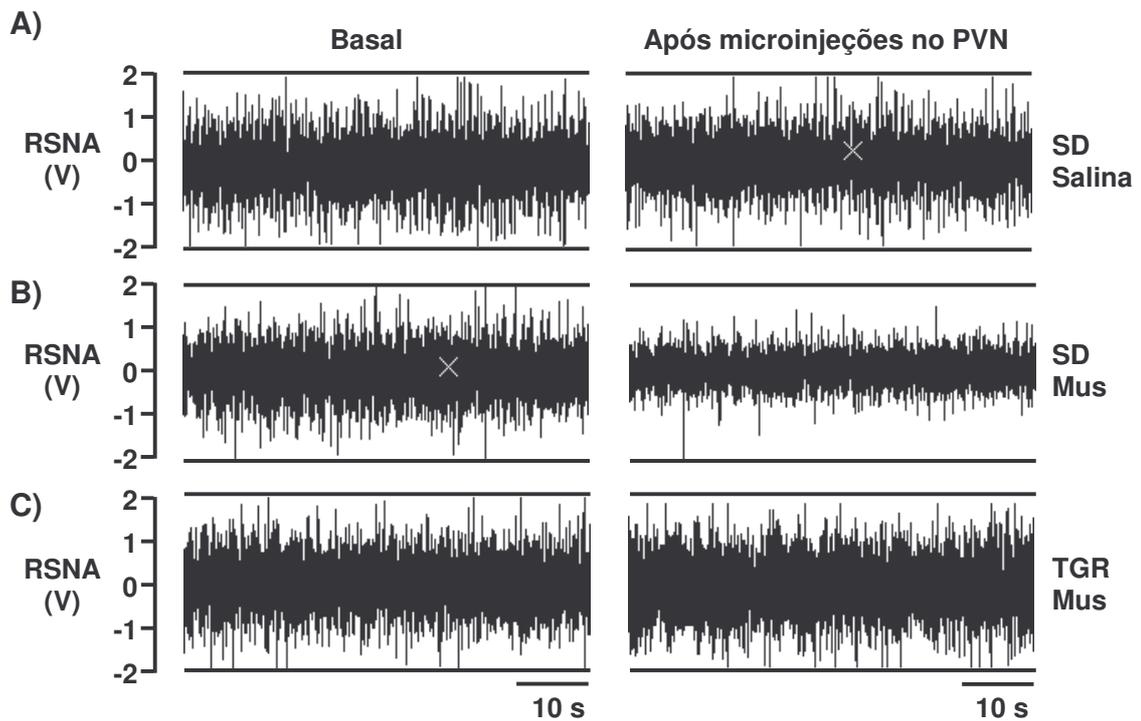


Figura 27. Registro de atividade simpática do nervo renal (RSNA, V) ilustrando o basal e a redução média máxima após microinjeções de salina (A; 100nl) ou muscimol (B, C; 1nmol/100nl) no PVN de ratos SD (A,B) e TGR (C).

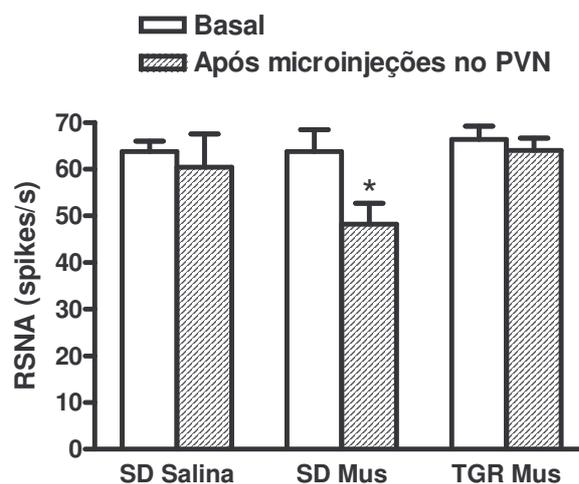


Figura 28. Atividade simpática do nervo renal basal e redução média máxima após microinjeções de salina (100nl) ou muscimol (1nmol/100nl) no PVN de ratos SD (n=5 para salina e muscimol) e TGR (muscimol, n=6). * $P < 0.05$ para SD após microinjeção de muscimol vs basal (Teste *t* de Student).

A Figura 29 ilustra o efeito da microinjeção unilateral e bilateral de muscimol (1nmol / 100nl) no PVN de ratos SD (A) e TGR (B). Conforme pôde ser observado neste experimento, a microinjeção de muscimol nos ratos SD induziu uma redução acentuada de PA, FC e RSNA, evidenciada desde a microinjeção unilateral e intensificada após as injeções bilaterais no PVN. Ao se realizar o mesmo procedimento nos TGR, pôde-se observar que microinjeções de muscimol no PVN praticamente não induzem quaisquer alterações de PA, FC ou RSNA.

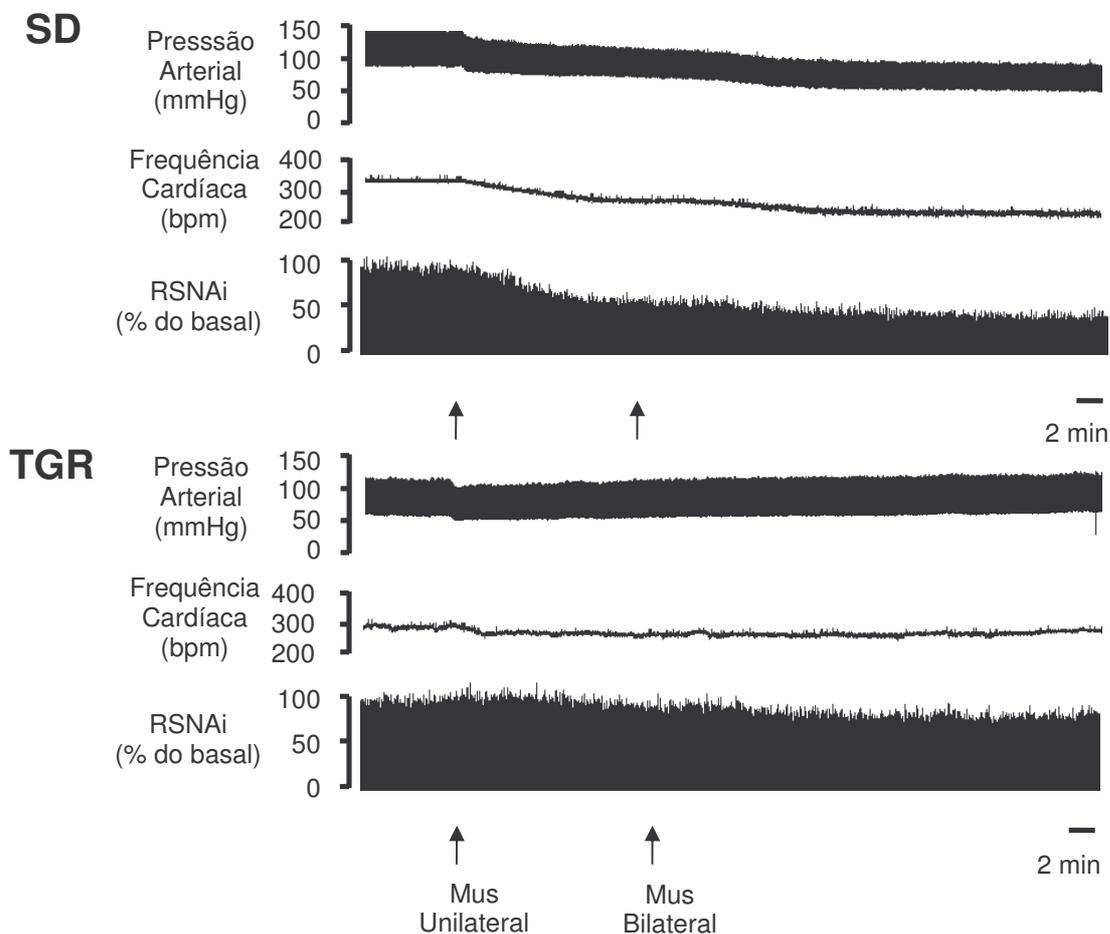


Figura 29. Registro ilustrando as respostas de PA, FC e RSNA produzidas pela microinjeção unilateral e bilateral de muscimol (1nmol/100nl) no PVN de ratos SD e TGR. As setas indicam o momento das microinjeções.

Como esperado, a microinjeção bilateral de muscimol no PVN de ratos SD induziu uma redução acentuada de PAM (SD Mus: -32 ± 3 mmHg vs SD salina: 1 ± 2 mmHg; $P < 0.01$), FC (SD Mus: -77 ± 9 bpm vs SD salina: -8 ± 2 bpm; $P < 0.01$) e RSNA (SD Mus: -29 ± 8 % vs SD salina: -8 ± 4 %; $P < 0.05$) quando comparado aos efeitos de microinjeções de veículo no PVN de um grupo separado de ratos SD. Interessantemente, ao se comparar os efeitos induzidos pelo muscimol no PVN de ratos SD, com a realização do mesmo procedimento em animais TGR, pôde-se observar uma redução atenuada de PAM (-17 ± 5 mmHg) e FC (-23 ± 6 bpm) sem alterações nos níveis basais de RSNA (-3 ± 10 %) (Figuras 29 e 30).

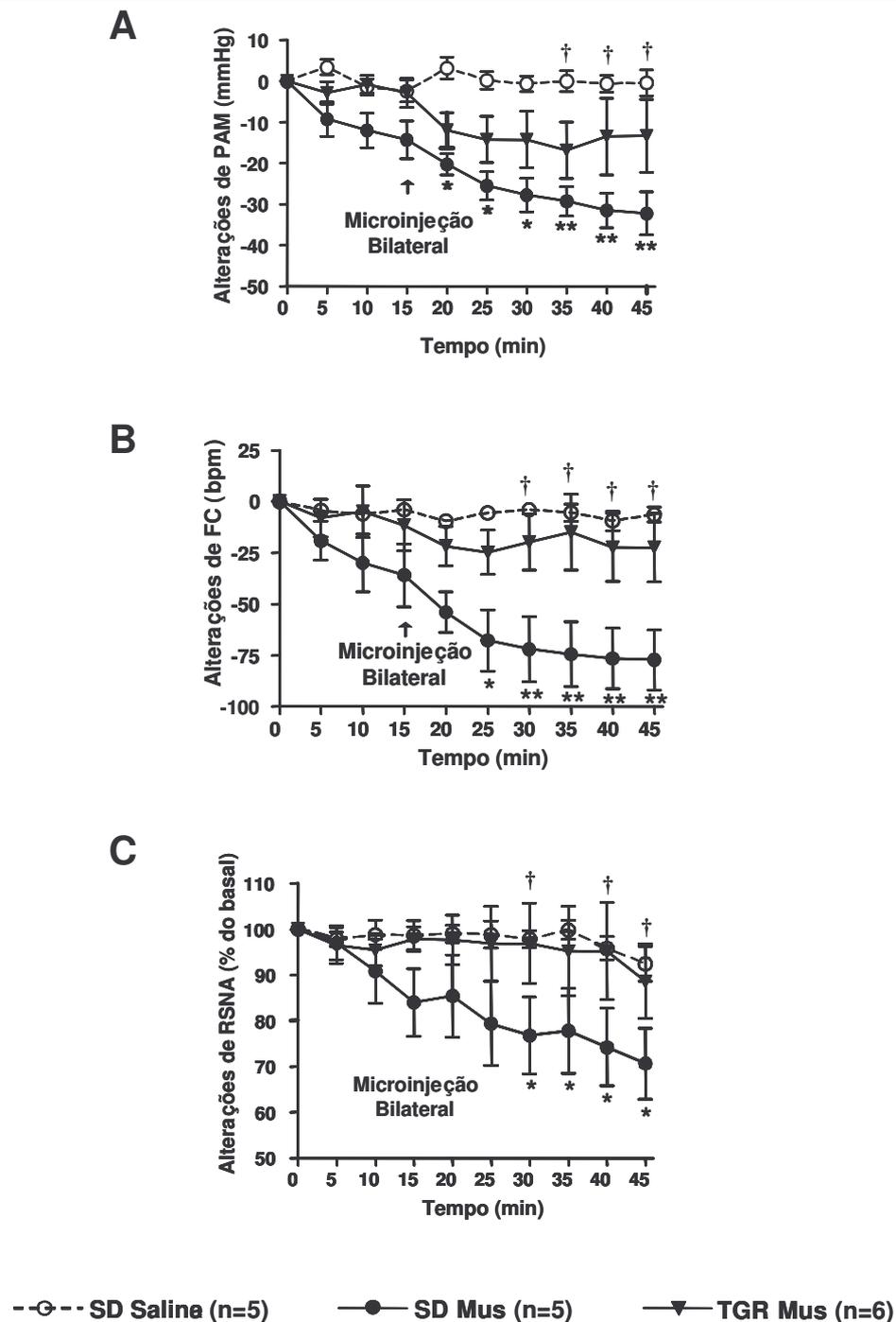


Figura 30. Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta às microinjeções unilaterais (0 min) e bilaterais (15 min) de muscimol (1nmol/100nl) ou salina no PVN de ratos SD e TGR. Valores referentes às médias coletadas a cada 5 minutos após as microinjeções, comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores absolutos (A e B) e valores percentuais (C). * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ para SD Mus vs SD salina; † $P < 0.05$ para TGR Mus vs SD Mus (*Two-way ANOVA* com post-test Bonferroni).

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA:

A análise histológica demonstrou que os efeitos sobre os níveis de atividade simpática e de PA, em resposta às microinjeções e infusões das drogas utilizadas nos diferentes grupos experimentais, foram evidentes para os experimentos em que os sítios de microinjeção marcados pelo corante Alcian blue encontravam-se no PVN ou imediatamente nas bordas deste núcleo. A extensão do PVN considerada para a confirmação histológica foi de -1,40 a -2,12 posterior ao Bregma, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1986). Não foi possível distinguir a localização precisa na região magnocelular ou parvicelular dos grupos de neurônios atingidos pelas microinjeções.

A Figura 31 exemplifica a distribuição dos sítios de microinjeção marcados pela injeção do corante dos grupos TGR e SD em que foram administrados muscimol e salina de acordo com os parâmetros considerados (A). Adicionalmente, cortes histológicos de exemplos do sítio atingidos pelas microinjeções confirmados de acordo com o diagrama de Paxinos & Watson (1986) são apresentados (B).

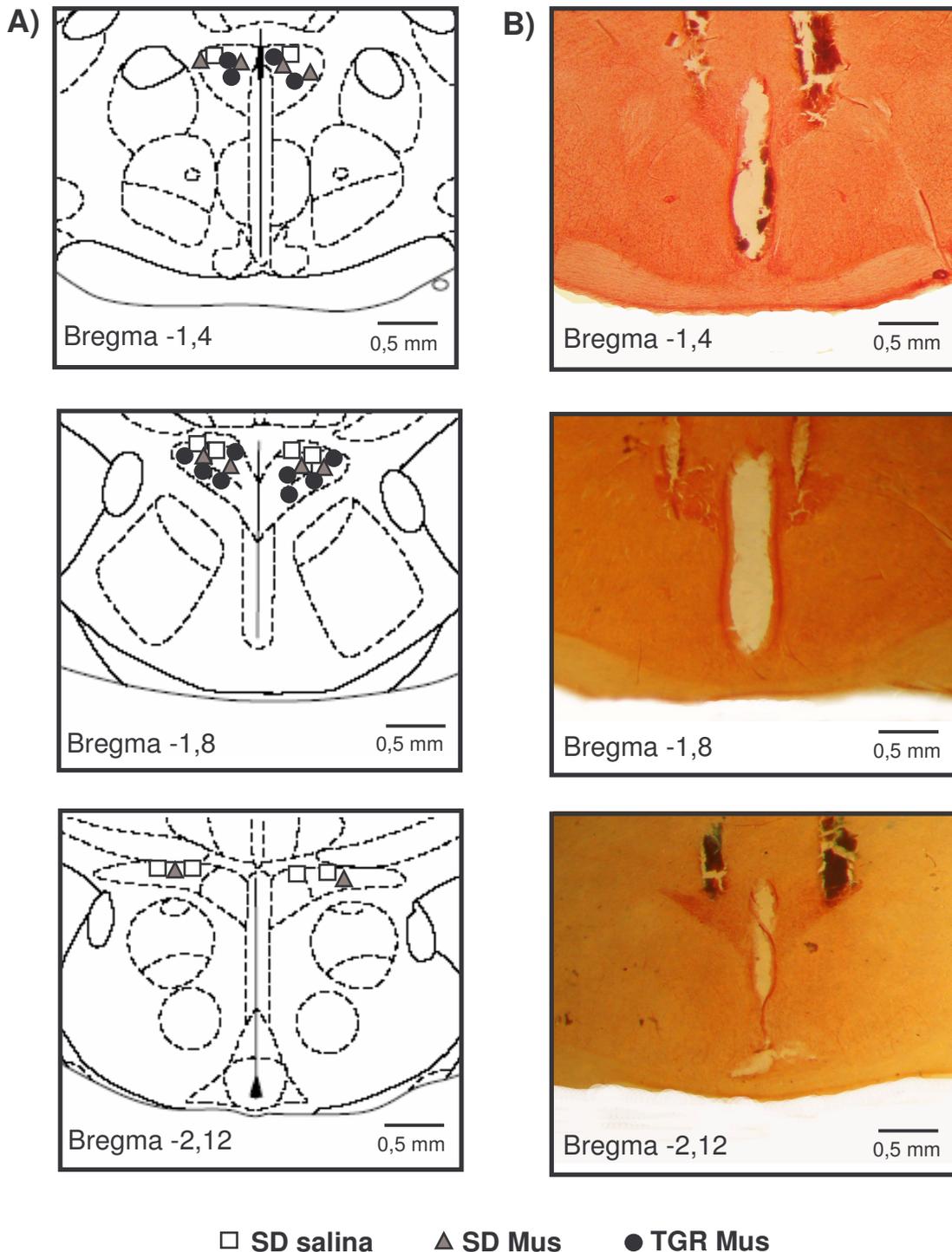
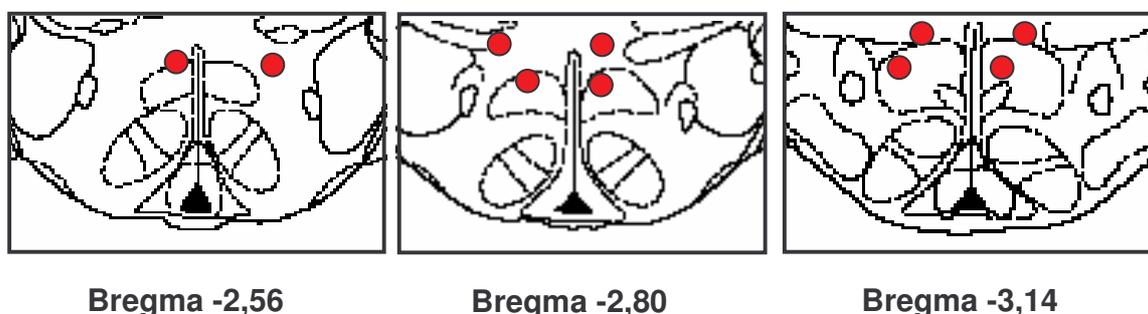


Figura 31. A) Diagrama esquemático frontal retirado do Atlas de Paxinos e Watson (1986) mostrando a localização do PVN. B) Fotografia de cortes frontais do encéfalo de ratos onde podem ser observadas as lesões causadas pelas microinjeções bilaterais no PVN.

As alterações produzidas sobre os níveis basais de PAM, FC e atividade simpática nos diferentes protocolos utilizados são resultado de uma interação das angiotensinas ou de seus antagonistas com os seus receptores localizados no PVN. Isto pode ser evidenciado pelo fato de que as microinjeções do A-779 em regiões adjacentes ao PVN, não produziram as mesmas respostas.

A Figura 32 ilustra a diferença de resposta obtida após a microinjeção do A-779 (0,1nmol/100nl) em regiões próximas ao PVN, especificamente na região intermediária entre este núcleo e o Hipotálamo dorsomedial (DMH), delimitada entre -2,56 a -3,14 posterior ao Bregma.



● A-779 (0,1nmol)

Figura 32. Representação esquemática dos sítios marcados pela microinjeção de corante Alcian Blue dos grupos em que foi administrado A-779 (0,1nmol) atingindo a região intermediária entre PVN e o DMH, na extensão de -2,56 a -3,14.

As microinjeções do A-779 (0,1nmol) na região intermediária posterior ao PVN, não promoveram alterações de PAM e de FC estatisticamente significantes em relação ao grupo controle, efeito semelhante àquele obtido pela microinjeção da dose equimolar do A-779 dentro do PVN. Entretanto, em relação à atividade simpática, pode-se observar que a microinjeção do A-779 (0,1nmol) fora do PVN promoveu um aumento desta variável estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle e ao grupo em que as microinjeções do A-779 atingiram o PVN (Figura 33).

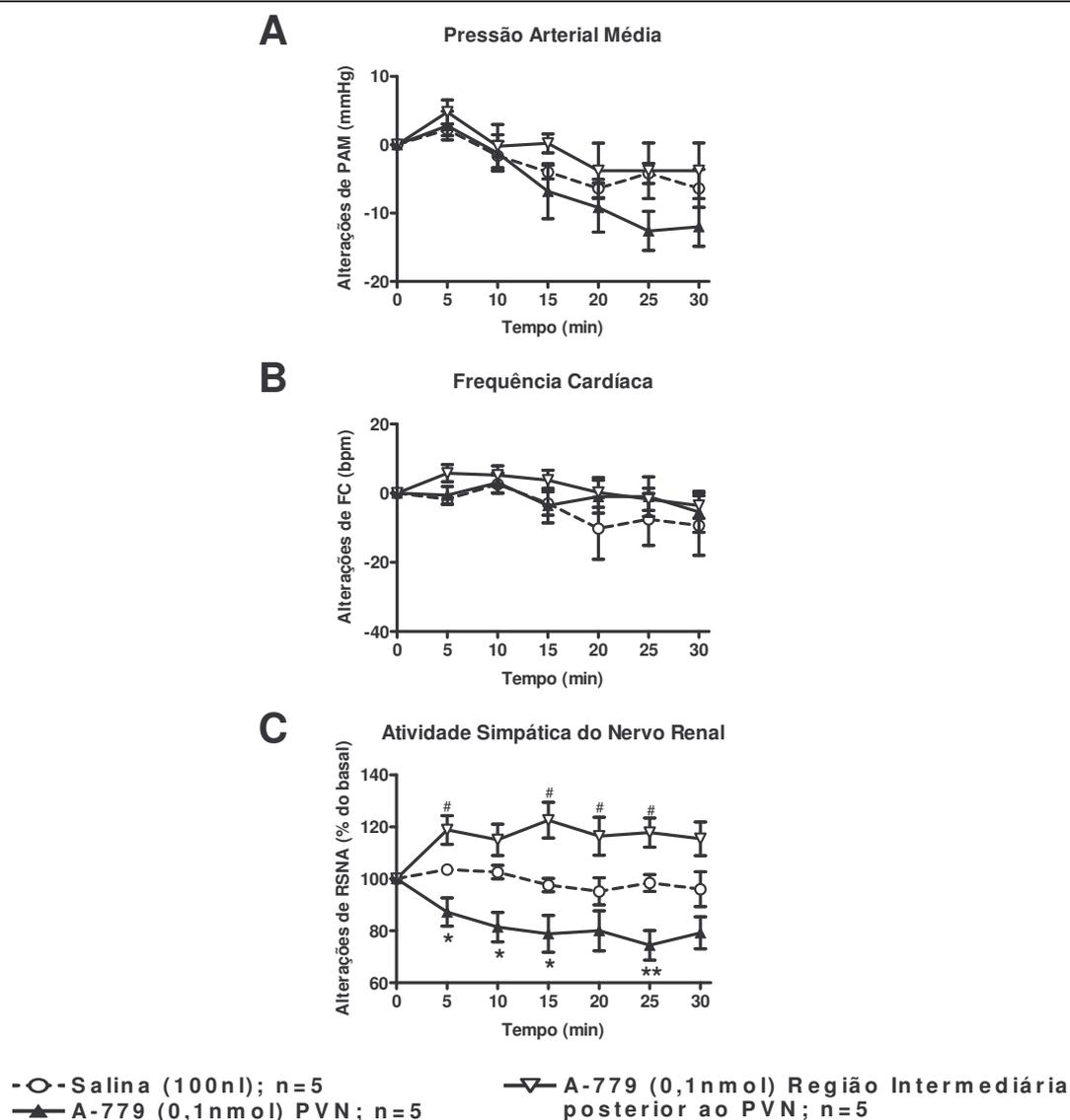


Figura 33. Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta às microinjeções bilaterais de salina (100nl), A-779 (0,1nmol) no PVN e na região intermediária posterior a este núcleo. Valores referentes às médias coletadas a cada 5 minutos após as microinjeções, comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores absolutos (A e B) e valores percentuais (C). * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ para A-779 (0,1nmol) no PVN vs salina; # $P < 0.05$ para A-779 (0,1nmol) na região intermediária posterior ao PVN vs salina (*Two-way ANOVA* com post-test Bonferroni).

Do ponto de vista funcional, a discriminação entre a área delimitada pelo PVN e regiões adjacentes a este núcleo, é importante, pois evidencia a atuação deste núcleo na manutenção da atividade simpática e conseqüente influência sobre o sistema cardiovascular. As microinjeções das angiotensinas e

antagonistas angiotensinérgicos foram realizadas nos sítios do PVN onde a microinjeção do muscimol mostrou-se efetiva em reduzir os níveis basais de PAM e RSNA. Isto pode ser observado na Figura 34, onde a microinjeção do muscimol na região intermediária posterior ao PVN não promoveu redução destas variáveis.

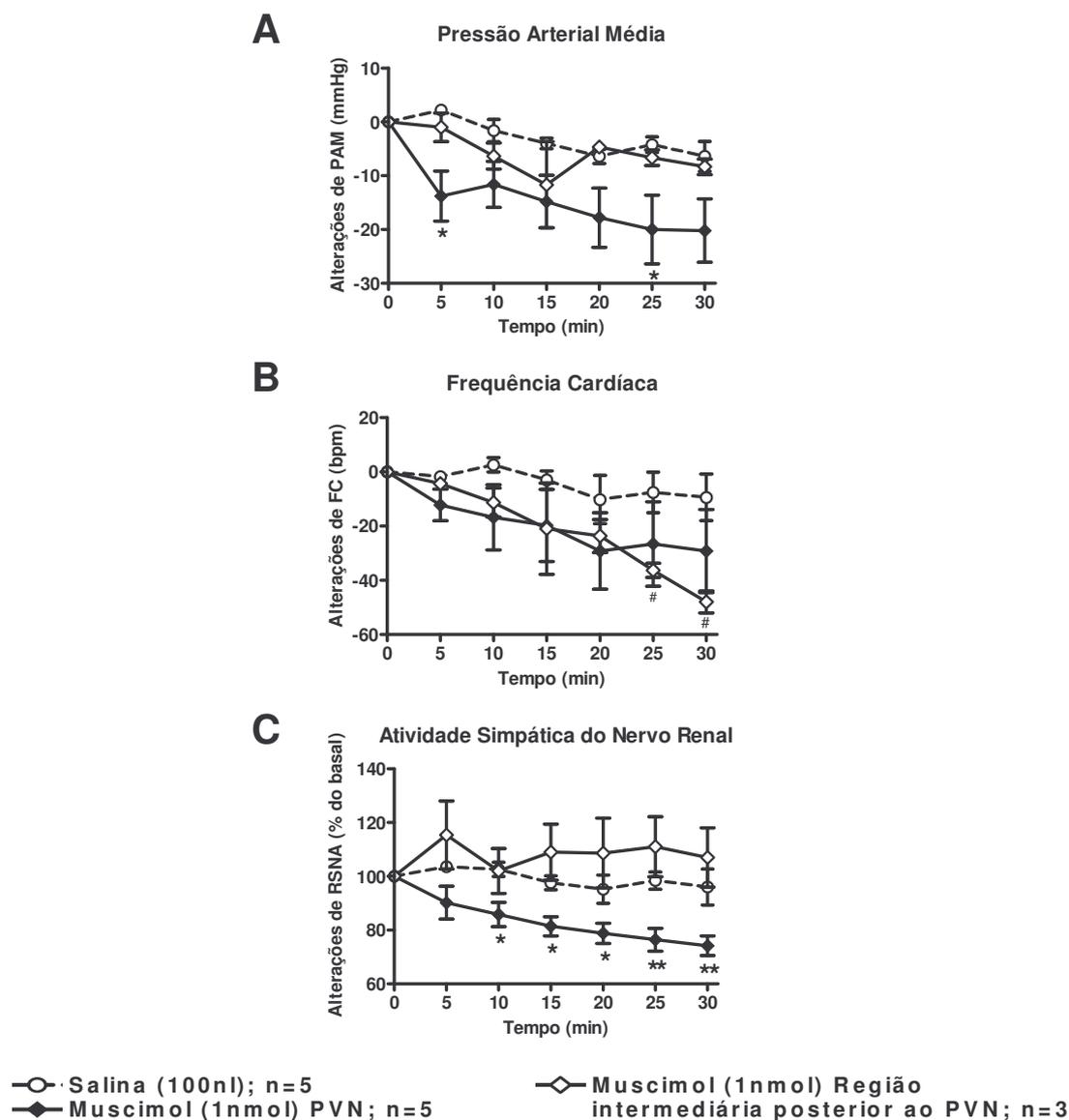


Figura 34. Alterações de PAM, FC e RSNA em resposta às microinjeções bilaterais de salina (100nl), muscimol (1nmol) no PVN e na região intermediária posterior a este núcleo. Valores referentes às médias coletadas a cada 5 minutos após as microinjeções, comparadas aos valores basais. Dados expressos em valores absolutos (A e B) e valores percentuais (C). * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ para muscimol (1nmol) no PVN vs salina; # $P < 0.05$ para muscimol (1nmol) na região intermediária posterior ao PVN vs salina.

5. DISCUSSÃO:

Os principais achados deste estudo foram: 1) A Ang-(1-7) endógena no PVN, participa da modulação tônica simpática mediada por este núcleo, exercendo um efeito excitatório sobre a atividade simpática renal; 2) o aumento de PA induzido por eucapnia e hipóxia intermitente (E-HI), é dependente do fluxo simpático gerado pelo PVN e especificamente da ação das Ang-(1-7) e Ang II sobre os neurônios deste núcleo; 3) durante a hiperosmolaridade plasmática induzida por infusão de solução salina hipertônica (SHT), a ação da Ang-(1-7) endógena no PVN parece estar acentuada, 4) as angiotensinas endógenas no PVN participam na manutenção tônica simpática renal e cardiovascular visto que o déficit de AOGEN central altera o nível de atividade simpática gerada pelo PVN. Em conjunto, estes resultados sugerem que as Ang-(1-7) e Ang II endógenas, agindo em receptores específicos ao nível do PVN, contribuem de forma relevante para a manutenção do tônus simpático e da PA em condições fisiológicas normais e alteradas, corroborando a significância funcional da produção das Ang cerebrais na regulação central do tônus simpático para o sistema cardiovascular. As principais observações feitas durante este estudo serão apresentadas e discutidas em seqüência.

5.1 PARTICIPAÇÃO DAS ANG-(1-7) E ANG II NA MANUTENÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E DA PRESSÃO ARTERIAL EXERCIDAS PELO PVN.

A microinjeção de Ang-(1-7) em animais normotensos anestesiados induziu um importante aumento dos níveis basais de RSNA, sem alterações de PAM e FC. Este resultado confirma e estende estudos anteriores, onde foi demonstrado que a aplicação de Ang-(1-7) por microiontoforese no PVN, promove um aumento da excitabilidade neuronal nesta região (Ambuhl e cols., 1994). Ambuhl e cols. (1994) sugeriram, que a Ang-(1-7) poderia modular a atividade dos neurônios do

PVN, causando um efeito final excitatório. Embora as observações de Ambuhl e cols. (1994) tenham sido bastante convincentes quanto ao papel excitatório da Ang-(1-7) no PVN, não haviam dados referentes às implicações desta excitabilidade neuronal sobre o tônus simpático e parâmetros cardiovasculares, uma vez que o registro dos neurônios de forma isolada, não os classificou quanto a suas ações excitatórias ou inibitórias, além de variáveis cardiovasculares não terem sido avaliadas (Ambuhl e cols., 1994). Nossos resultados revelaram um papel funcional para a Ang-(1-7) no PVN, permitindo sugerir, em conjunto com os dados de Ambuhl e cols., (1994), que pelo menos parte do efeito final da Ang-(1-7) sobre as células deste núcleo seja predominantemente excitatório sobre a manutenção do tônus simpático renal.

A microinjeção de Ang II induziu um aumento da RSNA, também sem alterações de PA e FC. Embora o aumento de RSNA induzido pela Ang II tenha sido em magnitude similar ao aumento evocado pela Ang-(1-7), este pareceu ser mais efetivo, sendo mantido durante todo o período experimental. A Ang II tem sido identificada em regiões que participam do controle simpático e de PA como bulbo, hipotálamo e medula espinhal (Bains e cols., 1992; Wright & Harding, 1992; McKinley e cols., 2003; Dampney, 1994). É sabido que a Ang II promove efeito excitatório sobre os neurônios destas regiões, com importantes implicações cardiovasculares (Zhu e cols., 2002; Wright & Harding, 1992; McKinley e cols., 2003). Especificamente no PVN, a Ang II causa aumento da excitabilidade neuronal (Ambuhl e cols., 1994; Felix e cols., 1991). Zhu e cols. realizaram microinjeções deste peptídeo no PVN em doses crescentes, e observaram que em todas as concentrações utilizadas (0,03, 0,3 e 3nmol), a Ang II promoveu elevação dos níveis basais de atividade simpática, com alterações variáveis de PA e FC (Zhu e cols., 2002). Os aumentos de RSNA, entretanto, só foram estatisticamente significantes em relação ao grupo controle nas doses mais elevadas (Zhu e cols., 2002). Nesse sentido, nosso estudo corrobora os dados da literatura demonstrando o papel excitatório da Ang II no PVN sobre a atividade simpática.

Embora não tenhamos avaliado o efeito da Ang-(1-7) na presença de diferentes antagonistas angiotensinérgicos, existem evidências de que este efeito

seja mediado por um receptor seletivo. Ambuhl e cols., (1994) mostraram que o aumento de excitabilidade neuronal induzido pela Ang II no PVN não foi influenciado pela aplicação de A-779. Ao contrário, o aumento de excitabilidade produzido pela aplicação da Ang-(1-7) foi completamente bloqueado pelo seu antagonista seletivo A-779, sugerindo que a Ang-(1-7), no PVN, tenha suas ações mediadas por um receptor específico (Ambuhl e cols., 1994).

Em nosso estudo, a microinjeção prévia do antagonista seletivo da Ang-(1-7), A-779, na concentração mais baixa (0,1nmol), bloqueou completamente o aumento de RSNA induzido pela Ang-(1-7). Adicionalmente, experimentos em que microinjeções de A-779 (0,1nmol) atingiram a região intermediária posterior, entre o PVN e o DMH, promoveram uma resposta completamente diferente, induzindo um aumento de RSNA.

Estudos anteriores também sugerem que as ações da Ang-(1-7) no SNC, em outros núcleos envolvidos com o controle tônico e reflexo da atividade simpática e PA, sejam mediadas por um receptor específico (Silva e cols., 1993, Fontes e cols., 1994, Chaves e cols., 2000). Fontes e cols. (1994) mostraram que o efeito pressor induzido pela microinjeção de Ang-(1-7) no BRVL foi bloqueado pelo A-779, mas não pelos antagonistas de receptores AT₁, DuP 753 (Losartan) ou AT₂, CGP42112A, sugerindo a participação de receptores específicos na mediação das ações da Ang-(1-7) no BRVL (Fontes e cols., 1994).

O receptor *Mas*, descrito por Santos e cols. (2003) como um receptor funcional para a Ang-(1-7), é expresso em diversas regiões do SNC envolvidas com o controle cardiovascular como BRVL e NTS (Santos e cols., 2003, Halbach e cols., 2000, Becker e cols., 2007). Em estudo recente, Becker e cols. observaram abundante marcação imunocitoquímica para o receptor *Mas* tanto nas regiões magno quanto parvicelular do PVN (Becker e cols., 2007). Estes dados em conjunto, reforçam as evidências quanto à participação da Ang-(1-7) na modulação cardiovascular e de tônus simpático exercida por núcleos centrais, através de um receptor específico.

Resumindo nossas observações, estes resultados sugerem que tanto a Ang II quanto a Ang-(1-7) exercem influência excitatória sobre os neurônios do PVN,

resultando em aumento dos níveis basais de atividade simpática e agindo através de receptores específicos. Estudos de imunocitoquímica descrevem a presença de Ang-(1-7) (Block e cols., 1988), assim como de Ang II (Egli e cols., 2000) endógenas no PVN. Para avaliar a participação destas angiotensinas na manutenção tônica simpática exercida pelo PVN, realizamos o bloqueio bilateral dos receptores *Mas*, AT₁ e AT₂.

A participação da Ang-(1-7) endógena foi avaliada através da microinjeção do seu antagonista, A-779. Na dose mais baixa de 0,1 nmol, o A-779 reduziu a atividade simpática renal de maneira importante, sem alterar PAM e FC. Ao compararmos este resultado com o efeito induzido pela inibição neuronal do PVN, pudemos observar que a microinjeção de muscimol promoveu uma redução de RSNA em magnitude similar, ao efeito do A-779, sugerindo que a Ang-(1-7) endógena esteja modulando o tônus simpático para o leito renal, em importância comparada à inibição causada pela ativação dos receptores GABA_A.

O bloqueio da Ang-(1-7) utilizando uma dose mais elevada de A-779 (1nmol), induziu uma diminuição dos níveis basais de PA, mas não acentuou a redução de RSNA observada anteriormente (com 0.1nmol). Este resultado levanta a questão sobre como poderia haver uma diminuição de RSNA com a dose de 0.1 nmol de magnitude similar à dose de 1 nmol, sem redução simultânea de PA. Nesse sentido, seria possível especular que o papel endógeno da Ang-(1-7) no PVN poderia ser em primeiro plano excitatório sobre a população de neurônios envolvidos na manutenção da atividade eferente simpática renal.

Estudos têm demonstrado que o tipo de descarga simpática emitido pelo sistema nervoso pode ser alterado por diferentes estímulos, embora a resposta final em muitos casos, seja avaliada simplesmente como aumento ou redução das descargas nervosas (Gebber, 1980; Nilsson e cols, 1985; Pernow e cols., 1989; Gebber, 1990; Kenney e cols., 1998; DiBona & Sawin, 1999). Kenney e cols. (2001) observaram que a desinibição dos neurônios do PVN com microinjeções de bicuculina altera o perfil da descarga simpática eferente, transformando-a de um molde com disparos sincronizados à PA e cardíaco-relacionados, para disparos de alta amplitude e baixa frequência, não cardíaco-relacionados (Kenney e cols.,

2001). Em nosso estudo a RSNA não foi analisada de maneira qualitativa, não sendo possível avaliar o resultado funcional real das alterações das descargas eferentes simpáticas moduladas pelo PVN após o bloqueio da Ang-(1-7). Dessa forma, a redução de RSNA observada pela microinjeção do A-779 nas duas concentrações, embora pareça semelhante, poderia conter uma mensagem diferenciada, que explicaria o fato de a redução de RSNA evocada pela concentração maior, ser acompanhada também por alterações de PA e FC.

Adicionalmente, a inervação pós-ganglionar simpática para os rins é responsável por inervar a vasculatura renal, todos os segmentos do nefron e as células justaglomerulares. Esta inervação, no entanto, não acontece de maneira homogênea. Barajas e cols. (1992) observaram que as fibras nervosas simpáticas renais podem ter contato com um único efector renal (Barajas e cols., 1992). A estimulação simpática para os rins causa vasoconstrição renal com redução do fluxo sanguíneo, aumento da resistência vascular, aumento na reabsorção tubular de sódio, redução da excreção urinária de sódio e da taxa de secreção de renina. Entretanto, estas respostas são geradas de maneira diferenciada, dependendo da intensidade da estimulação nervosa (DiBona, 2000; DiBona, 2001).

Estudos indicam que aumentos ou reduções na RSNA integrada são dependentes de alterações paralelas de aumento e diminuição do número de fibras nervosas ativas recrutadas para alvos efetores renais individuais, assim como da intensidade destas descargas (DiBona e cols., 1997; DiBona & Jones, 1998; Grisk & DiBona, 1998; DiBona & Sawin, 1999). DiBona & Sawin exemplificaram este fato ao demonstrar que, embora a estimulação de receptores somáticos ou térmicos, através de pinçamento da pele ou aquecimento térmico, respectivamente, tenham promovido aumentos similares de RSNA integrada, induziram efeitos hemodinâmicos diferentes, de forma que o aumento da resistência vascular renal foi maior em resposta à estimulação térmica do que à somática. Os autores sugeriram ainda, que o aumento de RSNA evocado pela estimulação térmica, provavelmente continha, na sua codificação, informações relacionadas a ativação de uma única população de fibras nervosas simpáticas renais, promovendo respostas de descargas na frequência de estimulação

característica da vasculatura renal resultando, conseqüentemente, em uma vasoconstrição mais efetiva do que aquela evocada pelo estímulo somático. DiBona & Sawin concluíram que diferentes estímulos podem ativar diferentes grupamentos neuronais centrais responsáveis pela regulação de grupos específicos de fibras nervosas renais, induzindo efeitos hemodinâmicos diversos (DiBona & Sawin, 1999).

Não é improvável que em outras circunstâncias, como pela administração de drogas em áreas do SNC, a citar o PVN, um efeito semelhante possa acontecer. Assim, é possível especular que as diferentes concentrações de A-779 utilizadas em nosso estudo poderiam produzir respostas diferenciadas de descargas simpáticas, que ao serem executadas pelas estruturas renais eferentes, promovem alterações, por exemplo de fluxo renal, mais ou menos intensas, apresentando ou não repercussões sobre variáveis cardiovasculares como PA e FC. No entanto, outros estudos serão necessários no sentido de elucidar o resultado funcional real de redução de RSNA após o bloqueio endógeno da Ang-(1-7) no PVN.

Um outro aspecto a ser considerado quanto ao controle eferente simpático exercido pelo PVN consiste na modulação entre as descargas simpáticas destinadas a diferentes órgãos alvo. Os circuitos centrais são capazes de produzir respostas de descargas simpáticas eferentes heterogêneas, ou seja, descargas simpáticas de intensidade não uniforme para os diferentes órgãos inervados. Diversos estudos têm demonstrado que a ativação química do PVN produz alterações nos níveis de atividade nervosa para diferentes alvos (Kenney e cols., 2003). Katafuchi e cols. (1988) demonstraram que em ratos anestesiados e sino-aórtico denervados, a microinjeção de glutamato no PVN produz aumento de descarga simpática para a glândula adrenal, mas não altera a RSNA (Katafuchi e cols., 1988). Adicionalmente, a microinjeção de *ácido D,L-Homocisteic* no PVN de coelhos anestesiados promoveu redução das descargas simpáticas destinadas para os rins, e aumento daquelas destinadas para glândulas adrenais e esplânicas, tendo sido observados ainda, tanto aumento quanto diminuição das descargas simpáticas direcionadas para o coração (Deering & Coote, 2000; Lu e

cols., 1991). Esta resposta de simpato-inibição para os rins e de simpato-excitação para o coração pode ser observada também em situações de expansão de volume agudo (Deering & Coote, 2000). Em nosso estudo foi avaliada somente a atividade simpática diretamente relacionada à inervação renal. Por este motivo não podemos excluir a possibilidade de haver uma modulação diferente nas descargas simpáticas destinadas, por exemplo, para o coração, nas diferentes concentrações de A-779 administradas.

O próximo passo do nosso estudo, visou comparar os efeitos do bloqueio endógeno da Ang-(1-7) com o bloqueio da Ang II no PVN, através da microinjeção de antagonistas dos receptores AT₁ e AT₂, Losartan e CV11974, e PD123319, respectivamente, na dose equimolar de 1nmol. A microinjeção do Losartan no PVN reduziu os valores basais de PA, sem alterações significantes de FC e RSNA em relação ao grupo controle. A microinjeção de CV11974 não alterou os níveis basais de PAM e FC, mas induziu um rápido e significativo aumento de atividade simpática. Os efeitos do bloqueio dos receptores AT₁ no PVN já haviam sido descritos em estudos anteriores. Zhu e cols. (2002) observaram que a administração de Losartan no PVN é capaz de bloquear completamente o efeito excitatório evocado pela Ang II neste núcleo. Ao se avaliar os efeitos da microinjeção isolada de Losartan no PVN, pôde ser observado discreta, mas significativa redução de PA, sem alteração dos níveis basais de RSNA (Zhu e cols., 2002). Chen & Toney (2003) obtiveram resultados semelhantes uma vez que a microinjeção dos antagonistas AT₁, Losartan e L158809 no PVN, não promoveu alterações significantes de FC e RSNA (Chen & Toney, 2003). Com base nestes dados, podemos concluir que a Ang II participa da modulação da PA, mas apesar de exercer excitação sobre os neurônios do PVN, esta estimulação não parece contribuir, através da ativação dos receptores AT₁, para a modulação das descargas simpáticas renais originadas neste núcleo, em condições basais.

Embora os receptores AT₁ não pareçam participar da modulação tônica simpática exercida pelos neurônios do PVN, a atuação da Ang II poderia se dar através da ativação dos receptores AT₂. Por esse motivo realizamos o bloqueio bilateral dos receptores AT₂ no PVN. A microinjeção do PD123319 não resultou

em alterações significantes de PAM ou FC, mas promoveu uma redução importante dos níveis basais de RSNA. Poucos trabalhos relatam ações mediadas pelos receptores AT₂ no SNC. Alguns estudos têm demonstrado a participação destes receptores no efeito dipsogênico e de ingestão de sódio em resposta à administração de Ang II no PVN e na área Septal Média (ASM). O bloqueio dos receptores AT₂ promove redução da resposta de ingestão de água e sódio promovida pela Ang II (Prado e cols., 1996; Saad & Camargo, 2003). Em relação à participação destes receptores na regulação simpática exercida pelo PVN, Chen & Toney (2003) observaram que microinjeções de PD123319 não promoveram alterações nos níveis basais de PAM, FC e RSNA ao serem administradas isoladamente, e nem após a realização de bloqueio dos receptores GABAérgicos no PVN (Chen & Toney, 2003), sugerindo que estes receptores não participem da manutenção tônica simpática gerada pelos neurônios do PVN.

O efeito de redução de RSNA em resposta à microinjeção de PD123319 observado em nosso estudo foi diferente daquele observado por Chen & Toney (2003). O procedimento experimental realizado durante nosso projeto foi bem similar aos procedimentos realizados por Chen & Toney (2003), não havendo diferenças metodológicas, exceto por discreta variação nas coordenadas utilizadas para a realização das microinjeções e pela dose do antagonista utilizada.

As coordenadas usadas para as microinjeções em nosso estudo, foram 1,8mm posterior ao bregma, 0,4-0,5mm de lateralidade à linha média e 8,0mm de introdução ventral da agulha em relação à superfície dorsal do bregma, em ratos de até 350g. Chen & Toney (2003) consideraram 1,6-2,0mm posterior ao bregma, 0,5-0,7mm de lateralidade à linha média e 7,0-7,5mm de introdução ventral da agulha em relação à dura-mater, em ratos de 350 – 450g. Embora esta variação seja muito pequena pode promover magnitudes de respostas de descargas simpáticas diferentes. Isto pôde ser demonstrado pelo estudo de Allen (2002), onde a realização de microinjeções sequenciadas de agonista GABA_A, muscimol, nos sentidos ântero-posterior, dorso-ventral e lateral ao PVN resultaram em diferenças relacionadas tanto à magnitude quanto ao período gasto para se alcançar o efeito máximo da resposta. De modo geral, as injeções realizadas de

1,3-2,0mm posterior ao bregma, com até 0,5mm de lateralidade e 7,7-8,4mm ventral à superfície dorsal do bregma produziram os efeitos mais pronunciados de redução de PAM, FC e RSNA. Injeções mais laterais que 0,5mm produziram pouco ou nenhum efeito sobre as variáveis avaliadas (Allen, 2002). A localização precisa dos receptores AT₂ certamente não é a mesma dos receptores GABA_A, mas não é improvável que um resultado semelhante a este observado por Allen com o muscimol, em decorrência de pequenas diferenças nas regiões atingidas pela microinjeção do PD123319 possa acontecer.

Outra diferença entre os estudos, foi a dose de PD123319 utilizada. Nossos animais foram microinjetados com uma dose 10 vezes menor (1nmol) do que aquela utilizada por Chen & Toney (2003), não sendo improvável que um efeito inespecífico, causado pela alta dose do antagonista, possa ter escondido uma contribuição dos receptores AT₂ na manutenção do tônus simpático exercida pelos neurônios do PVN.

Outro aspecto a ser considerado é que a similaridade entre o efeito induzido pelo bloqueio dos receptores *Mas* e AT₂, uma vez que ambos reduziram a RSNA sem causar alterações de PAM e FC, traz a possibilidade de haver uma interferência entre o PD123319 e os receptores da Ang-(1-7). Pinheiro e cols., (2004) observaram que o efeito antidiurético do AVE 0991, um agonista do receptor *Mas*, em rins de camundongos, foi totalmente bloqueado pelo PD123319 (Pinheiro e cols., 2004). Especificamente no hipotálamo, Gironacci e cols., (2000) demonstraram que o PD123319, assim como o A-779, bloqueou o efeito de liberação de norepinefrina induzido pela Ang-(1-7) nesta região (Gironacci e cols., 2000). Estes estudos sugerem que um mecanismo de oligomerização ou cross-talk, característico dos receptores acoplados à proteína G, poderia estar acontecendo (Breitwieser, 2004). Entretanto, se um efeito de cross-talk estivesse acontecendo em nosso estudo, este também poderia ter ocorrido no estudo de Chen & Toney (2003). Adicionalmente, apesar de os efeitos induzidos pelo A-779 e pelo PD123319 tenham sido de redução de RSNA, o padrão de resposta foi diferente, sugerindo que não houve uma interação entre receptores, mas sim uma resposta específica causada pela ativação de diferentes receptores.

Finalmente, embora os resultados obtidos pelo bloqueio dos receptores AT₂ em nosso estudo sejam ainda iniciais, constituem um dos primeiros dados a indicar um papel funcional destes receptores ao nível do SNC, na modulação simpática para o sistema cardiovascular. Baseado nestas observações, podemos sugerir que não só a Ang-(1-7), mas também a Ang II, participe da manutenção tônica simpática exercida pelo PVN, tendo esta última, seus efeitos, mediados pelos receptores AT₂. No entanto outros estudos serão necessários no sentido de avaliar o papel dos receptores AT₂ no PVN.

Uma importante observação em nosso estudo foi a de que o bloqueio da Ang-(1-7) endógena e também dos receptores AT₂, promoveu uma redução relevante dos níveis de atividade simpática. A magnitude desta redução foi comparada com a resposta de RSNA produzida pela microinjeção de agonista GABA_A, muscimol. GABA é um neurotransmissor inibitório presente no SNC, apresentando-se em elevadas concentrações em núcleos envolvidos no controle de funções autonômicas (Brown e cols., 1981). Por esse motivo, tem sido implicado em diversas ações relacionadas ao controle do sistema cardiovascular e manutenção tônica simpática. No PVN, as terminações nervosas GABAérgicas constituem aproximadamente 50% de todas as sinapses desta região (Decavel e cols., 1990). Dessa forma, os receptores GABA_A constituem importantes mediadores na regulação dos níveis de atividade simpática para o organismo, exercida pelos neurônios do PVN (Martin e cols., 1991; Zhang & Patel, 1998; Zhang e cols., 2002; Allen, 2002). A administração de agonista de receptor GABA_A, muscimol, no PVN já foi descrita em estudos anteriores, sendo responsável por promover redução significativa de PA, FC e de atividade simpática (Zhang & Patel, 1998; Zhang e cols., 2002; Allen, 2002). Por outro lado, a administração de antagonista de receptor GABA_A, bicuculina, induz a elevação dos níveis pressóricos, aumento de FC e de atividade simpática (Martin & Haywood, 1992; Novellis e cols., 1995; Tagawa & Dampney, 1999; DiBona & Jones, 2001; Zhang e cols., 2002; Chen & Toney, 2003). Estas evidências sugerem uma participação tônica inibitória dos receptores GABAérgicos

localizados no PVN para a manutenção dos níveis de descarga simpática e de PA para o organismo (Zhang e cols., 2002; Chen & Toney, 2003).

Os resultados obtidos pela microinjeção de muscimol (1nmol) no PVN, em nosso estudo, mostraram haver uma redução significativa dos níveis basais de PAM e de FC quando comparados ao grupo controle. Em relação à atividade simpática pôde-se observar uma redução acentuada, de magnitude similar àquela redução evocada pelo A-779. Estes resultados confirmam estudos anteriores indicando a participação do sistema GABAérgico para a modulação simpática e provêm evidências de que a Ang-(1-7), atuando através de receptores específicos ao nível do PVN, possa contrabalancear os efeitos inibitórios GABAérgicos, participando da manutenção tônica simpática para o organismo.

O receptor GABA_A é uma proteína complexa com múltiplos sítios de ligação acoplados a um canal de cloreto (Cl⁻) (Ferguson & Bains, 1997). A ativação do receptor GABA_A pelo GABA ou por seu agonista, muscimol, resulta em aumento da condutância ao Cl⁻ através dos canais deste receptor (Eldefrawi & Eldefrawi, 1987; Hasser e cols., 1997). O influxo de Cl⁻ para a célula provoca uma hiperpolarização da membrana celular, com conseqüente inibição neuronal (Li & Patel, 2003; Chen & Toney, 2003). Por outro lado, o bloqueio do receptor GABA_A reduz a condutância da membrana celular ao Cl⁻, deixando de induzir a hiperpolarização. Na ausência de um fator excitatório, não seria esperado que o bloqueio dos receptores GABA_A pudesse promover despolarizações neuronais. Entretanto, conforme foi descrito anteriormente, o bloqueio dos receptores GABAérgicos ao nível do PVN produz imediata elevação dos níveis pressóricos, de FC e de atividade simpática, indicando que na ausência da inibição exercida pela ativação destes receptores, exista uma fonte de excitação capaz de desencadear potenciais de ação com conseqüente aumento das descargas neuronais pelo predomínio da excitação neuronal. Nesse sentido, diversos neurotransmissores excitatórios presentes no PVN poderiam servir como fonte geradora de excitação neuronal, mas a despeito destes e baseado nos resultados observados em nosso estudo, sugerimos a Ang-(1-7), além da Ang II, como um possível gerador desta excitabilidade.

Uma vez que Ang-(1-7) e Ang II estão presentes no PVN, e agem como fatores excitatórios sobre o tônus simpático e PA, surge uma questão sobre qual seria a origem da Ang-(1-7) presente no PVN. Uma possível explicação para a origem deste peptídeo no PVN seria através de sua produção local, uma vez que todos os constituintes do SRA são identificados no SNC, especialmente no hipotálamo (Wright e Harding, 1992; McKinley e cols, 2003; Ferguson e cols, 2001). É sabido que nesta região, a Ang-(1-7) encontra-se em concentrações comparáveis as da Ang I e Ang II (Chappell e cols., 1989). O AOPEN é uma das proteínas mais abundantes no fluido cérebro-espinhal (CSF), constituindo cerca de 3% das proteínas totais (Wright & Harding, 1992; McKinley e cols., 2003). A renina encontra-se em baixas concentrações comparada ao AOPEN sendo expressa no tálamo e hipotálamo, entre outras regiões (Wright & Harding, 1994). A ECA2, que constitui uma das principais vias de formação da Ang-(1-7), é expressa em várias regiões cerebrais, incluindo OSF, que mantém estreita relação com o PVN (Doobay e cols., 2007). Adicionalmente, a Ang-(1-7) pode ser formada pela ação de enzimas como a prolil-endopeptidase, presente especificamente no PVN (Welches e cols., 1991). Embora hajam evidências sobre a formação local de Ang (McKinley e cols., 2003), o modo como o SRA cerebral local atua e as quantidades produzidas dos peptídeos, não estão completamente esclarecidos.

Outra forma pela qual a Ang-(1-7) estaria presente no PVN, seria através de um sistema neural formado por vias angiotensinérgicas onde este peptídeo seria liberado sinapticamente nesta região (McKinley e cols., 2003). Imunorreatividade para os receptores AT₁ tem sido identificada em neurônios do PVN estimulados por terminações nervosas originadas no BRVL, eminência mediana, NTS, Bulbo dorsoventromedial, indicando que a Ang II esteja sendo liberada por estas terminações (Oldfield e cols., 2001). Adicionalmente, Tagawa & Dampney (1999) observaram que os aumentos de PA, FC e RSNA induzidos por estimulação dos neurônios do PVN através de microinjeções de bicuculina nesta região, foram significativamente reduzidos após o bloqueio dos receptores AT₁ no BRVL ipsilateral, indicando que exista uma via angiotensinérgica do PVN para o BRVL (Tagawa & Dampney, 1999). Embora não existam estudos demonstrando uma

resposta semelhante de liberação sináptica da Ang-(1-7) no PVN, esta hipótese não pode ser descartada, uma vez que este peptídeo atua sobre os neurônios das regiões citadas nestes estudos que, subseqüentemente, enviam projeções para os neurônios do PVN (Block e cols., 1989, Krob e cols., 1998).

Uma outra possibilidade para o acesso da Ang-(1-7) ao PVN seria através da circulação sanguínea. É sabido que as Ang não atravessam a barreira hematoencefálica. Entretanto, é possível que Ang plasmáticas possam interagir com seus receptores localizados nos Órgãos circumventriculares (OCV) incluindo Órgão Subfornical (OSF), Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal (OVLT) e Área Postrema (AP), além da hipófise anterior e posterior e eminência mediana (Wright & Harding, 1992). Estas regiões mantêm estreita relação com o PVN pela proximidade topográfica e por enviarem eferências para este núcleo, sendo possível que os níveis plasmáticos da Ang-(1-7) exerçam uma influência indireta sobre os neurônios do PVN (McKinley e cols., 2003; Wright & Harding, 1992; Block e cols., 1989; Ushigome e cols., 2002; Bains e cols., 1992; Bains & Ferguson, 1995; Chen & Toney, 2001). Nesse sentido, Botelho e cols. (1994) demonstraram que durante condições fisiológicas alteradas como hiperosmolaridade, desidratação ou hemorragia, onde sabidamente os níveis de atividade simpática apresentam-se elevados (Li & Patel, 2003; Chen & Toney, 2001), ocorre paralelamente um aumento da Ang-(1-7) plasmática (Botelho e cols., 1994). É possível especular que o aumento de atividade simpática gerado pelo PVN nestas condições possa ser conseqüência, pelo menos parcial, de um aumento de excitabilidade neuronal evocado indiretamente pelos elevados níveis da Ang-(1-7) plasmática.

Em conjunto, os resultados deste estudo e de estudos anteriores sugerem que a Ang-(1-7) participa como um agente excitatório no PVN capaz de influenciar tonicamente os níveis de atividade neuronal neste núcleo, com implicações para o sistema cardiovascular. Adicionalmente a Ang II também pode participar da regulação de PA e da modulação tônica simpática exercida pelos neurônios do PVN, atuando através dos receptores AT₁ e AT₂, respectivamente.

5.2 PARTICIPAÇÃO DAS ANG-(1-7) E ANG II NA MANUTENÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E DA PRESSÃO ARTERIAL EXERCIDAS PELO PVN DURANTE A HIPERTENSÃO INDUZIDA POR EUCAPNIA E HIPÓXIA INTERMITENTE:

Para a simular a apnéia do sono, submetemos os animais a ciclos alternados de hipóxia e hiper-capnia ou ar ambiente, durante 7 horas do período do sono. Para isso, a concentração de O₂ ofertada foi reduzida (21% - 5%) enquanto que a de CO₂ foi aumentada (0% - 5%). A coleta de sangue arterial realizada antes do início da ciclagem e durante os picos de hipóxia/hipercapnia e ar ambiente, mostrou haver uma redução na pressão parcial de O₂ (PO₂) sem alterações nos níveis de CO₂. O estímulo causado pela hipóxia produz uma resposta de hiperventilação reduzindo os níveis de CO₂. Dessa forma, mesmo sendo oferecido um aumento na concentração de CO₂ inspirado, este pareceu atuar como um suporte para a impedir uma queda da PCO₂, sem realmente resultar em hiper-capnia. Assim, o protocolo utilizado simulou as alterações dos gases arteriais observados na apnéia do sono caracterizando uma condição de eucapnia e hipóxia intermitente (E-HI).

Embora estudos tenham mostrado que a hipóxia seja o principal estímulo para ativação dos quimiorreceptores (Morgan e cols., 1995; Xie e cols., 2001), a combinação de hipóxia com hiper-capnia ou eucapnia causa uma estimulação mais efetiva do sistema nervoso simpático (SNS; Morgan e cols., 1995; Cuttler e cols., 2004). Cuttler e cols. (2004) demonstraram não haver diferença no nível de ativação simpática induzido por hipóxia associada à hiper-capnia ou eucapnia. No entanto, ambas as combinações induziram aumentos mais pronunciados de descarga simpática do que a hipóxia associada a hipocapnia (Cuttler e cols., 2004). Dessa forma, a condição de E-HI, também constitui uma ferramenta eficaz para se avaliar os efeitos da apnéia do sono.

Como observado em nossos resultados, após 14 dias de exposição à E-IH, os animais infundidos com salina no PVN apresentaram um aumento de PA sem alterações de FC, comparados aos animais sham. O tratamento crônico com o agonista de receptor GABA_A, muscimol, reduziu a PA e a FC para abaixo dos

valores basais tanto nos animais sham, quanto naqueles submetidos à E-HI. Estes dados sugerem que o aumento de PA induzido pela E-HI é, pelo menos parcialmente, dependente do fluxo simpático gerado pelos neurônios do PVN. Além disso, os neurônios do PVN, mantidos sob constante inibição GABAérgica (Decavel & Van den Pol, 1990; Allen, 2002), continuam a ser inibidos mesmo durante a exposição à E-HI, sugerindo que um aumento dos mecanismos excitatórios, e não uma deficiência dos mecanismos GABAérgicos, contribui para a elevação de PA associado a esta condição.

Vários estudos têm avaliado os mecanismos moduladores das descargas simpáticas geradas pelo PVN, durante condições fisiológicas ou fisiopatológicas que induzem simpato-excitação ou hipertensão (Zucker e cols., 2004; Zhang e cols., 2002; Allen, 2002; Weiss e cols., 2007). Durante estas condições, foram observados tanto redução na expressão da nNOS (Zhang e cols., 1997; Zhang e cols., 2001) e dos receptores GABA_A (Zhang e cols., 2002) em neurônios simpatoinibitórios, quanto aumento na expressão dos receptores AT₁ (Zucker e cols., 2002; Zucker e cols., 2004). Recentemente, foi demonstrado que a exposição à HI parece estar associada à redução na expressão de nNOS no PVN e a um aumento na expressão de receptores AT₁ nos órgãos circunventriculares (CVO) (Weiss e cols., 2007). Vale lembrar que os OCV enviam projeções para os neurônios do PVN, e estão localizados em uma região que apresenta redução da barreira hemato-encefálica (Wright & Harding, 1994). A estimulação do SRA, devido a hiperatividade simpática induzida pela HI, promove aumento dos níveis circulantes de Ang II (DiBona, 2001; Fletcher e cols., 1999; Fletcher e cols., 2002).

Ciclos de HI são poderosos estímulos para os quimiorreceptores, que através de projeções enviadas para áreas específicas do SNC como BRVL e NTS, induzem aumento das descargas simpáticas (Prabhakar e cols., 2005). O PVN participa das vias neuroanatômicas envolvidas na modulação de respostas cardiovasculares de atividade simpática à estimulação do quimiorreflexo (Kubo e cols., 1997; Oliván e cols., 2001; Berquin e cols., 2000). O PVN pode modular as descargas simpáticas através de projeções para outros grupos de neurônios premotores simpáticos, como o BRVL, e através de projeções diretas para os

neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna IML, inclusive aqueles que se projetam para coração, adrenais e rins (Badoer, 2001; Sawchenko & Swanson, 1982; Strack e cols., 1989; Schramm e cols., 1993). Dessa forma, um aumento das descargas simpáticas geradas pelo PVN altera o ritmo cardíaco (Narkiewicz e cols., 1998a; Narkiewicz e cols., 1998b), eleva as catecolaminas circulantes (Fletcher e cols., 1999; Zoccal e cols., 2007) e aumenta a secreção de renina (Fletcher e cols., 1999; Fletcher e cols., 2002). Todos estes fatores contribuem para o desenvolvimento de hipertensão em pacientes com apnéia do sono.

O bloqueio crônico da Ang-(1-7), através da infusão de A-779 no PVN de ratos submetidos à E-HI, preveniu o aumento de PA observado nos animais infundidos com salina e submetidos ao mesmo protocolo. O bloqueio crônico da Ang II, através dos receptores AT₂, no PVN também preveniu o aumento de PA induzido pela E-HI, sem alterar os níveis basais desta variável. Vale notar que O tratamento crônico com A-779 ou PD123319 não resultou em quaisquer alterações de PA nos animais sham.

O bloqueio crônico dos receptores AT₁ no PVN, utilizando Losartan e ZD7155, impediu e reverteu a elevação de PA induzida por E-HI. Diferentemente dos demais antagonistas utilizados, Losartan e ZD7155 também promoveram redução da PA nos animais sham ao término de 14 dias de tratamento.

Como vimos em nossos resultados preliminares, as Ang-(1-7) e Ang II, participam da modulação do fluxo simpático renal e da PA de gerados pelo PVN em condições normais (Zhu e cols., 2002). O bloqueio agudo dos receptores da Ang-(1-7) e AT₂, em animais normotensos anestesiados, reduziu dramaticamente a RSNA, mas não alterou a PA. Na condição de E-HI, a PA não foi alterada nos animais sham infundidos com A-779 ou PD123319 por 14 dias, mas ambos os antagonistas bloquearam o aumento de PA nos animais E-HI, sugerindo que os efeitos agudos e crônicos da ativação dos receptores *Mas* e AT₂ podem ser diferentes. Adicionalmente, observamos que somente o bloqueio dos receptores AT₁ reduziu a PA em animais sham, corroborando dados anteriores por demonstrar que estes receptores, no PVN, contribuem para a modulação da PA em condições normais, exercendo uma regulação tônica (Zhu e cols., 2002).

Porque todos os antagonistas utilizados preveniram completamente o aumento de PA, seria possível que estivesse ocorrendo um efeito inespecífico destes antagonistas. Entretanto, é importante ressaltar que a infusão de veículo salina não impediu o aumento de PA, eliminando a possibilidade de um efeito inespecífico causado pela infusão de volume ou lesão do PVN em mediar esta inibição. Além disso, os efeitos dos antagonistas angiotensinérgicos não foram idênticos, sugerindo que mecanismos diferentes podem estar envolvidos modulando os efeitos de cada um dos subtipos de receptores.

A ativação dos receptores da Ang-(1-7), aumenta a taxa de disparo dos neurônios do PVN. Como descrito anteriormente, os efeitos da Ang-(1-7) parecem ser mediados por receptores específicos nesta região. Marcação abundante para o receptor *Mas* foi encontrada nas porções magno e parvicelular do PVN (Becker e cols., 2007), dando suporte à hipótese de que receptores da Ang-(1-7) poderiam regular especificamente o tônus simpático originado no PVN.

Os receptores AT₁ e AT₂ têm 34% de homologia entre si e apresentam alta afinidade pela Ang II (Stoll & Unger, 2001). Embora a maioria das regiões cerebrais expressem apenas um dos subtipos, algumas áreas, incluindo o PVN, expressam os dois subtipos (McKinley e cols., 2003). O PVN apresenta um predomínio dos receptores AT₁ com altas densidades especialmente na região parvicelular, principal envolvida na regulação simpática e cardiovascular (Badoer, 2001; Allen e cols., 1998; McKinley e cols., 2003; Blair e cols., 1996). A maioria das ações cardiovasculares da Ang II, nesta região, parecem ser mediadas pelos receptores AT₁. Entretanto, como observado anteriormente, os receptores AT₂ no PVN também são mediadores de uma porção significante dos efeitos da Ang II. Além disso, o antagonista de receptor AT₂, PD123319, apresentou um efeito sobre a FC oposto àquele induzido pelos antagonistas de receptor AT₁ nos ratos expostos à E-HI, sugerindo que subtipos seletivos de antagonistas exercem efeitos específicos para prevenir o aumento de PA. Dessa forma, os efeitos sobre a PA produzidos pelos diferentes antagonistas, embora pareçam similares, provavelmente ocorreram através do bloqueio de receptores distintos, que contribuem separadamente para a regulação da PA.

Finalmente, apenas o bloqueio dos receptores AT₁ reduziu a PA nos animais sham e reduziu para abaixo dos valores basais nos animais E-HI. Juntas, estas observações sugerem que sob condições normais, somente os receptores AT₁ mediam um papel tônico excitatório da Ang II sobre os neurônios do PVN, para a modulação da PA. Entretanto, durante a exposição à E-HI, tanto os receptores da Ang-(1-7) quanto da Ang II no PVN, parecem participar na geração do aumento de PA. Embora não tenhamos realizado uma medida direta de atividade simpática para confirmar que ocorreram alterações de descargas simpáticas, o efeito diferenciado dos antagonistas combinado às observações anteriores (Zhu e cols., 2002), sugerem que os todos os tipos de receptores angiotensinérgicos avaliados regulam a PA nesta condição, mas através de mecanismos diferentes.

Estes resultados corroboram os dados existentes sobre a importância do SNC, SRA e especificamente sobre o envolvimento das angiotensinas atuando nos neurônios premotores simpáticos do PVN para a modulação do aumento de PA induzido por um modelo de E-HI simulando apnéia do sono em ratos. Embora outros mecanismos sejam provavelmente ativados, para participar da resposta sistêmica pressora, uma ativação dos receptores angiotensinérgicos no PVN é necessária para o aumento de PA neste modelo de apnéia do sono em ratos.

5.3 PARTICIPAÇÃO DAS ANG-(1-7) E ANG II NA MANUTENÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E DA PRESSÃO ARTERIAL EXERCIDAS PELO PVN DURANTE HIPEROSMOLARIDADE PLASMÁTICA:

Nesta parte do nosso estudo, avaliamos a participação da Ang-(1-7) endógena no PVN sobre a manutenção do tônus simpático e da PA, após a indução de hiperosmolaridade plasmática. A infusão de salina hipertônica (SHT, 1M ou 2,5M) por 30 minutos promoveu um aumento de PA, enquanto que a infusão de salina isotônica (SIT) não alterou os níveis basais desta variável. Este

aumento de PA foi acompanhado por alterações variáveis de RSNA, nos grupos SHT 1M e SIT, e por redução de RSNA no grupo SHT 2,5M.

Weiss e cols (1996) observaram respostas similares após a infusão de SHT 2,5M, sugerindo que a redução de RSNA, atua como uma resposta compensatória à elevação de PA (Weiss e cols., 1996). Nesse sentido, a redução da estimulação simpática renal favorece a eliminação de sódio, diminui a liberação de renina, os níveis circulantes de Ang II e seus efeitos vasoconstritores (DiBona, 2000). Entretanto, outros estudos têm relatado que a hiperosmolaridade plasmática está geralmente associada à elevação de atividade simpática (Garcia-Estan e cols., 1989; Scrogin e cols., 1999).

Aumentos nos níveis de sódio plasmático ativam os osmorreceptores, desencadeando respostas de núcleos centrais especializados na regulação osmótica (Toney e cols., 2003; McKinley e cols., 1999). O PVN constitui uma destas regiões, por participar do eixo-hipotálamo-hipofisário, integrando respostas endócrinas ou neuro-humorais (Blair e cols., 1996, Badoer, 2001; Block e cols., 1989). Os neurônios magnocelulares sintetizam vasopressina (AVP) enviando-a até a hipófise posterior através de projeções neuronais, para ser armazenada e finalmente liberada na circulação (Blair e cols., 1996; Badoer, 2001). Adicionalmente, o PVN recebe projeções dos OVLT e OSF, que constituem os OCV e contêm os corpos celulares dos osmorreceptores (Larsen & Mikkelsen, 1995; Wright & Harding, 1994). Estes osmorreceptores, localizados numa região que apresenta redução da barreira hemato-encefálica, estão em contato praticamente direto com o plasma circulante, sendo sensíveis a variações de osmolaridade (McKinley e cols., 1999). Estudos têm descrito que aumentos de osmolaridade induzem expressão de c-Fos em neurônios do OVLT e do OSF que se projetam para o PVN (Larsen & Mikkelsen, 1995). Adicionalmente, marcação de Fos é observada especificamente no PVN, nas regiões magno e parvicelular, indicando acentuada ativação neuronal nesta condição (Oldfield e cols., 1994; Stocker e cols., 2004 a,b).

Além de atuar na regulação hidro-eletrolítica, o PVN participa do controle autonômico simpático (Blair e cols., 1996; Badoer, 2001), como discutido

previamente. Os neurônios parvicelulares modulam o tônus simpático em condições basais e durante alterações de osmolaridade plasmática (Badoer e cols., 2001; Sawchenko & Swanson, 1982; Strack e cols., 1989; Schramm e cols., 1993). A principal fonte de estimulação simpática mediando respostas osmóticas parece ser de projeções glutamatérgicas e angiotensinérgicas originadas nos OVLT e OSF (Renaud, 1994; Bains & Ferguson, 1997a). Estas projeções são críticas para a produção de AVP e ocorrem devido ao aumento da Ang II plasmática (Iovino & Steardo, 1984; Ferguson & Renaud, 1986) envolvendo a ativação dos receptores AT₁ no PVN (Bains e cols., 1992).

Adicionalmente, as respostas simpáticas geradas no PVN podem influenciar a função renal, outro importante regulador da osmolaridade plasmática (Sawchenko & Swanson 1982; Strack e cols., 1989; Schramm e cols., 1993). A inervação simpática destinada aos rins afeta diretamente túbulos, vasos renais e células justaglomerulares, podendo influenciar as ações de cada uma destas unidades efetoras (DiBona, 2000). Aumentos de RSNA, podem promover redução da excreção urinária de água e sódio, por aumentar sua reabsorção tubular nos néfrons, redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular por induzir a constrição da vasculatura renal, e aumento da atividade do SRA, por estimular a secreção de renina pelas células justaglomerulares (DiBona, 2000).

Dessa forma, o PVN constitui um sítio integrativo capaz de influenciar cada um dos três principais sistemas envolvidos na regulação da PA, do controle renal dos fluidos corporais e do balanço hidro-eletrolítico: o sistema nervoso simpático (SNS), o sistema renina angiotensina (SRA) e o sistema vasopressinérgico (Blair e cols., 1996; Toney e cols., 2003).

A microinjeção de A-779, após a infusão de SHT, induziu uma queda acentuada de PA nos animais SHT 2,5M, comparada aos grupos SHT 1M e SIT. Esta queda de PA foi acompanhada por uma redução acentuada de RSNA, mesmo após a diminuição ocorrida durante a infusão de SHT 2,5M. Vale ressaltar, que a queda de PA reduziu os níveis desta variável para abaixo dos valores basais, anteriores ao início do estímulo osmótico.

O bloqueio da Ang II endógena no PVN, através da microinjeção de Losartan, após os animais terem sido infundidos com SHT 2,5M, promoveu apenas alterações variáveis de PA, FC e RSNA, não sendo significantes em relação ao grupo controle, microinjetado com veículo no PVN. Em conjunto, estes dados sugerem que embora a Ang-(1-7) endógena no PVN, não pareça manter os níveis basais de PA, em condições normais, exerce importante influência no aumento de PA induzido por infusão de SHT. Já a Ang II parece participar da manutenção da PA em condições normais, mas durante a hiperosmolaridade plasmática induzida por sobrecarga de sal, parece ter seu efeito atenuado.

Durante condições que promovem aumento de osmolaridade plasmática, ocorre um aumento das Ang-(1-7) e Ang II plasmáticas. A Ang-(1-7), assim como a Ang II, atua como potente antidiurético (Santos & Baracho, 1992) e participa no controle da síntese de AVP pelo PVN (Moriguchi e cols., 1994). Adicionalmente, os dois peptídeos promovem um efeito tônico simpato-excitatório para o leito renal, ao agir sobre os neurônios do PVN. Um aumento da estimulação destes neurônios acarreta aumento da RSNA, sugerindo que estas Ang podem exercer suas ações antidiuréticas periféricamente e centralmente. Entretanto o fato de o efeito do A-779 ter sido exacerbado em relação ao efeito do losartan, levanta a questão sobre se há um aumento dos dois peptídeos considerados, por que o efeito da Ang-(1-7) é tão acentuado em relação ao da Ang II.

Botelho e cols. (1994) relataram que aumentos de osmolaridade através de hemorragia ou privação de água são potente estímulos para aumento da atividade da renina plasmática, Ang I, Ang II e Ang-(1-7), provavelmente por uma maior ativação do SRA (Botelho e cols., 1994). Entretanto, infusão de solução hipertônica, induz um aumento cerca de 4 vezes maior de Ang-(1-7) com pequena ou nenhuma alteração nos níveis de Ang II (Botelho e cols., 1994). Dessa forma, é possível que a Ang-(1-7), em concentrações bem mais elevadas promova uma maior estimulação sobre os neurônios do PVN.

Outra possível explicação seria de que o efeito da Ang-(1-7) sobre os neurônios do PVN esteja sendo de alguma forma exacerbado. Lima e cols. (1999) mostraram que durante a hemorragia, o efeito pressor da Ang-(1-7) sobre os

neurônios do BRVL foi aumentado, em contraste com o efeito da Ang II que permaneceu o mesmo (Lima e cols., 1999). Não é improvável que uma resposta semelhante pudesse estar ocorrendo em nosso estudo, pela infusão de SHT.

As elevadas concentrações plasmáticas de Ang-(1-7) e de Ang II podem promover um efeito antidiurético periféricamente e centralmente. A estimulação da RSNA causada pela excitação dos neurônios do PVN promove vasoconstrição renal aumentando a reabsorção de água, mas também reabsorve o sódio (DiBona, 2002), caracterizando um efeito controverso destes peptídeos. Estudos têm demonstrado que dependendo do tipo de estímulo utilizado para induzir a hiperosmolaridade ocorre uma ativação diferenciada dos neurônios do PVN (Weiss e cols., 1996; Kantzides & Badoer, 2003; Botelho e cols., 1994; Stocker e cols., 2004). Enquanto a infusão intravenosa de salina hiperosmótica causa redução da RSNA e aumento de atividade simpática lumbar (Weiss e cols., 1996), injeções intracarótidas de SHT, manitol, sucrose ou privação de água induzem aumentos de RSNA (Chen & Toney, 2001; Stocker e cols., 2004).

Vários fatores que influenciam a atividade neuronal no PVN atuam em conjunto para determinar a extensão da participação deste núcleo no controle simpático cardiovascular durante hiperosmolaridade (Stocker e cols., 2004). Em nosso estudo e em estudos anteriores, a infusão de SHT induziu aumento de PA e inibição simpática renal, possivelmente para promover maior excreção renal de sódio (Weiss e cols., 1996; Kantzides & Badoer, 2003). Estes dados parecem estar em conflito com outros estudos que mostram que a estimulação osmótica por privação de água ou infusão de SHT central induzem efeitos opostos de RSNA (Chen & Toney, 2001; Stocker e cols., 2004). Os mecanismos de controle central são capazes de gerar respostas simpáticas variadas, e até mesmo opostas, dependendo da magnitude ou duração do estímulo (Toney e cols., 2003).

Baseado nestas observações, Toney e cols. (2003) propuseram um modelo de resposta a aumentos de osmolaridade plasmática. Neste, quando o efeito simpato-inibitório inicial, no intuito de promover natriurese é adequado, as alterações de osmolaridade são minimizadas e o SNC é protegido deste distúrbio (Toney e cols., 2003). Entretanto, quando a osmolaridade aumenta para níveis

críticos, ou permanece durante longos períodos, regiões osmossensíveis do SNC são recrutadas para produzir simpato-excitação (Toney e cols., 2003). Neste sentido, o aumento de atividade simpática, direcionada para rins e outros órgãos (Weiss e cols., 1996; Scrogin e cols., 1999), produz um elevação da atividade simpática geral, aumentando a pressão de perfusão. Conseqüentemente, a taxa de filtração glomerular aumenta, com rápida redução das concentrações de sódio em virtude da elevada reabsorção de água induzida pela AVP (Toney e cols., 2003). Assim, aumentos de osmolaridade não compensados por inibição renal contariam com um aumento de fatores antidiuréticos como AVP, Ang-(1-7) e Ang II e posteriormente, pela ação central destes em estimular o tônus simpático.

Estes dados corroboram estudos anteriores quanto à participação da Ang-(1-7), agindo sobre os neurônios do PVN, para a manutenção da PA e RSNA durante a condição de hiperosmolaridade plasmática induzida pela infusão de solução hipertônica. Além disso, a Ang-(1-7), nesta condição, passa a modular também a PA. A Ang II parece exercer efeitos de menor magnitude, de acordo com o protocolo utilizado. Conforme descrito, estes peptídeos exercem um importante papel no restabelecimento do balanço hidro-eletrolítico periféricamente e centralmente.

5.4 PARTICIPAÇÃO DO SRA CEREBRAL ESPECIFICAMENTE NO PVN PARA A MANUTENÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E ATIVIDADE SIMPÁTICA RENAL:

Os valores basais de PA dos TGR(ASrAOGEN) foram significativamente mais baixos quando comparados aos animais controle (SD), confirmando as observações de Schinke e cols. (1999) e sugerindo que os TGR, apresentam uma redução de tônus simpático para o sistema cardiovascular.

Ao realizarmos a inibição neuronal no PVN, através da microinjeção de muscimol nos TGR, observamos uma redução atenuada de PA, FC e RSNA comparado aos animais SD. Vale ressaltar que a magnitude da resposta de redução destas variáveis no grupo SD foi similar àquela observada em nossos ratos Wistar e em estudo prévio (Allen, 2002). Adicionalmente, Allen (2002) demonstrou que a redução de atividade simpática induzida pelo muscimol em ratos SHR, foi mais acentuada que nos animais controle, sugerindo que um aumento da atividade simpato-excitatória dos neurônios do PVN pode estar envolvido nos elevados níveis de PA e atividade simpática observados nesta condição (Allen, 2002). Em conjunto, estes dados sugerem que uma supressão das descargas simpáticas geradas pelo PVN, devido à redução das Ang cerebrais, pode estar envolvida na redução do tônus simpático em TGR.

O PVN constitui um dos grupos de neurônios premotores simpáticos moduladores do tônus simpático para o sistema cardiovascular (Dampney, 1994). Baseado em nossas observações anteriores, vimos que as Ang-(1-7) e Ang II desempenham importante participação de modulação simpática e de PA gerada por este núcleo. Os TGR apresentam uma redução de aproximadamente 90% dos níveis de AOGEN cerebral, enquanto que os níveis plasmáticos permanecem inalterados (Schinke e cols., 1999). Vale ressaltar que esta redução é particularmente acentuada no hipotálamo (Schinke e cols., 1999) que em condições normais apresenta as concentrações mais elevadas (Sernia e cols., 1997). Dessa forma, uma diminuição da atividade excitatória exercida pelas Ang

sobre os neurônios do PVN, poderia resultar em redução das descargas simpáticas e da PA moduladas por estes neurônios.

Várias evidências sugerem que os TGR apresentam uma redução da atividade angiotensinérgica central. Schinke e cols., (1999) observaram que a resposta de sede, induzida pela injeção intracerebroventricular de renina está acentuadamente reduzida (Schinke e cols., 1999) neste modelo. Além disso, os TGR apresentam uma síndrome como diabetes insipidus, com baixa concentração de AVP plasmática (Schinke e cols., 1999). A Ang-(1-7) é tão potente quanto a Ang II, em estimular a síntese de AVP (Moriguchi e cols., 1994) e uma redução destes peptídeos poderia ser responsável pelos baixos níveis de AVP plasmática. Adicionalmente, microinjeções de Ang II no BRVL de TGR evoca um aumento significativamente maior de PA em relação aos animais SD, sugerindo que haja maior disponibilidade dos receptores de Ang II, em virtude de uma baixa formação deste peptídeo (Baltatu e cols., 2001a). Estas observações em conjunto reforçam as evidências de que a redução simpática observada nos TGR seja consequência de uma diminuição da atividade excitatória das Ang cerebrais e especificamente destas agindo sobre os neurônios do PVN.

Entretanto, ao medirmos a RSNA basal observamos não haver diferença entre os TGR e os ratos SD. O método empregado para a comparação dos registros de RSNA entre os grupos tem sido utilizada tanto em animais (Morgan e cols., 1995; Lundin e cols., 1984; Judi e cols., 1979) quanto em humanos (Smith e cols., 2004; Fraga e cols., 2007; Ferguson e cols., 1990). Embora os valores de RSNA basais tenham sido semelhantes entre os grupos, a inibição do PVN induziu uma redução no número de spikes somente nos animais SD. A mesma metodologia realizada em um grupo separado de animais induzidos à insuficiência cardíaca (IC), mostrou que a atividade simpática basal foi maior nestes animais (sham 73 ± 3 vs IC 88 ± 2 spikes/s, dados não apresentados). Este dado está de acordo com estudos prévios, mostrando que aumento de atividade simpática é uma característica de IC (Ferguson e cols., 1990; Cohn e cols., 1984) e evidencia que o método utilizado é válido para este tipo de análise.

Entretanto, este resultado traz a questão que se fluxo simpático mediado pelo PVN está suprimido, como a RSNA basal pode ser semelhante? Baseado

em nossos dados não é possível discriminar os mecanismos responsáveis por este paradoxo. Entretanto, é possível especular que outros grupos de neurônios premotores simpáticos possam manter o fluxo simpático renal, estabilizando a RSNA para níveis basais normais, mesmo na ausência do fluxo simpático gerado pelo PVN nos TGR. Um possível candidato seria o BRVL, por ser uma região chave na manutenção da PA e tônus simpático em animais anestesiados (Dampney e cols., 2002 a,b) e acordados (Menezes & Fontes, 2007). Os neurônios do BRVL possuem atividade neuronal desencadeada por potenciais de ação regulares como sugerido inicialmente por Sun e cols. (Sun e cols., 1988a; Sun e cols., 1988b). Estas descargas neuronais são resultado de uma atividade marca-passo intrínseca e de uma rede de conexões oscilatórias (Piguet & Schlichter, 1998; Guyenet, 1990, Dampney, 1994; Guyenet e cols., 1989). Vale ressaltar que embora estes neurônios tenham sua atividade sendo modulada, constantemente, não deixam de ter atividade intrínseca. Esta atividade marca-passo é mantida mesmo na presença de antagonista de receptor glutamatérgico (Sun e cols., 1988a), de solução livre de cálcio (Lewis & Coote, 1993; Kangrga & Loewy, 1995) e somente reduzida por contínua hiperpolarização com aplicação de tetrodotoxina (Guyenet e cols., 1989). Outros neurotransmissores, além das Ang podem gerar excitabilidade neuronal no BRVL, incluindo catecolaminas (Piguet & Schlichter, 1998). Piguet & Schlichter (1998) sugerem que uma liberação endógena de catecolaminas pode ser responsável por gerar a frequência de disparos dos neurônios do BRVL (Piguet & Schlichter, 1998).

O PVN contém neurônios premotores que influenciam o atividade simpática via projeções diretas para os neurônios preganglionares simpáticos ou via sinapse com o BRVL (Dampney, 1994; Badoer, 2001; Chen & Toney, 2003). Interessantemente, a resposta de inibição do PVN esta atenuada após o bloqueio de receptores de aminoácidos excitatórios e inibitórios no BRVL, indicando que uma conexão através de núcleos medulares está envolvida neste fenômeno (Allen, 2002). Existem também evidências mostrando que pelo menos parte das aferências sinápticas excitatórias dos neurônios pressores do BRVL oriundas do PVN, são mediadas pelos receptores AT₁ (Tagawa & Dampney, 1999) e uma

deficiência desta via poderia fazer com que os neurônios do RVLM assumissem o controle em gerar descargas simpáticas para o sistema cardiovascular. Certamente, futuros experimentos serão necessários para avaliar o envolvimento de outras populações de neurônios premotores na manutenção do fluxo simpático nesta linhagem de ratos transgênicos.

Outra possibilidade é que estes animais tenham uma reatividade simpática reduzida. A administração de pequenas doses pressoras de Ang II faz com que estes animais desenvolvam uma hipertensão também atenuada (Baltatu e cols., 2000). Adicionalmente, ao serem submetidos ao estresse de contenção, os TGR apresentam um aumento de PA em menor magnitude do que os animais controle (Baltatu e cols., 2004). A atividade da renina plasmática (ARP), um indicador de reação ao estresse, é modulada por mecanismos que exigem a ativação do sistema nervoso simpático. Os TGR apresentaram somente 50% dos valores apresentados pelos animais SD após indução de estresse (Baltatu e cols., 2004).

Estes dados em conjunto sugerem que os TGR apresentam menor reatividade ao estresse, uma resposta dependente de ativação simpática. Dessa forma, podemos especular que embora a RSNA basal seja similar entre os animais SD e TGR, a reatividade às alterações dos níveis de atividade simpática está reduzida. Embora os neurônios do BRVL ou de outra região, consigam manter níveis simpáticos basais normais, provavelmente, já estejam no seu limiar de geração de descargas simpáticas. E não havendo outras regiões como o PVN para proporcionar oscilações simpáticas de maior variabilidade, a reatividade simpática fica reduzida.

Em conclusão, os resultados de nosso estudo nos TGR baixos níveis de AOGEN cerebral indicam que a contribuição do PVN para a atividade simpática renal está reduzida neste modelo. Possivelmente, esta redução seja devido à diminuição de estímulos excitatórios resultado de uma provável redução da produção local das Ang-(1-7) e Ang II nesta linhagem de ratos. Finalmente, nossos achados reforçam a necessidade de melhor investigação sobre a contribuição das angiotensinas no PVN durante condições fisiológicas alteradas, como hipertensão e IC crônica.

5.5 CONCLUSÃO:

Os resultados observados neste estudo, mostram pela primeira vez um papel funcional para a Ang-(1-7) endógena na modulação tônica simpática e cardiovascular exercida pelos neurônios do PVN. Além disso, confirmam e estendem estudos anteriores por mostrar que a Ang II também participa da modulação de PA e do tônus simpático, através dos receptores AT₁ e AT₂, respectivamente no PVN. Nossos dados nos TGR(ASrAOGEN) corroboram com o conhecimento sobre a significância funcional da produção de Ang cerebrais na regulação central do tônus simpático para o sistema cardiovascular.

A Figura 35 sumariza as principais observações feitas neste estudo. Baseado em nossos resultados e em conjunto com estudos prévios, podemos sugerir que o AOGEN, produzido principalmente pelos astrócitos (Stornetta e cols., 1988) viabilizaria a produção das Ang-(1-7) e Ang II cerebrais (Figura 35.A). Estas Ang, atuando através de receptores específicos (*Mas*, AT₁ e AT₂) localizados nos neurônios do PVN, promovem aumento da excitabilidade neuronal (Figura 35.B; Ambuhl e cols., 1994). As projeções enviadas pelo PVN ao BRVL e diretamente para a coluna IML, promovem estimulação simpática, contribuindo para a manutenção tônica simpática destinada ao sistema cardiovascular (Figura 35.C). Durante condições fisiológicas alteradas, a participação das Ang, particularmente da Ang-(1-7) parece ser também alterada, caracterizando-se por um aumento da estimulação sobre os neurônios do PVN, que contribui para a elevação dos níveis de PA ou hiperatividade simpática relacionados a estas condições (Figura 35.D).

Finalmente, nossos resultados demonstram estar fundamentados cientificamente, uma vez que confirmam dados descritos anteriormente, e contribuem para o avanço do conhecimento atual sobre o papel funcional exercido pelas angiotensinas em nível central, atuando especificamente sobre os neurônios do PVN, para a manutenção da atividade simpática e da PA.

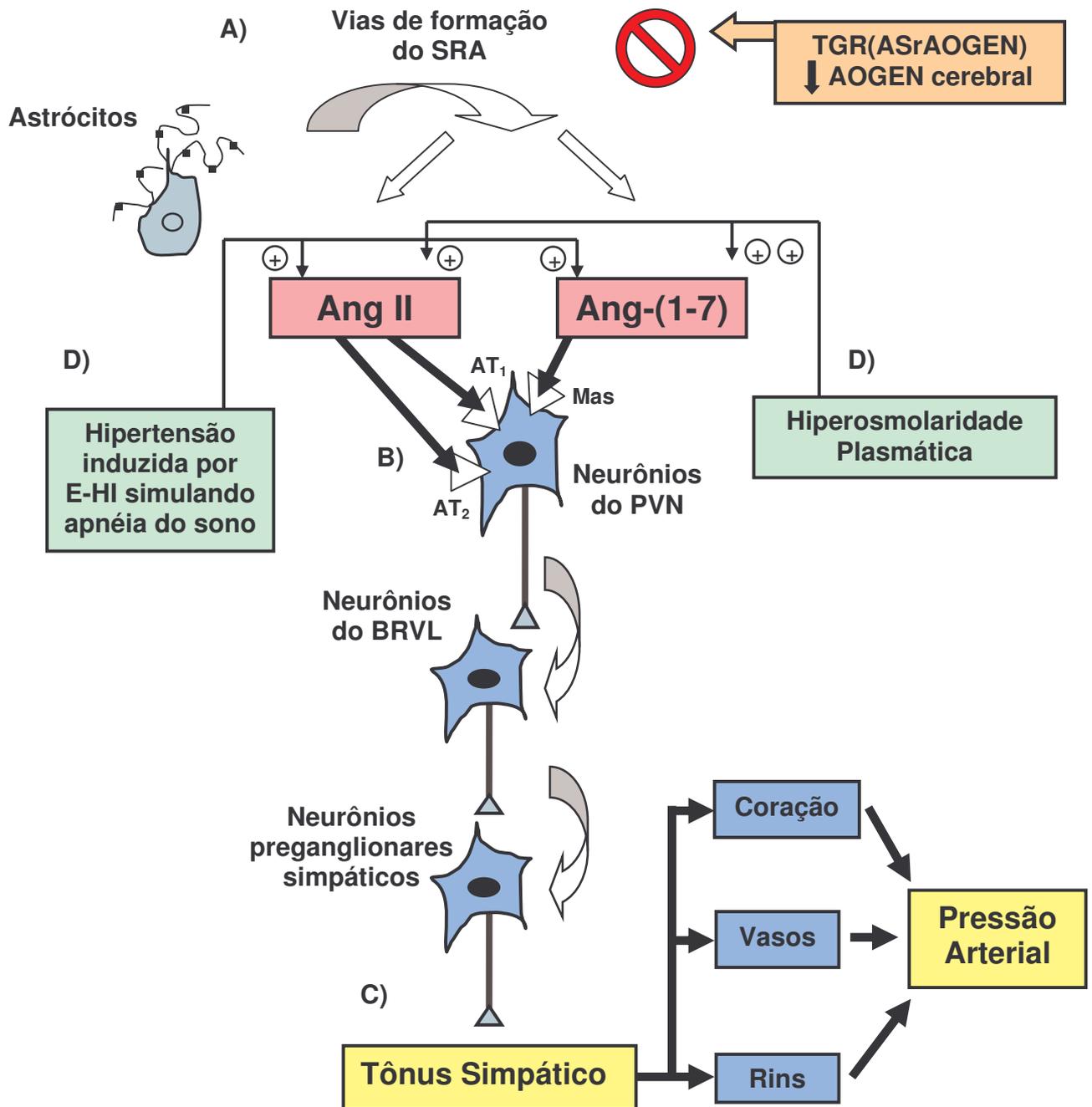


Figura 35. Esquema representando as principais observações deste estudo mostrando que a Ang-(1-7) e a Ang II, atuando sobre os neurônios do PVN, participam da modulação tônica simpática e de PA durante condições fisiológicas normais e alteradas (Ver texto). PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; BRVL, bulbo rostroventrolateral; SRA, sistema renina angiotensina; AOGEN, angiotensinogênio; E-HI, eucapnia e hipóxia intermitente; AT₁ e AT₂, subtipos de receptor para a Angiotensina II; Mas, receptor específico para a Ang-(1-7).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALLAHDADI KJ, WALKER BR, KANAGY NL. Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension*. 45:705-709, 2005.

ALLEN A M, MOELLER I, JENKINS T A, ZHUO J, ALDRED GP, CHAI SY, MENDELSON FAO. Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain Research Bulletin*. 47: 17-28, 1998.

ALLEN AM. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension*. 39: 275-280, 2002.

AMBUHL P, FELIX D, KHOSLA MC. [7-D-ALA]-angiotensin-(1-7): selective antagonism of angiotensin-(1-7) in the rat paraventricular nucleus. *Brain Research Bulletin*. 35: 289-291, 1994.

AMBÜHL P, FELIX D, IMBODEN H, KHOSLA MC, FERRARIO CM. Effects of angiotensin analogues and angiotensin receptor antagonists on paraventricular neurons. *Regulatory Peptides*. 38: 111-120, 1992.

AMENDT K, CZCHURSKI J, DEMBOWSKY K, SELLER H. Bulspinal projections to the intermediolateral cell column: a neuroanatomical study. *Journal of Autonomic Nervous System*. 1: 103-117, 1979.

ARDAILLOU R. Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. n°6, 1: 28-34, 1997.

ATLAS SA. The renin-angiotensin system revisited: classical and nonclassical pathways of angiotensin formation. *The Mount Sinai Journal of Medicine*. N° 2, 65: 87-95, 1998.

BADER M, GANTEN D. Transgenic rats: tools to study the function of the renin-angiotensin system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 3: S81-S87, 1996.

BADER M, PETERS J, BALTATU O, MULLER DN, LUFT FC, GANTEN D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *Journal of Molecular Medicine*. 79: 76-102, 2001.

BADOER E, NG CW, DE MATTEO R. Glutamatergic input to the PVN is important in renal nerve response to elevations in osmolality. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 285: F640-F650, 2003.

BADOER E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 28: 95-99, 2001.

BAINS JS & FERGUSON AV. Paraventricular nucleus neurons projecting to the spinal cord receive excitatory input from the subfornical organ. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 37: R625-R633, 1995.

BAINS JS, FERGUSON AV. Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic inputs to type I neurones of the rat paraventricular nucleus. *The Journal of Physiology (Lond)*. 499: 733-746, 1997a.

BAINS JS, FERGUSON AV. Reduced NMDA receptor sensitivity may underlie the resistance of subpopulations of PVN neurons to excitotoxicity. *Neuroreport*. 8: 2101-2105, 1997b.

BAINS JS, POTYOK A, FERGUSON AV. Angiotensin II actions in paraventricular nucleus: functional evidence for neurotransmitter role in efferents originating in subfornical organ. *Brain Research*. 599: 223-229, 1992.

BALTATU O, BADER M. Brain renin-angiotensin system. Lessons from functional genomics. *Neuroendocrinology*. 78: 253-259, 2003.

BALTATU O, CAMPOS LA, BADER M. Genetic targeting of the brain renin-angiotensin system in transgenic rats: Impact on stress-induced renin release. *Acta Physiologica Scandinavica*. 181: 579-584, 2004.

BALTATU O, FONTES MA, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, CALIGIORNE S, GANTEN D, SANTOS RA, BADER M. Alterations of the renin-angiotensin system at the RVLM of transgenic rats with low brain angiotensinogen. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 280: R428-R433, 2001.

BALTATU O, SILVA JA, GANTEN D, BADER M. The brain renin angiotensin system modulates angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 35: 409-12, 2000.

BAO G, METREVELI N, LI R, TAYLOR A, FLETCHER EC. Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: role of the sympathetic nervous system. *Journal of Applied Physiology*. 83: 95-101, 1997.

BARACHO NCV, SIMÕES-E-SILVA AC, KHOSLA MC, SANTOS RAS. Effect of selective angiotensin on the antidiuresis produced by angiotensin-(1-7) in water-loaded rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 31: 1221-1227, 1998.

BARAJAS L, LIU L, POWERS K. Anatomy of the renal innervation: intrarenal aspects and ganglia of origin. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 70: 735-749, 1992.

BECKER LK, ETELVINO GM, WALTHER T, SANTOS RA, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 293: H1416-1424, 2007.

BERQUIN P, BODINEAU L, GROS F, LARNICOL N. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. *Brain Research*. 857: 30-40, 2000.

BICKERTON RK, BUCKLEY JP. Evidence for central mechanism in angiotensin-induced hypertension. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 106: 834-836, 1961.

BLAIR ML, PIEKUT D, WANT A, OLSCHOWKA JA. Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in cardiovascular regulation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 23: 161-165, 1996.

BLOCK CH, SANTOS RAS, BROSNIHAN KB, FERRARIO CM. Immunocytochemical Localization of Angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. *Peptides*. 9: 1395-1401, 1989.

BOTELHO IMO, BLOCK CH, KHOSLA MC, SANTOS RAS. Plasma Angiotensin-(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. *Peptides*. 15(4): 723-729, 1994.

BRASKO J, KUPRYSZEWSKI G, WITCZUK B, WISNIEWSKI K. Angiotensin II-(3-8)-heptapeptide affects motor activity, performance of passive avoidance and a conditioned avoidance response in rats. *Neuroscience*. 27: 777-783, 1988.

BREDT DS, HWANG PM, SNYDER SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 347: 768-770, 1990.

BREITWIESER GE. G-protein-coupled receptor oligomerization: implications for G-protein activation and cell signalling. *Circulation Research*. 94: 17-27, 2004.

BROWN DA, HIGGINS AJ, MARSH S, SMART TG. Actions of GABA on mammalian neurones, axons, and nerve terminals. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. 29: 321-326, 1981.

BURRELL LM, JOHNSTON CI, TIKELLIS C, COOPER ME. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. N° 4, 15: 166-169, 2004.

CAMARGO LAA, SAAD WA, SIMÕES S, SANTOS TAB, SAAD WA. Interaction between paraventricular nucleus and septal area in the control of physiological responses induced by angiotensin II. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 35: 1017-1023, 2002.

CAMPBELL DJ, BOUHNICK J, MENARD J, CORVOL P. Identity of angiotensinogen precursors of rat brain and liver. *Nature*. 308: 206-208, 1984.

CATO MJ & TONEY GM. Angiotensin II excites paraventricular nucleus neurons that innervate the rostral ventrolateral medulla: an in vitro patch-clamp study in brain slices. *Journal of Neurophysiology*. 93: 403-413, 2005.

CHAPPELL MC, BROSNIHAN KB, DIZ DJ, FERRARIO CM. Identification of Ang-(1-7) in the rat brain. Evidence for differential processing angiotensin peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 264: 16518-16523, 1989.

CHAPPELL MC, PIRRO NT, SYKES A, FERRARIO CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*. N°2, 31: 362-367, 1998.

CHAPPELL MC, TALLANT EA, BROSNIHAN KB, FERRARIO CM. Processing of angiotensin peptides by NG180-15 neuroblastoma X glioma hybrid cell line. *Peptides*. 22: 375-380, 1990.

CHAVES GZ, CALIGLIONE SM, SANTOS RAS, KHOSLA MC, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Modulation of the baroreflex control of heart rat by Ang-(1-7) at the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously rats. *Journal of Hypertension*. 18(2): 1841-1848, 2000.

CHEN QH, TONEY GM. AT(1)-receptor blockade in the hypothalamic PVN reduces central hyperosmolality-induced renal sympathoexcitation. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 281: R1844-1853, 2001.

CHEN QH, TONEY GM. Responses to GABA-A receptor blockade in the hypothalamic PVN are attenuated by local AT1 receptor antagonism. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 285: R1231-R1239, 2003.

COOTE JH. Cardiovascular function of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Biol Signals*. 4: 142-149, 1995.

COHN JN, LEVINE TB, OLIVARI MT, GARBERG V, LURA D, FRANCIS GS, SIMON AB, RECTOR T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *The New England Journal of Medicine*. 311: 819-23, 1984.

CRACKOWER MA. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 417: 822-828, 2002.

CUNNINGHAM ET, BOHN JR MC, SAWCHENKO PE. Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 292: 651-667, 1990.

CUNNINGHAM ET, SAWCHENKO PE. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology*. 274: 60-76, 1988.

CUTLER MJ, SWIFT NM, KELLER DM, WASMUND WL, SMITH ML. Hypoxia-mediated prolonged elevation of sympathetic nerve activity after periods of intermittent hypoxic apnea. *Journal of Applied Physiology*. 96: 754-761, 2004.

DAMPNEY RAL. Functional Organization of Central Pathways Regulation the Cardiovascular System. *Physiological Reviews*. 74(2): 323-364, 1994.

DAMPNEY RA, COLEMAN MJ, FONTES MA, HIROOKA Y, HORIUCHI J, LI YW, POLSON, J.W., POTTS PD, TAGAWA T. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 29: 261-8, 2002.

DAMPNEY RA, FONTES MA, HIROOKA Y, HORIUCHI J, POTTS PD, TAGAWA T. Role of angiotensin II receptors in the regulation of vasomotor neurons in the ventrolateral medulla. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 29: 467-472, 2002.

DAMPNEY RAL, CZACHURSKI J, DEMBOWSKI K, GOODCHILD AK, SELLER H. Afferent connections and spinal projections of the vasodepressor region in the rostral ventrolateral medulla of the cat. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 20: 73-86, 1987.

DAMPNEY RAL, HORIUCHI J, TAGAWA T, FONTES MAP, POTTS PD, POLSON JW. Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. *Acta Physiologica Scandinavica*. 177: 209-218, 2003.

DECAVEL C, VAN DEN POL AN. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology*. 302: 1019-1037, 1990.

DEDDISH PA, MARCIC B, JACKMAN HL, WANG HZ, SKIDGEL AR, ERDOS EG. N-domain specific substrate and c-domain inhibition of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension* 31: 912-917, 1998.

DEERING J, COOTE JH. Paraventricular neurones elicit a volume expansion-like change of activity in sympathetic nerves to the heart and kidney in the rabbit. *Experimental Physiology*. N° 2, 85: 177-186, 2000.

DIBONA GF, JONES SY. Sodium intake influences hemodynamic and neural responses to angiotensin receptor blockade in rostral ventrolateral medulla. *Hypertension*. 37: 1114-1123, 2001.

DIBONA GF. Differentiation of vasoactive renal sympathetic nerve fibers. *Acta Physiologica Scandinavica*. 168: 195-200, 2000b.

DIBONA GF. Functionally specific renal sympathetic nerve fibers: role in cardiovascular regulation. *American Journal of Hypertension*. 14: 163S-170S, 2001.

DIBONA GF. Nervous kidney: interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of the renal function. *Hypertension*. 36: 1083-1088, 2000a.

DIBONA GF, JONES SY. Effect of dietary sodium intake on the responses to bicuculline in the paraventricular nucleus of rats. *Hypertension*. 38: 192-197, 2001.

DIBONA GF, JONES SY. Reflex effects on components of synchronized renal sympathetic nerve activity. *American Journal of Physiology*. 275: F441-F446, 1998.

DIBONA GF, JONES SY, SAWIN LL. Reflex effects on renal nerve activity characteristics in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 30: 1089-1096, 1997.

DIBONA GF, SAWIN LL. Functional significance of the pattern of renal sympathetic nerve activation. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 277: R346-R353, 1999.

DIBONA GF, SAWIN LL. Renal hemodynamic effects of activation of specific renal sympathetic nerve fiber groups. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 276: R539-R549, 1999.

DIMICCO JA, SAMUELS BC, ZARETSKAIA MV, ZARETSKY D. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress Part renaissance, part revolution. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 71: 469-480, 2002.

DONOGHUE M, HSIEH F, BARONAS R, GODBOUT K, GOSSELIN M, STAGLIANO N, DONOVAN M, WOOLF B, ROBINSON K, JEYASEELAN R, BREITBART RE, ACTON S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Research*. 87(5): E1-E9, 2000.

DOOBAY MF, TALMAN LS, OBR TD, TIAN X, DAVISSON RL, LAZARTIGUES E. Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 292: R373-R381, 2007.

EGLI M, LAURENT JP, MOSIMANN R, FELIX D, IMBODEN H. Morphological and immunocytochemical characterization of electrophysiologically investigated neurons in the PVN of the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 95: 145-150, 2000.

EGLI M, BERGER T, IMBODEN H. Angiotensin II influences the hyperpolarization-activated current I_h in neurons of the rat paraventricular nucleus. *Neuroscience Letters*. 13: 330(1): 53-56, 2002.

ELDEFRAWI AT, ELDEFRAWI ME. Receptors for gamma-aminobutyric acid and voltage-dependent chloride channels as targets for drugs and toxicants. *FASEB J*. 1: 262-271, 1987.

EPSTEIN AN, FITZSIMONS JT, ROLLS BJ. Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. *Journal of Physiology*. 210: 457-474, 1970.

FELIX D, KHOSLA MC, BARNES KL, IMBODEN H, MONTANI B, FERRARIO CM. Neurophysiological responses to Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 17: 1111-1114, 1991.

FERGUSON AV & RENAUD LP. Systemic angiotensin acts at subfornical organ to facilitate activity of neurohypophysial neurons. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 251: R712-R717, 1986.

FERGUSON AV, BAINS JS. Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: implications for long term control of autonomic output. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 24: 96-101, 1997.

FERGUSON AV, WASHBURN DL. Angiotensin II: a peptidergic neurotransmitter in central autonomic pathways. *Progress in Neurobiology*. 54: 169-192, 1998.

FERGUSON AV, WASHBURN DLS, LATCHFORD KJ. Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. *Experimental Biology and Medicine*. 226: 85-96, 2001.

FERRARIO CM, CHAPPELL MC, TALLANT EA, BROSNIHAN KB, DIZ DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 30: 535-541, 1997.

FERRARIO CM, BROSNIHAN KB, DIZ DI, JAISWAL N, KHOSLA CM, MILSTED A, TALLANT EA. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension*. 18: 126-133, 1991.

FERRARIO CM, IYER SN. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regulatory Peptides*. 78: 13-18, 1998.

FLETCHER EC, BAO G, LI R. Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia. *Hypertension*. 34: 309-314, 1999.

FLETCHER EC, DEBEHNKE RD, LOVOI MS, GORIN AB. Undiagnosed sleep apnea in patients with essential hypertension. *Annals of Internal Medicine*. 103: 190-195, 1985.

FLETCHER EC, LESSKE J, QIAN W, MILLER CC, UNGER T. Repetitive episodic hypoxia causes diurnal elevation of systemic blood pressure in rats. *Hypertension*. 19: 555-561, 1992.

FLETCHER EC, OROLINOVA N, BADER M. Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: the renin-angiotensin system. *Journal of Applied Physiology*. 92: 627-633, 2002.

FLETCHER EC. Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *Journal of Applied Physiology*. 90: 1600-1605, 2001.

FONTES MAP, MARTINS PINGE MC, NAVES V, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, LOPES OU, KHOSLA MC, SANTOS RAS. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. *Brain Research*. 750: 305-310, 1997.

FONTES MAP, SILVA LCS, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, KHOSLA MC, GUERTZENSTEIN PG, SANTOS RAS. Evidence that Angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors. *Brain Research*. 665: 175-180, 1994.

FRAGA R, FRANCO FG, ROVEDA F, DE MATOS LN, BRAGA AM, RONDON MU, ROTTA DR, BRUM PC, BARRETTO AC, MIDDLEKAUFF HR, NEGRÃO CE. Exercise training reduces sympathetic nerve activity in heart failure patients treated with carvedilol. *European Journal of Heart Failure*. 9: 630-636, 2007.

GANONG WF. Origin of the angiotensin II secreted by cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 377: 435-440, 1994.

GANTEN D, MINNICH JL, GRANGER P. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science*. 173: 64-65, 1971.

GARCIA-ESTAN J, CARBONELL LF, GARCIA SALOM M, SALAZAR FJ, QUESADA T. Hemodynamic effects of hypertonic saline in the conscious rats. *Life Sciences*. 44: 1343-1350, 1989.

GEBBER GL. Central determinants of sympathetic nerve discharge. In: *Central Regulation of Autonomic Functions* (eds. Loewy, A.D. & Spyer, K.M.). Oxford University Press, New York, pp 126-144, 1990.

GEBBER GL. Central oscillators responsible for sympathetic nerve discharge. *American Journal of Physiology - Heart Circulatory Physiology*. 239: H143-H155, 1980.

GIRONACCI MM, VATTA M, ROGRIGUES-FERMEPÍN M, FERNÁNDEZ BE, PEÑA C. Angiotensin-(1-7) reduces release through a nitric oxide mechanism in the rat hypothalamus. *Hypertension*. 35: 1248-1252, 2000.

GRADY EF, SECHI LA, GRIFFIN CA, SCHAMBELAN M, KALINYAK JE. Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *The Journal of Clinical Investigation*. 88: 921-933, 1991.

GRISK O, DIBONA GF. Influence on arterial baroreceptors and intracerebroventricular guanabenz on synchronized renal nerve activity. *Acta Physiologica Scandinavica*. 163: 209-218, 1998.

GUYENET PG, HASELTON JR, SUN MK. Sympathoexcitatory neurons of the rostroventrolateral medulla and the origin of the sympathetic vasomotor tone. *Progress in Brain Research*. 81: 105-116, 1989.

GUYENET PG. Role of ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In *Central Regulation of Autonomic Functions*, ed. Loewy AD & Spyer KM. pp145-167. Oxford University Press, New York, 1990.

HALBACH OVB, WALTHER T, BADER M, ALBRECHT D. Interaction between Mas and the angiotensin AT₁ receptor in the amígdala. *Journal of Neuropysiology*. 83: 2012-2021, 2000.

HARDING JW, FELIX D. Angiotensin-sensitive neurons in the rat paraventricular nucleus: relative potencies of angiotensin II and angiotensin III. *Brain Research*. 410: 130-134, 1987.

HASSER EM, BISHOP VS, HAY M. Interactions between vasopressin and baroreflex control of the sympathetic nervous system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 24: 102-108, 1997.

HEDNER J, EJNELL H, SELLGREN J, HEDNER T, WALLIN G. Is high and fluctuating muscle nerve sympathetic activity in the sleep apnoea syndrome of pathogenetic importance for the development of hypertension? *Journal of Hypertension Supplement*. 6: S529-S531, 1988.

HORN T, SMITH PM, MCLAUGHLIN BE, BAUCE L, MARKS GS, PITTMAN QJ, FERGUSON AV. Nitric oxide action in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 266: R306-R313, 1994.

IOVINO M & STEARDO L. Vasopressin release to central and peripheral angiotensin II in rats with lesions of the subfornical organ. *Brain Research*. 322: 365-368, 1984.

IYER SN, CHAPPELL MC, AVERILL DB, DIZ DI, FERRARIO CM. Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan. *Hypertension*. 31(2): 699-705, 1998.

IYER SN, FERRARIO CM, CHAPPELL MC. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 31: 356-61, 1998.

JANSEN, A.S.P., NGUYEN, X.V., KARPITSKIY, V., METTENLEITER, T.C., LOEWY, A.D. Central command neurons of the sympathetic nervous system: basis of the fight-or-flight response. *Science*. 270: 644-646, 1995.

JUDY WV, WATANABE AM, MURPHY WR, APRISON BS, YU PL. Sympathetic nerve activity and blood pressure in normotensive backcross rats genetically related to the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1: 598-604, 1979.

KANAGY NL, WALKER BR, NELIN LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension*. 37: 511-515, 2001.

KANGRGA IM & LOEWY AD. Whole-cell recordings from visualized C1 adrenergic bulbospinal neurons: ionic mechanisms underlying vasomotor tone. *Brain Research*. 670: 215-232, 1995.

KANNAN H, HAYASHIDA Y, YAMASHITA H. Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 256: R1325-1330, 1989.

KANNAN H, NIIJIMA A, YAMASHITA H. Effects of stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus on blood pressure and renal sympathetic nerve activity. *Brain Research Bulletin*. 20(6): 779-783, 1988.

KANTZIDES A, BADOER E. Fos, RVLM-projecting neurons, and spinally projecting neurons in the PVN following hypertonic saline infusion. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 284: R945-R953, 2003.

KARA T, NARKIEWICZ K, SOMERS VK. Chemoreflexes--physiology and clinical implications. *Acta Physiologica Scandinavica*. 177: 377-384, 2003.

KATAFUGHI T, OOMURA Y, KUROSAWA M. Effects of chemical stimulation of paraventricular nucleus on adrenal and renal nerve activity in rats. *Neuroscience*. 86: 195-200, 1988.

KENNEY MJ, CLAASSEN DE, BISHOP MR, FELS RJ. Regulation of sympathetic nerve discharge bursting pattern during heart stress. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 275: R1992-R2001, 1998.

KENNEY MJ, WEISS ML, HAYWOOD JR. The paraventricular nucleus: an important component of the central neurocircuitry regulating sympathetic nerve outflow. *Acta Physiologica Scandinavica*. 177: 7-15, 2003.

KENNEY MJ, WEISS ML, PATEL KP, WANG Y, FELS RJ. Paraventricular nucleus bicuculline alters frequency components of sympathetic nerve discharge bursts. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 281: H1233-H1241, 2001.

KROB HA, VINSANT SL, FERRARIO CM, FRIEDMAN DP. Angiotensin-(1-7) immunoreactivity in the hypothalamus of the (mRen-2d)²⁷ transgenic rat. *Brain Research*. 798: 36-45, 1998.

KUBO T, YANAGIHARA Y, YAMAGUCHI H, FUKUMORI R. Excitatory amino acid receptors in the paraventricular hypothalamic nucleus mediate pressor response induced by carotid body chemoreceptor stimulation in rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. 19: 1117-1134, 1997.

LAHANA A, CONSTANTOPOULOS S, NAKOS G. The local component of the acute cardiovascular response to simulated apneas in brain-dead humans. *Chest*. 128: 634-639, 2005.

LARSEN PJ & MIKKELSEN JD. Functional identification of central afferent projections conveying information of acute stress to the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroscience*. 15: 2609-2627, 1995.

LEUNG KH, SMITH RD, TIMMERMANS PBM, CHIU AT. Regional distribution of the two subtypes of angiotensin II receptor in rat brain using selective nonpeptide antagonists. *Neuroscience Letters*. 123: 95-98, 1991.

LEWIS DJ & COOTE JH. The actions of 5-HT on membrane of putative sympathoexcitatory neurons in the RVLM of the adult rat in vitro. *Brain Research*. 609: 103-109, 1993.

LIMA DX, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, FONTES MAP, KHOSLA MC, SANTOS RAS. Haemorrhage increases the pressor effect of angiotensin-(1-7) but not of angiotensin II at the rostral ventrolateral medulla. *Journal of Hypertension*. 17: 1145-1152, 1999.

LI YF, PATEL KP. Effect of angiotensin (All) within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge is moderated by an NO mechanism. *FASEB J*. 15: A806 (Abstract), 2001.

LI YF, PATEL KP. Paraventricular nucleus of the hypothalamus and elevated sympathetic activity in heart failure: the altered inhibitory mechanisms. *Acta Physiologica Scandinavica*. 177: 17-26, 2003.

LI Z, FERGUSON AV. Electrophysiological properties of paraventricular magnocellular neurons in the rat brain slices: modulation of I_A by angiotensin II. *Neuroscience*. 71: 133-145, 1996.

LI Z, FERGUSON AV. Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilizes angiotensin as a neurotransmitter. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 265: R302-R309, 1993.

LIND RW, SWANSON LW, GANTEN D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. *Neuroendocrinology*. 40: 2-24, 1985.

LU XZ, SUN XY, YAO T. Inhibition of renal nerve activity induced by chemical stimulation of the paraventricular nucleus: mediation of the vasopressinergic spinally-projecting pathway. *Chinese Journal of Physiology Science*. 7: 215-221, 1991.

LUITEN PG, TER HORST GL, KARST H, STEFFENS AB. The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. *Brain Research*. 329: 374-378, 1985.

LUNDIN S, RICKSTEN SE, THOREN P. Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. *Acta Physiologica Scandinavica*. 120: 265-272, 1984.

MARTIN DS, HAYWOOD JR. Sympathetic nervous system activation by glutamate injections into the paraventricular nucleus. *Brain Research*. 577: 261-267, 1992.

MARTIN DS, SEGURA T, HAYWOOD JR. Cardiovascular responses to bicuculline in the rat paraventricular nucleus. *Hypertension*. 18: 48-55, 1991.

MATSUI H. Adrenal medullary secretion in response to diencephalic stimulation in the rat. *Neuroendocrinology*. 38: 164-168, 1984.

MCKINLEY MJ, ALBISTON AL, ALLEN AM, MATHAI ML, MAY CN, MCALLEN RM, OLDFIELD BJ, MENDELSON FAO, CHAI SY. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 35: 901-918, 2003.

MCKINLEY MJ, GERSTBERGER R, MATHAI ML, OLDFIELD BJ, SCHMID H. The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *Journal of Clinical Neuroscience*. 6: 289-301, 1999.

MENEZES RC, FONTES MA. Cardiovascular effects produced by activation of GABA receptors in the rostral ventrolateral medulla of conscious rats. *Neuroscience*. 5;144(1): 336-43, 2007.

MILSTED A, BARNA BP, RANSOHOFF RM, BROSNIHAN KB, FERRARIO CM. Astrocyte cultures derived from human brain tissue express angiotensinogen mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 87: 5720-5723, 1990.

MIYAGAWA A, OKAMURA H, IBATA Y. Coexistence of oxytocin and NADPH-diaphorase in magnocellular neurons of the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *Neuroscience Letters*. 171: 13-16, 1994.

MIYAWAKI T, MINSON J, ARNOLDA L, CHALMERS J. Role of excitatory amino acid receptors in cardiorespiratory coupling in ventrolateral medulla. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 271: R1221-R1230, 1996.

MOELLER IM, SMALL DH, REED G, HARDING JW, MENDELSON FAO, CHAI SY. Angiotensin IV inhibits neurite outgrowth in cultured embryonic chick sympathetic nervous. *Brain Research*. 725: 61-66, 1996.

MOFFET RB, BUMPUS FM, HUSAIN A. Minireview: cellular organization of the brain renin-angiotensin system. *Life Sciences*. 41: 1867-1879, 1987.

- MONTI J, SCHINKE M, BOHM M, GANTEN D, BADER M, BRICCA G. Glial angiotensinogen regulates brain angiotensin II receptors in transgenic rats TGR(ASrAOGEN). *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 280: R233-R240, 2001.
- MORGAN BJ, CRABTREE DC, PALTA M, SKATRUD JB. Combined hypoxia and hypercapnia evokes long-lasting sympathetic activation in humans. *Journal of Applied Physiology*. 79: 205-213, 1995.
- MORGAN DA, ANDERSON EA, MARK AL. Renal sympathetic nerve activity is increased in obese Zucker rats. *Hypertension*. 25: 834-838, 1995a.
- MORIGUCHI A, FERRARIO CM, BROSNIHAN KB, GANTEN D, MORRIS M. Differential regulation of central vasopressin in transgenic rats harboring the mouse *Ren – 2* gene. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 267: R786-R791, 1994.
- NARKIEWICZ K, MONTANO N, COGLIATI C, VAN DE BORNE PJ, DYKEN ME, SOMERS VK. Altered cardiovascular variability in obstructive sleep apnea. *Circulation*. 98: 1071-1077, 1998a.
- NARKIEWICZ K, PESEK CA, KATO M, PHILLIPS BG, DAVISON DE, SOMERS VK. Baroreflex control of sympathetic nerve activity and heart rate in obstructive sleep apnea. *Hypertension*. 32: 1039-1043, 1998b.
- NARKIEWICZ K, SOMERS VK. Sympathetic nerve activity in obstructive sleep apnoea. *Acta Physiologica Scandinavica*. 177: 385-390, 2003.
- NAVERI L, STROMBERG C, SAAVEDRA JM. Angiotensin IV reverses the acute cerebral blood flow reduction after experimental subarachnoid hemorrhage in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 14: 1096-1099, 1994.
- NEVES LAA, ALMEIDA AP, KHOSLA MC, SANTOS RAS. Metabolism of angiotensin I in isolated rat hearts. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Biochemical Pharmacology*. N° 9, 50: 1451-1459, 1995.
- NIETO FJ, YOUNG TB, LIND BK, SHAHAR E, SAMET JM, REDLINE S, D'AGOSTINO RB, NEWMAN AB, LEBOWITZ MD, PICKERING TG. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea and hypertension in a large community-based study. *Sleep Heart Health Study. JAMA*. 283: 1829-1836, 2000.

NILSSON H, LJUNG B, SJOBLUM N, WALLIN BG. The influence of sympathetic impulse pattern on contractile responses of rat mesenteric arteries and veins. *Acta Physiologica Scandinavica*. 123: 303-309, 1985.

NOVELLIS V, STOTZ-POTTER EH, MORIN SM, ROSSI F, DIMICCO JA. Hypothalamic sites mediating cardiovascular effects of microinjected bicuculline and EAAs in rats. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 269: R131-R140, 1995.

OHKUBO H, NAKAYAMA K, TANAKA T, NAKANISHI S. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *Journal of Biological Chemistry*. 261: 319-323, 1986.

OLDFIELD BJ, BADOER E, HARDS DK & MCKINLEY MJ. Fos production in retrogradely labeled neurons of the lamina terminalis following intravenous infusion of either hypertonic saline or angiotensin II. *Neuroscience*. 60: 255-262, 1994.

OLDFIELD BJ, DAVERN PJ, GILES ME, ALLEN AM, BADOER E, MCKINLEY MJ. Efferent neural projections of the angiotensin receptors (AT₁) expressing neurones in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Journal of Neuroendocrinology*. 13: 139-146, 2001.

OLIVAN MV, BONAGAMBA LG, MACHADO BH. Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Brain Research*. 895: 167-172, 2001.

PAXINOS G, WATSON C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York, NY: Academic Press Inc; 1986.

PEACH M. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. *Physiological Reviews*. 57: 313-370, 1977.

PEPPARD PE, YOUNG T, PALTA M, SKATRUD J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 342: 1378-1384, 2000.

PERNOW J, SCHWIELER J, KAHAN T, HJEMDAHL P, OBERLE J, GUNNAR WALLIN B, LUNDBERG JM. Influence of sympathetic discharge pattern on norepinephrine and neuropeptide Y release. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 257: H866-H872, 1989.

PESKIND ER, RADANT A, DOBIE DJ, HUGHES J, WILKINSON CW, SIKKEMA C, VEITH RC, DORSA MD, RASKIND MA. Hypertonic saline infusion increases plasma norepinephrine concentrations in normal men. *Psychoneuroendocrinology*. 18: 103-113, 1993.

PFISTER, J., SPENGLER, C., GROUZMANN, E., RAIZADA, M.K., FELIX, D., IMBODEN, H. Intracellular staining of angiotensin receptors in the PVN and SON of the rat. *Brain Research*. 754: 307-310, 1997.

PIGUET P, SCHLICHTER R. Lability of the pacemaker activity in the rat rostro-ventrolateral medulla: effects of noradrenaline. *Brain Research*. 15;796(1-2): 1-12, 1998.

PINHEIRO SV, SIMÕES E SILVA AC, SAMPAIO WO, DE PAULA RD, MENDES EP, BONTEMPO ED, PESQUERO JB, WALTHER T, ALENINA N, BADER M, BLEICH M, SANTOS RA. Nonpeptide AVE 0991 is angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension*. 44: 490-496, 2004.

PRABHAKAR NR, DICK TE, NANDURI J, KUMAR GK. Systemic, cellular and molecular analysis of chemoreflex-mediated sympathoexcitation by chronic intermittent hypoxia. *Experimental Physiology*. 92: 39-44, 2007.

PRABHAKAR NR, PENG YJ, JACONO FJ, KUMAR GK, DICK TE. Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 32: 447-449, 2005.

PRADO MH, CAMARGO GMPA, RENZI A, SAAD WA, LUIZ AC, QUEIRÓZ RC, CAMARGO LAA. Paraventricular nucleus administration of DuP753 or PD123319 inhibits the effects of angiotensin on water and sodium intake. *Brazilian Journal and Biological Research*. 29: 1499-1502, 1996.

PRINTZ MP. Regulation of the brain angiotensin system: a thesis of multicellular involvement. *Clinical and Experimental Hypertension*. A10: 17-35, 1988.

RENAUD LP. Hypothalamic magnocellular neurosecretory neurons: intrinsic membrane properties and synaptic connections. *Progress in Brain Research*. 100: 133-137, 1994.

ROSS CA, RUGGIERO DA, JOH TH, PARK DH, REIS DJ. Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline neurons. *The Journal of Comparative Neurology*. 288: 168-185, 1984.

SAAD WA, CAMARGO LAA. Influence of angiotensin II receptor subtypes of the paraventricular nucleus on the physiological responses induced by angiotensin II injection into the medial septal area. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. n°4, 80: 401-405, 2003.

SANCHEZ, F., ALONSO, J.R., AREVALO, R., BLANCO, E., AIJON, J., VANZQUEZ, R. Coexistence of oxytocin and NADPH-diaphorase with vasopressin and oxytocin in the hypothalamic magnocellular neurosecretory nuclei of the rat. *Cell and Tissue Research*. 276: 31-34, 1994.

SANTOS R.A.S., BARACHO N.C.V. Angiotensin-(1-7) is a potent antidiuretic peptide in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 25: 651-654, 1992.

SANTOS RA, SIMOES E SILVA AC, MARIC C, SILVA DM, MACHADO RP, DE BUHR I, HERINGER-WALTHER S, PINHEIRO SV, LOPES MT, BADER M, MENDES EP, LEMOS VS, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, SCHULTHEISS HP, SPETH R, WALTHER T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 100: 8258-8263, 2003.

SANTOS RAS, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 27: 1033-1047, 1994.

SANTOS RAS, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, ANDRADE SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides*. 91: 45-62, 2000b.

SANTOS RA, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, BARACHO NC, FONTES MA, SILVA LC, NEVES LA, OLIVEIRA DR, CALIGIORNE SM, RODRIGUES AR, GROPEN JÚNIOR C, E COLS. 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*. 35(4): 293-298, 1994.

SANTOS RAS, FAGUNDES-MOURA CR, SIMÕES E SILVA AC. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 3: 227-236, 2000a.

SANTOS RAS, SAMPAIO WO. Sistema renina-angiotensina-Aspectos fisiológicos. *Hipertensão*. 5(2): 47-51, 2002.

SAWCHENKO PE, SWANSON LW. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 205: 260-272, 1982.

SCHIAVONE MT, SANTOS RAS, BROSNIHAN B, KHOSLA MC, FERRARIO CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo – neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 85: 4095-4098, 1988.

SCHINKE M, BALATU O, BÖHM M, PETERS J, RASCHER W, BRICCA G, LIPPOLDT A, GANTEN D, BADER M. Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 96: 3975-3980, 1999.

SCHRAMM LP, STRACK AM, PLATT KB, LOEWY AD. Peripheral and central pathways regulating the kidney: a study using pseudorabies virus. *Brain Research*. 616: 251-262, 1993.

SCHUMAN EM, MADISON DV. Nitric Oxide and synaptic function. *Annual Reviews in Neuroscience*. 17: 153-183, 1994.

SCROGIN KE, GRYGIELKO ET, BROOKS VL. Osmolality: a physiological long-term regulator of lumbar sympathetic nerve activity and arterial pressure. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 276: R1579-R1586, 1999.

SERNIA C, MOWCHANUK MD. Brain angiotensinogen: in vitro synthesis and chromatographic characterization. *Brain Research*. 259: 275-283, 1983.

SERNIA C, ZENG T, KERR D E WYSE B. Novel perspectives on pituitary and brain angiotensinogen. *Front Endocrinology*. 18: 174-208, 1997.

SERNIA C. Location and secretion of brain angiotensinogen. *Regulatory Peptides*. 57: 1-18, 1995.

SILVA LCS, FONTES MAP, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, KHOSLA MC, CAMPOS Jr RR, GUERTZENSTEIN PG, SANTOS RAS. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. *Brain Research*. 613: 321-325, 1993.

SMITH ML, NIEDERMAIER ON, HARDY SM, DECKER MJ, STROHL KP. Role of hypoxemia in sleep apnea-induced sympathoexcitation. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 56: 184-190, 1996.

SMITH PA, GRAHAM LN, MACKINTOSH AF, STOKER JB, MARY DA. Relationship between central sympathetic activity and stages of human hypertension. *American Journal of Hypertension*. 17: 217-222, 2004.

STERN JE, LI Y, ZHANG W. Nitric oxide: a local signalling molecule controlling the activity of pre-autonomic neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Acta Physiologica Scandinavica*. 177: 37-42, 2003.

STOCKER SD, CUNNINGHAM JT, TONEY GM. Water deprivation increases Fos immunoreactivity in PVN autonomic neurons with projections to the spinal cord and rostral ventrolateral medulla. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 287: R1172-R1183, 2004.

STOCKER SD, HUNWICK KJ, TONEY GM. Hypothalamic paraventricular nucleus differentially supports lumbar and renal sympathetic outflow in water-deprived rats. *The Journal of Physiology*. 563: 249-263, 2005.

STOCKER SD, KEITH KJ, TONEY GM. Acute inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus decreases renal sympathetic nerve activity and arterial blood pressure in water-deprived rats. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 286: R719-R725, 2004.

STOLL M, UNGER T. Angiotensin and its AT₂ receptor: new insights into an old system. *Regulatory Peptides*. 99: 175-182, 2001.

STORNETTA RL, HAWELU-JOHNSON CL, GUYENET PG, LYNCH KR. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science*. 242: 1444-1446, 1988.

STRACK AM, SAWYER WB, HUGHES JH, PLATT KB, LOEWY AD. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by a transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Research*. 491: 156-162, 1989.

SUN MK, HACKETT JTE GUYENET PG. Sympathoexcitatory neurons of rostral ventrolateral medulla exhibit pacemaker properties in presence of a glutamate receptor antagonist. *Brain Research*. 438: 23-40, 1988a.

SUN MK, YOUNG BS, HACKETT JT E GUYENET PG. Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostral ventrolateral medulla with putative sympathoexcitatory function: an intracellular study in vitro. *Brain Research*. 442: 229-239, 1988b.

SWANSON LW, MCKELLAR S. The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *The Journal of Comparative Neurology*. 188: 87-106, 1979.

SWANSON LW, SAWCHENKO PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annual Review of Neuroscience*. 6: 269-324, 1983.

SWANSON LW, SAWCHENKO PE. Paraventricular nucleus: a site for integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology*. 31: 410-417, 1980.

TAGAWA T, HORIUCHI J, POTTS PD, DAMPNEY RAL. Sympathoinhibition after angiotensin receptor blockade in the rostral ventrolateral medulla is independent of glutamate and γ -aminobutyric acid receptors. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 77: 21-30, 1999.

TAGAWA T, DAMPNEY RAL. AT₁ receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medullary pressor neurons from hypothalamus. *Hypertension*. 34: 1301-1307, 1999.

TAYLOR RB & WEAVER LC. Spinal stimulation to locate preganglionic neurons controlling the kidney, spleen or intestine. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 263: H1026-H1033, 1992.

TIMMERMANS PB, WONG PC, CHIU AT, HERBLIN WF, BENFIELD P, CARINI DJ, LEE RJ, WEXLER RR, SAYE JA, SMITH RD. Angiotensin II receptors and Angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*. 45(2): 205-251, 1993.

- TIPNIS SR, HOOPER NM, HYDE R, KARRAN E, CHRISTIE G, TURNER AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*. 275(43): 33238-33243, 2000.
- TONEY GM, CHEN QH, CATO MJ, STOCKER SD. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiologica Scandinavica*. 17: 43-55, 2003.
- TRASHER TN. Osmoreceptor mediation of thirsty and vasopressin secretion in the dog. *Federation Proceedings*. 41: 2528-2532, 1982.
- TSUTSUMI K, SAAVEDRA JM. Quantitative autoradiography reveals different angiotensin II receptor subtypes in selected rat brain nuclei. *Journal of Neurochemistry*. 56: 348-351, 1991.
- UNGER T, BADOER E, GANTEN D, LANG RE, RETTIG R. Brain angiotensin pathways and pharmacology. *Circulation*. 77: 144-154, 1988.
- USHIGOME A, JUNICHI T, KARIYA K, NOMURA M. Paraventricular noradrenergic systems participate in angiotensin II-induced drinking. *Peptides*. 23: 2169-2175, 2002.
- VINCENT SR, KIMURA H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*. 46: 755-784, 1992.
- VISWANATHAN M, TSUTSUMI K, CORTREA FMA, SAAVEDRA JM. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 179: 1361-1367, 1991.
- WEISS ML, CLAASSEN DE, HIRAI T, KENNEY MJ. Nonuniform sympathetic nerve responses to intravenous hypertonic saline infusion. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 57: 109-115, 1996.
- WEISS JW, LIU MD, HUANG J. Physiological basis for a causal relationship of obstructive sleep apnoea to hypertension. *Experimental Physiology*. 92: 21-26, 2007.
- WELCHES WR, SANTOS RAS, CHAPPELL MC, BROSNIHAN KB, GREENE I, FERRARIO CM. Prolyl endopeptidase participates in the processing brain angiotensin. *Journal of Hypertension*. 9: 631-638, 1991.

WOLK R, SHAMSUZZAMAN ASM, SOMERS VK. Obesity, sleep apnea and hypertension. *Hypertension*. 42: 1067-1074, 2003.

WRIGHT JW, HARDING JW. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 18: 21-53, 1994.

WRIGHT JW, HARDING JW. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Research Reviews*. 17: 227-262, 1992.

WRIGHT JW, KREBS LT, STOBBS JW, HARDING JW. The angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinology*. 16: 23-52, 1995.

XIE A, SKATRUD JB, PULEO DS, MORGAN BJ. Exposure to hypoxia produces long-lasting sympathetic activation in humans. *Journal of Applied Physiology*. 91: 1555- 1562, 2001.

YANG G, GRAY TS, SIGMUND CD, SACCELL MD. The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system. *Brain Research*. 817: 123-131, 1999.

YOUNG T, PALTA M, DEMPSEY J, SKATRUD J, WEBER S, BADR S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *The New England Journal of Medicine*. 328: 1230-1235, 1993.

ZHANG K, LI Y, PATEL KP. Reduced endogenous GABA-mediated inhibition in the PVN on renal nerve discharge in rats with heart failure. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 282: R1006-R1015, 2002.

ZHANG K, LI YF, PATEL KP. Blunted nitric oxide-mediated inhibition of renal neural discharge within PVN of rats with heart failure. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 281: H995-H1004, 2001.

ZHANG K, MAYHAN WG, PATEL KP. Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 273: R864-872, 1997.

ZHANG K, PATEL KP. Effect of nitric oxide within paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 275: R728-R734, 1998.

ZHANG ZH, FRANCIS J, WEISS RM, FELDER RB. The renin-angiotensin-aldosterone system excites hypothalamic paraventricular nucleus neurons in heart failure. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 283: H423-H433, 2002.

ZHU GQ, PATEL KP, ZUCKER IH, WANG W. Microinjection of ANG II into paraventricular nucleus enhances cardiac sympathetic afferent reflex in rats. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 282: H2039-2045, 2002.

ZHU M, GELBAND CH, POSNER P, SUMNERS C. Angiotensin II decreases neuronal delayed rectifier potassium current: role of calcium / calmodulin – dependent protein kinase II. *Neurophysiology*. 82: 1560-1568, 1999.

ZOCCAL DB, BONAGAMBA LG, OLIVEIRA FR, ANTUNES-RODRIGUES J, MACHADO BH. Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Experimental Physiology*. 92: 79-85, 2007.

ZUCKER IH, SCHULTZ HD, LI YF, WANG Y, WANG W, PATEL KP. The origin of sympathetic outflow in heart failure: the roles of angiotensin II and nitric oxide. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 84: 217-232, 2004.

ZUCKER IH. Brain angiotensin II: new insights into its role in sympathetic regulation. *Circulation Research*. 90: 503-505, 2002.

8. ANEXOS:

8.1 TABELAS DE VALORES BASAIS:

8.1.1 EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE ANGIOTENSINAS NO PVN SOBRE O TÔNUS SIMPÁTICO E A PRESSÃO ARTERIAL.

A Tabela 02 apresenta a média dos valores basais de Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) coletados aproximadamente 5 minutos antes da microinjeção de veículo salina (100nl), Ang-(1-7) (25pmol / 100nl) e Ang II (25pmol / 100nl) no PVN. Os valores basais de PAM e FC dos grupos que receberam as microinjeções de angiotensinas não foram estatisticamente diferentes do grupo controle.

TABELA 02. *Valores basais de Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) antes da microinjeção de veículo e Angiotensinas no PVN.*

Grupo Experimental	<i>n</i>	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Salina (100 nl)	5	91 ± 6	347 ± 12
Ang-(1-7) (25 pmol)	6	80 ± 4	350 ± 10
Ang II (25 pmol)	4	97 ± 5	369 ± 11

Valores expressos como média ± EPM.

8.1.2 EFEITOS DO BLOQUEIO DAS ANGIOTENSINAS ENDÓGENAS NO PVN SOBRE O TÔNUS SIMPÁTICO E A PRESSÃO ARTERIAL.

A Tabela 03 apresenta as médias dos valores basais de PAM e FC coletados entre os 5 minutos anteriores à microinjeção de veículo salina, A-779 (0,1nmol/100nl) e do agonista de receptor GABA_A, muscimol (1nmol/100nl) no PVN. Não houve diferença nas médias dos valores basais entre os diferentes grupos experimentais avaliados.

TABELA 03 *Valores basais de Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) antes da microinjeção de veículo salina, A-779 e muscimol.*

Grupo Experimental	<i>n</i>	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Salina (100 nl)	5	91 ± 6	347 ± 12
A -779 (0,1 nmol)	5	96 ± 4	357 ± 9
Muscimol (1 nmol)	5	90 ± 7	356 ± 17

Valores expressos como média ± EPM.

A Tabela 04 mostra as médias dos valores basais de PAM e FC coletados aproximadamente aos 5 minutos antes da microinjeção de salina, A-779, Losartan, CV11974 e PD123319 no PVN. O grupo em que foi administrado o CV11974 apresentou valores basais de FC estatisticamente significantes quando comparados aos valores daqueles que receberam as microinjeções de A-779 e Losartan. Não foram observadas diferenças nas médias dos valores basais de PAM e FC entre os demais grupos.

TABELA 04 Valores basais de Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) antes da microinjeção de veículo salina e dos antagonistas angiotensinérgicos A-779, Losartan, CV11974 e PD123319 no PVN.

Grupo Experimental	<i>n</i>	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Salina (100 nl)	5	91 ± 6	347 ± 12
A -779 (1 nmol)	6	87 ± 4	323 ± 14
Losartan (1 nmol)	6	86 ± 7	335 ± 11
CV11974 (1 nmol)	6	80 ± 5	363 ± 4*#
PD123319 (1 nmol)	6	89 ± 2	349 ± 7

Valores expressos como média ± EPM. * $P < 0.05$ comparado à média dos valores basais de A-779; # $P < 0.05$ comparado à média dos valores basais de Losartan. (Teste *t student* não pareado).

8.1.3 EFEITOS DO BLOQUEIO DAS ANGIOTENSINAS ENDÓGENAS NO PVN SOBRE O TÔNUS SIMPÁTICO E PRESSÃO ARTERIAL, DURANTE A HIPERTENSÃO INDUZIDA POR EUCAPNIA E HIPÓXIA INTERMITENTE.

Esta fase de experimentos teve por objetivo avaliar a participação das angiotensinas endógenas no PVN mediando a hipertensão induzida por hipóxia e hipercapnia simulando a apnéia do sono. A Tabela 05 apresenta os valores basais de PAM e FC dos animais submetidos a este protocolo.

Tabela 05. *Valores basais de pressão arterial média (PAM e frequência cardíaca (FC) dos antes da exposição a E-HI ou sham.*

Grupo Experimental	n	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Sham Salina (100nL)	4	111 ± 4	400 ± 11
E-HI Salina (100nL)	5	113 ± 4	415 ± 4
Sham A-779 (2nmol/h)	6	116 ± 1	408 ± 10
E-HI A-779 (2nmol/h)	6	118 ± 2	419 ± 12
Sham Losartan (2nmol/h)	4	113 ± 4	431 ± 16
E-HI Losartan (2nmol/h)	5	115 ± 3	437 ± 8
Sham ZD7155 (0.2nmol/h)	5	112 ± 4	427 ± 7
E-HI ZD7155 (0.2nmol/h)	6	114 ± 3	423 ± 3
Sham PD123319 (2nmol/h)	6	106 ± 4	428 ± 6
E-HI PD123319 (2nmol/h)	5	113 ± 4	428 ± 9
Sham Muscimol (20 pmol/h)	6	114 ± 2	407 ± 9
E-HI Muscimol (20 pmol/h)	5	113 ± 3	433 ± 7

Valores expressos como média ± EPM.

8.1.4 EFEITOS DO BLOQUEIO ENDÓGENO DAS ANGIOTENSINAS NO PVN SOBRE A MANUTENÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO E DA PRESSÃO ARTERIAL DURANTE HIPEROSMOLARIDADE PLASMÁTICA:

A Tabela 06 apresenta os valores basais de PAM e FC antes e após a infusão de salina hipertônica (2.5M e 1M) ou isotônica (0.15M) para todos os grupos de animais submetidos a este protocolo.

Tabela 06. *Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes da infusão de salina hipertônica (1M ou 2.5) ou isotônica (0.15M).*

Grupo Experimental	<i>n</i>	PAM (mmHg)	FC (bpm)
SIT 0.15M A-779 (1nmol)	4	84 ± 5	376 ± 23
SHT 1M A-779 (1 nmol)	5	98 ± 5	364 ± 7
SHT 2.5M A-779 (1 nmol)	6	89 ± 6	358 ± 8
SHT 2.5M Salina (100 nl)	5	88 ± 8	357 ± 18
SHT 2.5M Losartan (1nmol)	6	85 ± 7	342 ± 13

Valores expressos como média ± EPM.