

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

**CURSO TEMPORAL DA HIPERTENSÃO  
INDUZIDA PELO BLOQUEIO DA SÍNTESE  
DO ÓXIDO NÍTRICO: AVALIAÇÕES  
HEMODINÂMICAS E BIOQUÍMICAS**

*Katya Vianna Rigatto*

**Orientação: Dra. Maria Cláudia Irigoyen**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia

Porto Alegre  
2002

**“Imita no sofrimento as árvores que padecem,  
quando feridas podadas, com mais vigor reflorescem”**

Ao meu marido e filhos por me ensinarem a amar...

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora *Profa Dra. Maria Claudia Irigoyen*, pela orientação e pelo exemplo como pesquisadora. Pela sua serenidade e atenção que propiciou a oportunidade deste aprendizado.

À *Tânia Regina Gatteli Fernandes* pelo auxílio na execução dos experimentos e pela sua grande amizade.

Aos amigos *Rogério Isquierdo, Camila Finger e Cristina Campos* pela dedicação com que sempre auxiliaram na execução dos experimentos.

À todos os colegas e amigos do curso de Pós-Graduação em Fisiologia da UFRGS, pelo incentivo silencioso.

Àos amigos do *Laboratório de Hipertensão Experimental da Unidade de Hipertensão – InCor* pela fundamental contribuição, sem a qual esta Tese não teria sido possível.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	V
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVIII
1. INTRODUÇÃO.....	02
1.1 Hipertensão.....	02
1.2 Endotélio.....	03
1.3 Óxido nítrico.....	07
1.4 Controle reflexo da pressão arterial.....	10
1.4.1 Pressorreceptores.....	10
1.4.2 Cardiopulmonares.....	12
1.4.3 Quimiorreceptores.....	13
1.5 Espécies Ativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo.....	15
1.6 Hipertrofia cardíaca.....	17
1.7 Sistema renina angiotensina.....	18
1.7.1 Sistema Renina-Angiotensina Local.....	20
1.8 Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA).....	21
2. HIPÓTESE.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 ANIMAIS.....	28

4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	28
4.2.1	Grupo Controle Normotenso .....	28
4.2.2	Grupos Tratados Hipertensos.....	28
4.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	29
4.3.1	Indução da Hipertensão.....	29
4.3.2	Procedimento Cirúrgico.....	29
4.3.3	Registro de Pressão Arterial.....	30
4.3.4	Coleta de Sangue.....	30
4.3.5	Peso do coração e peso corporal.....	31
4.4	AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE REFLEXA.....	31
4.4.1	Pressorreceptora.....	31
4.4.2	Cardiopulmonar.....	34
4.4.2.1	Bloqueio farmacológico.....	35
4.4.3	Quimiorreceptora.....	35
4.5	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	36
4.5.1	Morte dos animais e preparo do material de estudo.....	36
4.5.2	Dosagem de Proteínas e da Concentração de Hemoglobina.....	37
4.5.3	Medida de Lipoperoxidação (LPO).....	37
4.5.3.1	Quimiluminescência Iniciada por t-BOOH (QL).....	37
4.5.4	Enzimas antioxidantes.....	38
4.5.4.1	Catalase (CAT).....	38
4.5.4.2	Superóxido Dismutase (SOD).....	39
4.5.4.3	Glutathiona Peroxidase (GPx).....	40
4.5.5	Determinação da Atividade da Renina Plasmática.....	42

4.5.6 Dosagem da atividade da ECA.....	42
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5. RESULTADOS.....	46
5.1 CONSUMO DE L-NAME.....	46
5.2 EFEITO DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL E A FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	47
5.3 EFEITO DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A RESPOSTA DA PRESSÃO ARTERIAL.....	48
5.3.1 Resposta hipotensora ao nitroprussiato de sódio.....	48
5.3.2 Resposta pressora à fenilefrina.....	48
5.4 EFEITO DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A SENSIBILIDADE DO REFLEXO PRESSORRE- CEPTOR ANALISADA PELO ÍNDICE DE SENSIBILIDADE.....	49
5.4.1 Taquicardia reflexa.....	49
5.4.2 Bradicardia reflexa.....	50
5.5 SENSIBILIDADE DO REFLEXO PRESSORRECEPTOR ANALISADA PELA CURVA SIGMÓIDE.....	51
5.5.1 Ganho médio do barorreflexo.....	51
5.5.2 Ponto de equilíbrio da curva sigmóide.....	51
5.5.3 Variações da frequência cardíaca.....	52
5.6 EFEITO DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A SENSIBILIDADE DO REFLEXO CARDIO- PULMONAR.....	53

5.6.1 Resposta hipotensora.....	53
5.6.2 Bradicardia reflexa.....	54
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PARASSIMPÁTICA SOBRE A RESPOSTA REFLEXA (HIPOTENSORA E BRADICÁRDICA) PRODUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO DOS RECEPTORES CARDIOPULMONARES COM SEROTONINA.....	55
5.7.1 Reflexo cardiopulmonar após bloqueio com atropina.....	55
5.8 EFEITO DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DO OXIDO NÍTRICO SOBRE A SENSIBILIDADE DO REFLEXO COMANDADO PELOS QUIMIORRECEPTORES.....	57
5.8.1 Resposta pressora.....	57
5.8.2 Resposta bradicárdica.....	58
5.8.3 Relação entre dose (KCN) e efeito ( $\Delta$ PAM).....	59
5.9 AVALIAÇÕES MORFOMÉTRICAS.....	60
5.9.1 Peso do coração e índice de hipertrofia.....	60
5.9.2 Peso corporal.....	62
5.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	62
5.10.1 Quimiluminescência.....	62
5.10.2 Atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos.....	63
5.10.2.1 Catalase.....	63
5.10.2.2 Superóxido dismutase.....	64
5.10.2.3 Glutathione peroxidase.....	65
5.10.3 Atividade da renina plasmática.....	66
5.10.4 Medida da atividade da ECA.....	68
5.10.4.1 Renal.....	68



5.10.4.2 Ventricular.....	69
5.10.4.3 Aórtica.....	71
5.10.4.4 Pulmonar.....	71
6. DISCUSSÃO.....	73
6.1 Pressão arterial e frequência cardíaca.....	73
6.2 Reflexo pressorreceptor.....	76
6.3 Reflexo Cardiopulmonar.....	81
6.4 Quimiorreflexo.....	85
6.5 Estresse oxidativo.....	88
6.6 Papel do sistema renina angiotensina na hipertensão pelo bloqueio da síntese de NO.....	94
6.7 Regulação da ECA durante a inibição da síntese do óxido nítrico.....	97
6.8 Considerações finais.....	98
7. SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES.....	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Substâncias vasoativas derivadas do endotélio.....	06
FIGURA 2 - Reação de síntese do NO.....	09
FIGURA 3 – Consumo de L-NAME (mg/kg/dia) dos animais tratados por uma semana, duas e quatro semanas.....	46
FIGURA 4 – Pressão arterial média (mmHg) durante registro de repouso por vinte minutos nos grupos estudados.....	47
FIGURA 5 – Resposta hipotensora (índice/inclinação da reta) pela injeção de nitroprussiato de sódio.....	49
FIGURA 6 – Resposta taquicárdica (índice médio em bpm/mmHg) decorrente da injeção de nitroprussiato de sódio.....	50
FIGURA 7 – Apresentação gráfica do ajuste logístico sigmoidal médio dos ratos tratados e controles.....	52
FIGURA 8 – Respostas hipotensoras, em mmHg, decorrentes das injeções de serotonina.....	54
FIGURA 9 – Resposta bradicárdica, em bpm, produzida pela estimulação dos receptores cardiopulmonares pela serotonina.....	55
FIGURA 10 – Resposta hipotensora (mmHg) decorrente das injeções de serotonina após bloqueio com atropina.....	56
FIGURA 11 – Resposta hipertensora, em percentagem, decorrente das injeções de cianeto de potássio (K2=100µg/kg; K3=120µg/kg; K4=140µg/kg; K5=180µg/kg).....	58
FIGURA 12 – Resposta bradicárdica, em percentagem, às injeções	

de doses crescentes de KCN (K2=100µg/kg; K3=120µg/kg; K4=140µg/kg; K5=180µg/kg).....	59
FIGURA 13 – Correlações entre as doses de KCN (K1=60µg/kg; K2=100µg/kg; K3=120µg/kg; K4=140µg/kg; K5=180µg/kg) e as variações na %PAM. Letra <b>A</b> = grupo controle ( $p < 0,05$ ); <b>B</b> = 1 semana; <b>C</b> = 2 semanas e <b>D</b> = 4 semanas de tratamento.....	60
FIGURA 14 – Correlações entre a PAM e o índice de hipertrofia cardíaca ( $p < 0,05$ ).....	61
FIGURA 15 – Quimiluminescência é apresentada em contagem por segundo por mg de proteína (cps/mg de proteína). ....	63
FIGURA 16 – Atividade da catalase apresentada em $\rho$ moles/mg de proteína.....	64
FIGURA 17 – Atividade da superóxido dismutase apresentada em U SOD/mg de proteína.....	65
FIGURA 18 – Atividade da glutathiona peroxidase expressos em $\eta$ moles/min./mg de proteína.....	66
FIGURA 19 – Atividade de renina plasmática ( $\eta$ g de Angiotensina I liberado por ml/hora).....	67
FIGURA 20 – Correlação positiva entre a atividade da renina plasmática ( $\eta$ g de Angiotensina I liberado por ml/hora) e a frequência cardíaca (bpm) ( $p < 0,05$ ).....	67
FIGURA 21 – Valores da medida da atividade da ECA no rim ( $\eta$ moles His-Leu/min./mg de proteína).....	68

FIGURA 22 – Correlação inversa entre o consumo total de L-NAME e da atividade da ECA renal ( $p < 0,05$ ).....	69
FIGURA 23 – Valores da medida da atividade da ECA no ventrículo ( $\eta$ moles His-Leu/min./mg de proteína).....	70
FIGURA 24 – Correlação positiva ( $r=0,7$ ) entre atividade da ECA no ventrículo entre pres Valores da medida da atividade da ECA no ventrículo ( $\eta$ moles His-Leu/min./mg de proteína) e a PAM (mmHg) .....	70
FIGURA 25 – Correlação positiva ( $r=0,7$ ) entre atividade da ECA na aorta ( $\eta$ moles His-Leu/min./mg de proteína) e o consumo total de L-NAME (ml) .....	71

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Sensibilidade do reflexo pressorreceptor para a frequência cardíaca avaliada a partir do ajuste de uma equação logística sigmoidal aos dados de pressão arterial média e frequência cardíaca.....	53
TABELA 2 – Percentagens das respostas pressoras resultantes das injeções de doses crescentes de cianeto de potássio.....	57
TABELA 3 – Índice de hipertrofia dos grupo controle e tratados.....	61
TABELA 4 – Peso corporal dos animais controle e tratados.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

	<b>Ang II</b>	<b>angiotensina II</b>
CAT	enzima catalese	
ECA	enzima conversora de angiotensina	
EDHF	fator hiperpolarizante derivado do endotélio	
FC	frequência cardíaca	
FE	fenilefrina	
	<b>GMPc</b>	<b>guanosina ciclase 3'5'-monofosfato</b>
GPx	enzima glutaciona peroxidase	
GSH	glutaciona reduzida	
GSSG	glutaciona oxidada	
5HT	serotonina	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio	
KCN	cianeto de potássio	
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil ester	
LPO	lipoperoxidação	
LOOH	hidroperóxidos lipídicos	
LOO <sup>-</sup>	lipoperóxidos	
MDA	malondialdeido	
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo	
NO	óxido nítrico	
NO <sub>2</sub>	dióxido de nitrogênio	
	<b>NOS</b>	<b>óxido nítrico sintase</b>
NP	nitroprussiato de sódio	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ânion superóxido	
OONO <sup>-</sup>	peróxido nitrito	

PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial média
QL	quimiluminescência Iniciada por t-BOOH
SOD	enzima superóxido dismutase
<b>SRA</b>	<b>sistema renina angiotensina</b>

## RESUMO

Neste estudo observamos os efeitos do bloqueio crônico do óxido nítrico por uma (1s), duas (2s) e quatro (4s) semanas de tratamento sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e o controle reflexo da circulação.

O bloqueio crônico do óxido nítrico pela L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), na água de beber, aumentou a pressão arterial média (PAM) em mmHg (1s=144; 2s=153 e 4s=167) de maneira tempo-dependente, quando comparado ao grupo controle (c=102). Tal aumento foi acompanhado pelo aumento de consumo de L-NAME e pelo aumento da relação peso do coração/peso corporal, um índice de hipertrofia cardíaca.

A frequência cardíaca (FC) basal não foi diferente entre os grupos tratados e o controle. O reflexo comandado pelos pressorreceptores estava atenuado significativamente (c=-4,17; 1s=-2,72; 2s=-2,10 e 4s=2,41) nos animais tratados, enquanto o reflexo cardiopulmonar estava exacerbado, de forma semelhante, em todos os grupos tratados. É possível que a atenuação do baroreflexo esteja relacionada ao aumento da sensibilidade do reflexo cardiopulmonar onde houve tanto aumento da resposta bradicárdica em bpm (c=-77; 1s=-109; 2s=-114 e 4s=-122) quanto da resposta hipotensora em mmHg (c=-14; 1s=-28; 2s=-29 e 4s=-31). A resposta hipertensora comandada pelos quimiorreceptores estava diminuída enquanto a resposta de bradicardia praticamente não se alterou. Em todos os reflexos testados a bradicardia reflexa estava normal ou aumentada. As respostas reflexas normalmente associadas à ativação do ramo simpático do sistema nervoso autônomo estavam reduzidas enquanto os quimiorreceptores e os barorreceptores foram estimulados. Já a resposta de hipotensão mediada pelos cardiopulmonares estava aumentada nos animais hipertensos. Esses dados em conjunto sugerem um aumento tônico da atividade simpática periférica reduzindo a reserva para respostas excitatórias e facilitando as respostas inibitórias.

Alterações do sistema renina angiotensina como aumento da atividade da renina plasmática nos animais tratados por duas semanas, não se correlacionaram com as alterações de PAM ou do controle reflexo da FC. A atividade da enzima de conversão da angiotensina I (ECA) se



**correlacionou positivamente com a hipertrofia cardíaca. Não foram observadas alterações da ECA pulmonar e da aorta.**

**Alterações da atividade das enzimas antioxidantes mostraram variações tempo-dependentes que culminaram, no grupo de quatro semanas, com redução do estresse oxidativo expresso pela quimiluminescência. Neste tempo de tratamento, o aumento da atividade da enzima superóxido dismutase indica um papel para o ânion superóxido na fisiopatologia desse modelo de hipertensão.**

Finalizando, o bloqueio da síntese do óxido nítrico em ratos, pela administração crônica de L-NAME durante uma, duas e quatro semanas na água de beber, induziu hipertrofia cardíaca e aumentou a PAM. Esse aumento foi maior após 4 semanas de tratamento. Entretanto, diferentemente do que esperávamos, as alterações do controle reflexo da circulação encontradas após uma semana, não foram diferentes das encontradas em 4 semanas, com exceção do quimiorreflexo, que foi menor só na segunda e quarta semanas.

## **ABSTRACT**

In this study it was observed the nitric oxide blockade effect over one (1W), two (2w) and four weeks (4w) of treatment in the blood pressure, heart rate and the reflex control of the circulation.

The chronic blockage of nitric oxide by L-nitro-arginine-methyl-ester (L-NAME) in the water, increased the mean arterial pressure (MAP/mmHg) in a time-dependent manner (1w=144; 2w=153; and 4w=167) when compared to controls (c=102). This increase came with high L-NAME intake and ratio body weight - heart weight, a cardiac hipertrophy index.

The basal heart rate was not different between treated and control groups. In treated animals, the reflex comanded by baroreceptors was significantly attenuated (c=-4,17; 1w=-2,72; 2w=-2,10 and 4w=2,41) in all treatments while the cardiopulmonary reflex was exacerbated. It is possible that the baroreflex attenuation may be related to the increased sensibility of the cardiopulmonary reflex. There was an increased bradycardia in beats per minute (c=-77; 1w=-109; 2w=-114 and 4w=-122) and hypotensive response in mmHg (c=-14; 1s=-28; 2s=-29 e 4s=-31). The hypertensive response by chemoreceptors was diminished, while the bradycardiac response remained unchanged. In all tested reflexes, the bradycardia was normal or increased. The reflex responses associated to sympathetic activation were reduced when chemoreceptors and baroreceptors were stimulated. The hypotension, produced by cardiopulmonar reflex, was augmented in hypertensive animals. These data have suggested that there is a tonic increase of periferic sympathetic activity which reduces its possible excitatory response and facilitates its inhibitories response.

The alterations in renin-angiotensin system, such as the increased renin plasmatic activity found in two weeks treated animals, were not related to MAP alterations or heart rate reflex control. The angiotensin converting enzyme (ACE) activity was not positively correlated to cardiac hypertrophy. There were no alterations in aorta and pulmonary ACE.

Alterations in the antioxidant enzyme activity showed a time-dependant variation which were higher in the group treated during four weeks. The oxidative stress measured by chemoluminescence, was also reduced in this time of treatment. Superoxide dismutase activity was higher, indicating that

superoxide anion play an important role in the physiopathology of this model of hypertension.

Finally, the nitric oxide blockage in rats by chronic L-NAME administration in the water, for one, two and four weeks, induced cardiac hypertrophy and increased in MAP. This increase was higher after four weeks of treatment. The circulation reflex control alterations found after one week, were not different from that after four weeks of treatment, except the chemoreflex which was lower only in the second and fourth weeks.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Hipertensão

As doenças cardiovasculares representam uma das mais importantes causas de morte nos países ocidentais. Aproximadamente um milhão de pessoas morrem de doenças cardiovasculares somente nos Estados Unidos. Um grande número dessas mortes anuais são devidas a infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença renal crônica. Por essas razões, é de extrema importância compreender os mecanismos envolvidos na regulação da pressão arterial e, conseqüentemente, no suprimento sangüíneo a cada órgão ou tecido.

A hipertensão arterial, influenciando uma série de doenças, permanece como uma das causas mais comuns de morbimortalidade nas sociedades desenvolvidas e em desenvolvimento; estando relacionada a mudanças morfológicas e funcionais no sistema cardiovascular e no controle autonômico em humanos e animais (Tipton 1991). Considera-se que o aumento das pressões sistólica e de pulso refletem uma redução da complacência arterial, enquanto aumento das pressões média e diastólica refletem um aumento na resistência vascular. O limite entre pressões consideradas normais e/ou anormais é difícil de definir, mas, por convenção, hipertensão sistólica supõe valores de pressão sistólica acima de 160 mmHg em pressão diastólica normal. Hipertensão diastólica está presente quando a pressão diastólica em repouso excede 90 mmHg.

Em condições normais, a pressão arterial deve ser mantida em uma estreita faixa de variação, permitindo uma adequada perfusão tecidual. A manutenção dos níveis pressóricos dentro de uma faixa de normalidade depende de variações do débito cardíaco, da resistência periférica ou de ambos. Um grande número de substâncias e de sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa, e com redundância de controle, estão envolvidos não só na manutenção, como na variação momento-a-momento da pressão arterial (PA). Esses sistemas regulam o calibre e a reatividade vascular, a distribuição de fluido dentro e fora dos vasos e o débito cardíaco nas mais diversas situações fisiológicas (Krieger et al. 1999).

Atualmente, quando se fala em fisiopatologia da hipertensão arterial, além de citar o papel do controle neural, tem-se destacado a participação do endotélio vascular, principalmente do óxido nítrico (Bohr & Dominiczak 1991, Dominiczak & Bohr 1995).

Para melhor entender o envolvimento do endotélio e do óxido nítrico nos processos hipertensivos, algumas considerações serão feitas envolvendo essas importantes participações.

## 1.2 Endotélio

As artérias são órgãos complexos cuja parede é um conjunto ativo e integrado composto por células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos, ligados uns aos outros por uma rede de interações autócrinas e

parácrinas, capazes de se adaptar a múltiplas variações hemodinâmicas e mecânicas (Gimbrone, Jr. et al. 1997). O vaso é capaz de perceber mudanças no seu interior e de se adaptar a longo prazo a determinadas condições hemodinâmicas, modificando-se por produção local de mediadores, fatores de crescimento e substâncias vasoativas, que influenciam tanto estrutura, levando a alteração celular e remodelamento de matriz, como função (Tulis et al. 1998), desencadeando um processo complexo e dinâmico denominado remodelamento vascular (Luscher and Noll 1995a).

O endotélio está estruturado como uma camada única de células disposta entre a musculatura lisa e o sangue, numa posição anatomicamente estratégica dentro da parede do vaso sangüíneo, entre o sangue circulante e o músculo liso vascular. Nesta posição, as células endoteliais são estimuladas por sinais hemodinâmicos e humorais, sendo como um efetor de respostas biológicas que podem eventualmente afetar a estrutura do vaso (Tulis et al. 1998, Luscher & Noll 1995a). Durante muitos anos, o endotélio foi considerado apenas como uma barreira física e “permeável”, protegendo as células do músculo liso vascular da adesão de leucócitos e plaquetas (Moncada et al. 1989, Nathan & Xie 1994). Entretanto, dados pioneiros de (Furchgott & Zawadzki 1980) mostraram que as respostas vasculares para acetilcolina e a outros agentes, são dependentes da integridade funcional do endotélio, demonstrando sua ação moduladora sobre o tônus vascular e sobre a atividade contrátil da musculatura lisa subjacente.

O endotélio participa ativamente da manutenção da homeostase vascular pelo balanço entre substâncias vasodilatadoras, como óxido

nítrico (NO) (Palmer et al. 1987), prostaciclina e um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e vasoconstritoras como endotelina, prostaglandina-H<sub>2</sub>, tromboxano-A<sub>2</sub>, angiotensina II (Rubanyi 1993) (FIGURA1). Alterações nas condições hemodinâmicas ou de fatores humorais podem resultar no desequilíbrio destas forças moduladoras, favorecendo a vasoconstrição (ou vasodilatação) e contribuindo para o aumento da resistência periférica vascular (Carvalho et al. 1995). A hipertensão essencial pode ser citada como exemplo de uma condição na qual o relaxamento dependente do endotélio está anormal (Lahera et al. 1997).

Além disso, muitos trabalhos têm demonstrado a importância do endotélio na regulação de várias respostas vasculares. As células endoteliais regulam a proliferação de monócitos (Pakala & Benedict 1999), o tônus vascular (Moncada et al. 1991), a inflamação, o metabolismo lipídico (Gimbrone, Jr. 1999), o crescimento celular, a migração celular e a integração com matriz extracelular (Weissberg 1999) através de mecanismos mediados por receptores. Moléculas de adesão expressas pelo endotélio agem como iniciadores críticos para a resposta inflamatória, mediando a passagem de leucócitos da circulação para o tecido (Gibbons & Dzau 1994).

A maioria das complicações cardiovasculares está relacionada a alterações na estrutura e função vascular, e uma perda da função endotelial está associada ao envelhecimento (Luscher et al. 1990) e à hipertensão (Vanhouste 1989). A disfunção endotelial pode, então, ser considerada como uma das mais importantes causas fisiopatológicas que atuam no desenvolvimento da doença cardiovascular (Taddei et al. 1995).

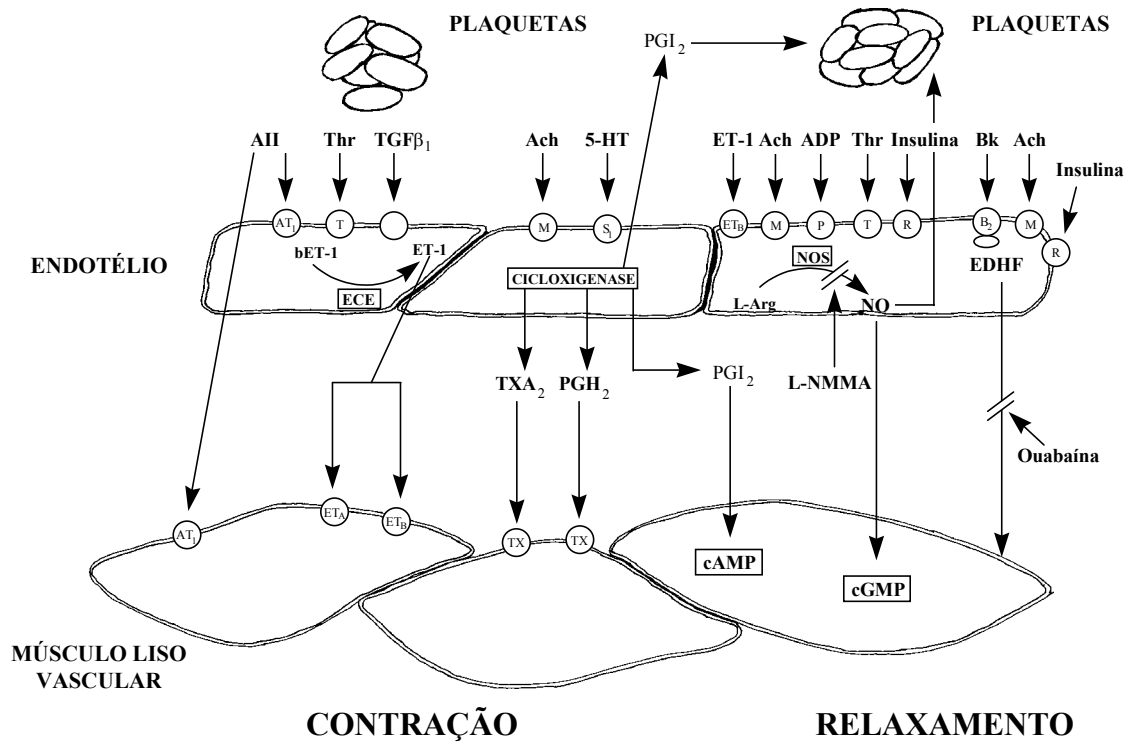


FIGURA 1 - Substâncias vasoativas derivadas do endotélio. O endotélio é a fonte de fatores de relaxamento (direita) e de contração vascular (esquerda). AT, angiotensina; Ach, acetilcolina; ADP, difosfato de adenosina; Bk, bradicinina; cAMP/cGMP, monofosfato de adenosina/guanosina cíclico; EDHF, fator hiperpolarizante derivado do endotélio; 5-HT, 5-hidroxitriptamina (serotonina); ET, endotelina-1; L-Arg, L-arginina; NO, óxido nítrico; PGI<sub>2</sub>, prostaciclina; TGF  $\alpha_2$ , fator de transformação do crescimento  $\alpha_2$ ; Thr, trombina; TXA<sub>2</sub>, tromboxana A<sub>2</sub>. Os círculos representam os respectivos receptores. L-NMMA, N<sup>G</sup>-Monometil L-Arginina, inibidor da NO sintase; Ouabaína, inibidor da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase. (Esquema adaptado de Luscher & Noll 1995b).



### 1.3 Óxido nítrico

Desde os primeiros achados de (Furchgott & Zawadzki 1980)), e pela comprovação de Moncada et al. (1991), o óxido nítrico tem sido envolvido em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo uma variedade de doenças cardiovasculares (Moncada et al. 1991), sendo atualmente considerado o paradigma da dilatação dependente do endotélio.

O óxido nítrico é uma molécula gasosa e reativa que funciona em altas concentrações como defesa a patógenos e células tumorais, e em baixas concentrações como um sinal em diversos processos fisiológicos, incluindo regulação do fluxo sanguíneo, neurotransmissão, aprendizado e memória. É um notável sinalizador celular devido a seu baixo peso molecular e rápida difusão, habilidade para permear as membranas celulares (natureza lipofílica), propriedade que elimina a necessidade de receptores ou da presença de enzimas proteolíticas para NO (Crane et al. 1997)

Na fase gasosa, o NO reage com o oxigênio formando dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>). Porém, na fase aquosa, forma nitrito. *In vivo*, nitrito reage com várias espécies ativas (p.ex. oxihemoglobina), e um produto final estável é formado podendo ser medido no plasma, o nitrato. O NO tem alta afinidade pelo grupo heme e portanto reage com metaloproteínas como a hemoglobina e a guanilato ciclase solúvel. A ativação desta última enzima, leva a formação da guanosina ciclase 3'5'-monofosfato (GMPc),

que nas células da musculatura lisa vascular, leva a diminuição do cálcio intracelular com conseqüente relaxamento (Szabo 1995).

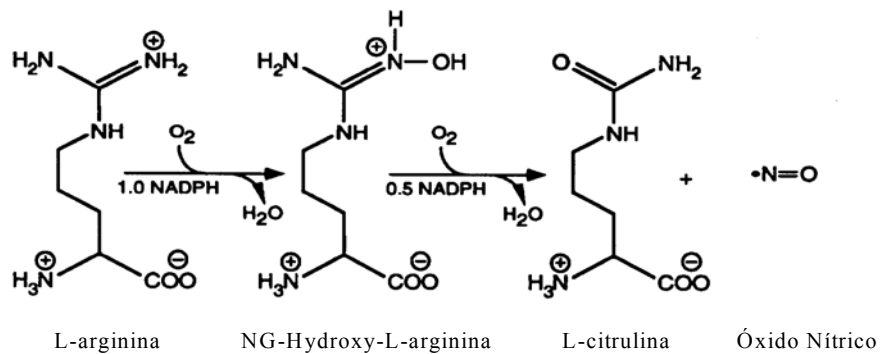
Em condições fisiológicas o NO provavelmente atua como um importante “scavenger” de radical livre, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), limitando a toxicidade associada com estas moléculas, inibindo a agregação plaquetária e a adesão leucocitária na célula endotelial.

Em macrófagos, a função biológica do NO e de seus produtos de degradação é conter e eliminar organismos invasores, demonstrando que o NO também tem efeitos citotóxicos diretos. O NO ao reagir com o radical superóxido, por exemplo durante a septicemia, acaba formando produtos finais que incluem o peróxido nitrito ( $OONO^-$ ; um potente e reativo oxidante) e dióxido de nitrogênio, que em solução aquosa forma ácidos nitrosos e nítricos, e disso nitrito e nitrato, que estão elevados na septicemia (Grunfeld et al. 1995).

Existem atualmente evidências convincentes de que o NO é um importante mensageiro molecular que desempenha um papel crítico no relaxamento vascular, na transmissão neuronal e na modulação imune (Moncada et al. 1991). A importância do NO para a homeostase cardiovascular pode ser demonstrada pelo bloqueio agudo (Lahera et al. 1991, Moncada et al. 1989, Palmer et al. 1987) ou crônico (Ribeiro et al. 1992) da síntese do NO por L-Nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) que levam à hipertensão arterial. Foram observadas alterações no mecanismos autonômicos (Cunha et al. 1993, Scrogin et al. 1998) e na sensibilidade do baroreflexo (Vasquez et al. 1994b) envolvidos no controle cardiovascular na hipertensão induzida por bloqueio da síntese

do NO. Redução na variabilidade da PAM após bloqueio agudo também se observa em animais submetidos a sobrecarga salina (Lacchini et al. 2001). Além disso, muitos trabalhos têm demonstrado que o modelo experimental de hipertensão por bloqueio da síntese do NO está freqüentemente associada com resistência periférica à ação da insulina, sugerindo a necessidade de estudos que elucidem as possíveis correlações entre estas alterações fisiológicas. (Scherrer et al. 1994, Angelis Lobo et al. 1999)

A biossíntese do NO no organismo ocorre via oxidação da L-arginina é catalisada pela enzima NO sintase (NOS), com a participação da forma reduzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídio (NADPH) como um doador de elétron. Um esquema geral da reação da NO sintase é ilustrada na Figura 2, onde observa-se que a conversão da L-arginina para L-citrulina e NO, catalisada pela NOS, é uma oxidação de cinco elétrons de um dos nitrogênios guanidínicos da L-arginina. O primeiro passo, a oxidação de dois elétrons, é uma hidroxilação que forma NG-hidroxi-L-arginina como um produto intermediário ligado à enzima. O segundo passo, uma oxidação de três elétrons envolve remoção de elétron, inserção de oxigênio e quebra da ligação carbono-nitrogênio para formar L-citrulina e NO. O mesmo doador de elétrons, a forma reduzida do NADPH, é requerido em ambas as etapas. Os átomos de oxigênio que são incorporados ao NO e à L-citrulina derivam-se de moléculas distintas de oxigênio (Andrew & Mayer 1999).



**FIGURA 2 - Reação de síntese do NO (Andrew & Mayer 1999)**

#### 1.4 Controle reflexo da pressão arterial

É de fundamental importância que a pressão arterial seja mantida dentro de uma estreita faixa de variação. Vários são os mecanismos que regulam a pressão arterial, classificados genericamente como mecanismos locais, hormonais e neurais. Os mecanismos neurais transportam informações periféricas, tais como nível pressórico, volemia, pH e temperatura, através de receptores específicos, e enviam estas informações a áreas do sistema nervoso central envolvidas na integração das respostas. Através de alterações de tônus simpático e vagal, respostas específicas dos órgãos efetores (coração, vasos de resistência e vasos de capacitância), contribuem para a estabilização e manutenção da pressão arterial, ampliando a capacidade do organismo de sobreviver e de se adaptar (Franchini & Cowley, Jr. 1996).

Dentre os mecanismos neurais responsáveis pela regulação momento a momento da pressão arterial estão os pressorreceptores, os comandados pelos quimiorreceptores e aqueles comandados pelos receptores cardiopulmonares.

### 1.4.1 Pressorreceptores

Os pressorreceptores arteriais, mecanorreceptores sensíveis às deformações vasculares e presentes principalmente no seio carotídeo (pressorreceptores carotídeos) e na crossa da aorta (pressorreceptores aórticos), devido ao acoplamento de sua atividade com o ciclo cardíaco e de sua alta sensibilidade de detectar as alterações agudas de pressão arterial, constituem o principal sistema de regulação reflexa neural de ajuste momento-a-momento da pressão arterial (Krieger 1970, Guyton et al. 1980).

Os pressorreceptores arteriais dão origem a um complexo arco reflexo constituído por fibras aferentes (nervo do seio carotídeo e nervo depressor aórtico), integração central (amígdala, hipotálamo lateral, núcleo parabraquial da ponte) (Franchini et al. 1994) e eferência representada pelo sistema nervoso simpático que atua no coração e nos vasos, e pelo sistema nervoso parassimpático (nervo vago) que atua no coração. Assim sendo, através do reflexo comandado pelos pressorreceptores aórticos e carotídeos, o sistema nervoso central mantém uma eficiente regulação sobre o débito cardíaco e a resistência periférica, regulando a pressão arterial.

Embora os receptores arteriais sejam capazes de se adaptar aguda e cronicamente a altos níveis de PA (Krieger 1989), a disfunção baroreflexa tem sido documentada na hipertensão arterial e em outras doenças cardiovasculares em estudos clínicos e experimentais (Irigoyen & Krieger 1998, Zanchetti & Mancia 1991). Há dados na literatura sugerindo que a atenuação do baroreflexo pode ser causa (Gordon et al. 1981) e/ou consequência

(Zanchetti & Mancia 1991) da hipertensão. As alterações do controle reflexo da frequência cardíaca (FC) ou da atividade simpática renal na hipertensão pelo bloqueio da síntese do óxido nítrico são controversas, havendo demonstrações de aumento não alteração ou redução da sensibilidade dos pressoreceptores (Vasquez et al. 1994a, Banting et al. 1996, Scrogin et al. 1994b). São poucos os dados sistemáticos obtidos durante o curso temporal da hipotensão por L-NAME.

#### 1.4.2 Cardiopulmonares

Estudos realizados em animais e em seres humanos têm demonstrado que o controle reflexo do sistema cardiovascular depende também dos receptores cardiopulmonares (Zanchetti & Mancia, 1991). Os receptores cardiopulmonares estão localizados em diferentes estruturas da região cardiopulmonar, incluindo átrios, ventrículos, vasos pulmonares e parênquima pulmonar (Krayner, 1961, Kappagoda et al. 1972).

A presença no coração de receptores capazes de alterar o sistema cardiovascular foi descrita há mais de 100 anos, com a observação de que injeções intravenosas de alcalóides do veratrum em cães, causavam diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca, sendo que essas respostas eram inibidas pela vagotomia bilateral (Bezold & Hirt, 1867). O estudo dos efeitos cardiovasculares dos alcalóides do veratrum mostrou que os receptores para esse reflexo estavam localizados no coração, principalmente nos ventrículos. A via aferente é representada pelo vago e a via eferente determina tanto uma inibição do sistema simpático para os vasos, como uma

estimulação vagal para o coração. Outras substâncias, quando administradas, também foram capazes de determinar o mesmo tipo de resposta, sendo que esse reflexo recebeu o nome de Bezold-Jarish.

A avaliação da sensibilidade dos reflexos cardiopulmonares em condições normais ou fisiopatológicas em animais, pode ser realizada através da ativação ou da desativação dos receptores cardiopulmonares.

A ativação do reflexo de Bezold-Jarish, em animais, pode ser realizada por estimulação química ministrando agentes farmacológicos. Existe um grande número de substâncias químicas que estimulam as terminações aferentes vagais, chamadas fibras-C vagais, no coração e pulmões, produzindo respostas depressoras. Dentre essas substâncias, a serotonina (5HT) é uma substância usualmente utilizada por sua especificidade em estimular apenas as fibras-C vagais existentes na região cardiopulmonar (Thoren, 1979) estimulando os pressorreceptores arteriais. Essa estimulação determina hipotensão e bradicardia que caracteriza o reflexo de Bezold-Jarish. Recentemente, foi demonstrado que ratos com diabetes experimental que foram ministrados com estreptozotocina, apresentaram o reflexo cardiopulmonar preservado quando estimulado quimicamente com serotonina mas tamponado durante a expansão de volume (Oliveira et al. 1999, Thoren 1979).

O reflexo de Bezold-Jarisch tem sido testado em diferentes modelos de hipertensão experimental, mas os resultados não são comparáveis. Há relatos de atenuação em ratos espontaneamente hipertensos (Verberne et al. 1988, Thames & Johnson 1985) assim como relatos de sensibilização em animais tratados com bloqueadores do NO (Araujo et al. 1995).

Não são conhecidas as alterações desse reflexo durante o curso temporal da hipertensão pelo bloqueio do NO.

#### 1.4.3 Quimiorreceptores

Os quimiorreceptores se localizam no arco aórtico e no seio carotídeo, incorporando-se aos nervos vago e glossofaríngeo. Projetam-se ao núcleo do trato solitário em sua porção mais lateral (Marshall et al. 1994). As fibras aferentes quimiosensíveis disparam a cada diástole e são estimuladas, principalmente, durante alterações das pressões parciais de oxigênio (PO<sub>2</sub>) , gás carbônico (PCO<sub>2</sub>) e pH (Franchini & Krieger 1992).

A resposta à estimulação dos quimiorreceptores é bastante ampla, envolvendo primariamente os centros respiratórios, aumento da ventilação (frequência respiratória e volume de ar corrente) e alterações na regulação cardiovascular (queda da FC seguida de aumento da PA), além da reação de alerta (Marshall et al. 1994).

Uma forma eficiente de se estimular os quimiorreceptores periféricos é a administração endovenosa de cianeto de potássio KCN, (Franchini et al., 1992). Doses baixas de KCN desencadeiam um comportamento de alerta, acompanhado de taquipnéia seguido por taquicardia e hipertensão, enquanto que a administração de doses altas de KCN determinam intensa bradicardia e aumento da pressão arterial (Franchini et al , 1992 ; Daly MB & Tatons A. , 1979)

Na hipertensão arterial, há evidências sugerindo alteração da resposta cardiovascular e mesmo de resposta respiratória desencadeada pelos



quimiorreceptores periféricos. É provável que essa alteração seja secundária a elevação de pressão arterial, não se descartando que, em algumas circunstâncias haja participação discreta dos quimiorreceptores na gênese da hipertensão arterial. Do ponto de vista anatomo-patológico, é descrito que indivíduos hipertensos possuem corpos carotídeos aumentados, com alterações estruturais nas paredes dos vasos intra-glômicos (Trzebski 1992).

Estudos experimentais em ratos (Franchini, 1992) demonstraram hiperreatividade do reflexo comandado pelos quimiorreceptores periféricos em ratos espontaneamente hipertensos. Demonstraram também a ação tônica dos quimiorreceptores sobre a PA (Franchini, 1992) assim como o efeito de desnervação carotídea em reduzir tonicamente a atividade simpática renal (Irigoyen et al. 1991). Não existem dados sobre o controle quimiorreflexo da circulação na hipertensão pelo bloqueio da síntese do NO.

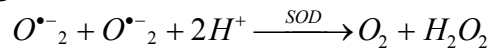
### 1.5 Espécies Ativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo

A produção de energia no organismo provém, em última instância, de processos oxidativos que implicam em consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono.

As espécies reativas de oxigênio (EAO) são fortes oxidantes e as células apresentam vários mecanismos de proteção contra elas.

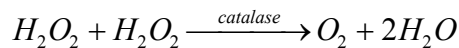
O radical superóxido é convertido até peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase (SOD), que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e que acelera a reação a  $10^4$  vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico (Reação 1).

## Reação 1



Por sua vez, o  $H_2O_2$  é metabolizado à água e oxigênio por duas importantes enzimas intracelulares: a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) (reação 2).

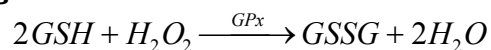
## Reação 2



A catalase desempenha um importante papel na eliminação do  $H_2O_2$ , promovendo a sua catálise até água.

A GPx também funciona como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a glutathiona reduzida (GSH) à glutathiona oxidada (GSSG), removendo  $H_2O_2$  e formando água (reação 3) (Ferrari et al., 1985).

## Reação 3



Como as EAO são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células aeróbias possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressivos. A organização estrutural da célula é, por si só, importante para a separação dos reagentes das reações de formação de EAO uns dos outros (Dormandy 1978).

Em situações de estresse, como na isquemia-reperfusão, tecidos de mamíferos podem aumentar a produção de  $H_2O_2$  e outras EAO várias vezes (Garlick et al. 1987, Pietri et al. 1989, Slezak et al. 1995) demonstraram um incremento de  $H_2O_2$  da ordem de 250% no momento da isquemia e de 600% nos primeiros 5 minutos de perfusão. Oliveira et al. (1995) demonstraram

uma aumentada resistência ao estresse oxidativo em ratos com hipertensão por renina alta.

Um dos principais mecanismos de lesão nestes modelos de estudo, é a lipoperoxidação (LPO). As membranas das células de mamíferos contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) que podem sofrer lesão peroxidativa. Reações de lipoperoxidação em cadeia, com subsequente quebra de membranas celulares e lipossomais, podem ser induzidas por EAO geradas enzimaticamente. O radical hidroxil e possivelmente o oxigênio singlete reagem com lipídios insaturados de biomembranas, resultando na geração de radicais lipoperóxidos ( $\text{LOO}\cdot$ ), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e produtos da fragmentação como o malondialdeído (MDA), cuja determinação é um dos métodos utilizados para avaliação do estresse oxidativo.

A baixa concentração de SOD e CAT no espaço extracelular (Salin & McCord, 1977) resulta na aumentada susceptibilidade dos componentes do espaço intersticial ao fluxo de EAO. Em princípio, qualquer mecanismo que provoque aumento do consumo de oxigênio tecidual promove incremento da geração de EAO.

O perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) é importante para a manutenção da integridade celular.

Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (Sies & Mehlhorn 1986).

## 1.6 Hipertrofia cardíaca

O termo hipertrofia é normalmente interpretado como um processo adaptativo, devido ao aumento da pós-carga que impõem ao coração uma condição maior de trabalho, ou ativação de receptores adrenérgicos, como resultado da atividade simpática aumentada (Tarazi et al. 1982, Cabral et al. 1988, Morgan & Baker 1991). A hipertensão é geralmente associada à modificações estruturais dos tecidos cardiovasculares (Head et al. 1991) que podem ser causadas por efeito direto de hormônios ou sistemas como o sistema renina-angiotensina.

Dependendo da dose e do tempo de tratamento pode-se encontrar redução do peso do ventrículo e do tamanho do cardiomiócito (Oliveira, 2000) ou hipertrofia (Arnal et al. 1993).

Outros estudos mostram a hipertrofia em animais tratados com L-NAME (Lantelme et al. 1994, Scrogin et al. 1994a) o que nos leva a investigar a ocorrência da hipertrofia e suas possíveis relações com alterações no controle reflexo do sistema cardiovascular.

## 1.7 Sistema renina angiotensina

O sistema renina angiotensina (SRA) corresponde a um complexo sistema hormonal, cujo papel fundamental está relacionado com o controle da pressão arterial e homeostasia hidroeletrólítica do organismo (Menard 1993). Classicamente o SRA é entendido como um sistema endócrino cuja substância ativa, angiotensina II (Ang II), é a responsável pela maioria dos efeitos

fisiológicos observados.

O primeiro componente da cascata bioquímica do SRA é a renina. A renina é uma enzima proteolítica sintetizada e estocada nas células justaglomerulares localizadas nas arteríolas aferentes renais. Os principais estímulos para a liberação desta enzima são a hipoperfusão renal (produzida por hipotensão ou depleção de volume), o aumento da atividade simpática e a queda da concentração de NaCl nas células da mácula densa. A renina é altamente específica pelo seu substrato, o angiotensinogênio, sintetizada principalmente no fígado. Do fígado, este substrato é secretado para a circulação para ser clivado pela renina, gerando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). Este, por perda de dois aminoácidos terminais, é posteriormente convertido em um octapeptídeo, a angiotensina II (Ang II). Esta conversão ocorre pela ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA), presente principalmente nas membranas das células endoteliais da circulação pulmonar.

**As duas ações clássicas da Ang II atuam no sentido de inverter a hipovolemia e hipotensão (para melhorar a perfusão tecidual), que são os estímulos deflagradores da liberação de renina. Primeiro, a Ang II promove retenção renal de sódio e água causando conseqüentemente expansão do volume plasmático. Este efeito é mediado tanto pelo aumento da secreção de aldosterona pelo córtex adrenal, como pela estimulação direta da reabsorção tubular de sódio, ou ainda pelo seu potente efeito dipsogênico. Segundo, a Ang II produz vasoconstrição arteriolar, elevando a resistência vascular sistêmica e levando a um aumento da pressão sanguínea arterial. Interessantemente, o SRA exerce ações importantes em ambos os sistemas de controle, determinando os**

níveis de pressão arterial e sua variabilidade, ao mesmo tempo em que é regulado por tais sistemas (Averill and Diz 2000).

Essa visão clássica do SRA, onde o sistema seria essencialmente dependente da existência do hormônio circulante para produzir seus efeitos fisiológicos, vem sofrendo profundas modificações na última década. Hoje, o SRA é visto de forma mais ampla, onde a multiplicidade de funções do sistema é produto também da ação “parácrina” e “autócrina” da Ang II e de alguns de seus metabólitos produzidos localmente em vários tecidos.

O SRA é o maior regulador fisiológico de volume de fluidos corpóreos, balanço eletrolítico e pressão arterial. Contudo, os mecanismos pelos quais estas ações ocorrem ainda não são completamente entendidos (Carey et al. 1997).

#### 1.7.1 - Sistema Renina-Angiotensina Local

A utilização de métodos bioquímicos aliados a técnicas modernas de biologia molecular permitiram evidenciar a existência de muitos componentes do SRA em tecidos periféricos. A detecção de um ou mais mRNAs destes componentes (angiotensinogênio, renina, enzima conversora e receptores de Ang II) em vários tecidos como glândulas adrenais, rins, coração, vasos e cérebro deram suporte à existência de SRA locais (Griendling et al. 1993).

Algumas controvérsias existem ainda hoje em relação à definição de SRA locais. Para alguns autores o termo “SRA local” apenas se justifica quando todos os componentes são sintetizados “in situ”. Somente nestas condições, o sistema poderia ser considerado como operando de forma

independente do sistema endócrino (Danser & Schalekamp 1996). Entretanto, a definição de SRA local não necessariamente depende da síntese dos componentes do sistema na mesma célula (Paul et al, 1992). Alguns desses componentes podem ser provenientes da circulação, desde que significantes passos regulatórios ocorram localmente.

Desta forma, a tendência hoje é aceitar que os componentes circulantes possam ser absorvidos pelos tecidos, mas que os compartimentos dentro destes tecidos têm também a capacidade de gerar Ang II com concentrações de substrato e cinéticas diferentes ainda desconhecidas (Dzau 1988). Como exemplo, um conjunto de evidências sugere que a Ang II no coração pode agir como um fator de crescimento (Yamazaki et al. 1996), aumentando a produção de uma variedade de proteínas que estão relacionadas com a hipertrofia cardíaca (Miyata & Haneda 1994). O hormônio mostrou promover uma resposta hipertrófica em células musculares lisas.

### 1.8 Enzima Conversora de Angiotensina I

A Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) é uma dipeptidil dipeptidase carboxi-terminal, cujos substratos principais são Ang I e bradicinina, mas também hidrolisa outros peptídeos, como a substância P. A enzima, ao clivar o dipeptídeo carboxi-terminal de seus dois principais substratos, leva à formação da Ang II, um potente vasoconstritor e inativa o vasodepressor bradicinina levando à formação de peptídios inativos. A ECA é uma glicoproteína integral de membrana, ancorada à bicamada lipídica através de uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos (17 amino-ácidos), localizados

na extremidade C-terminal. A orientação da enzima na membrana ocorre de tal forma que seus sítios catalíticos, presentes na porção amino-terminal, estão expostos na superfície extracelular (Erdos & Skidgel 1987, Hooper et al. 1987, Soubrier et al. 1988).

Embora a ECA seja encontrada no plasma, a concentração da enzima neste compartimento corresponde a uma pequena fração daquela encontrada nos diferentes tecidos. Entre os diversos componentes do SRA, a ECA parece particularmente importante como mediadora e reguladora da produção de Ang II no coração, na medida em que possui um amplo espectro de expressão no endotélio de todos os vasos sanguíneos deste órgão, bem como em miócitos e fibroblastos cardíacos.

Estudos em situações patológicas como hipertrofia cardíaca, indicam que a ativação do SRA local parece desempenhar importante papel na patogênese do processo. Em trabalhos anteriores foi demonstrado que a hipertrofia cardíaca, induzida por tratamento crônico com isoproterenol, está associada à elevação da atividade da ECA no ventrículo esquerdo de rato. Os resultados mostraram que existe correlação entre a hipertrofia e a atividade da enzima (Oliveira et al, 1996).



## 2. HIPÓTESE

A hipertensão induzida pelo bloqueio da síntese do óxido nítrico produz alterações do controle reflexo da circulação, tempo dependente, e relacionadas a adaptações bioquímicas e morfométricas do miocárdio.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi quantificar as alterações do controle reflexo da circulação durante o curso temporal da hipertensão provocada pelo bloqueio da síntese do óxido nítrico, bem como avaliar alterações bioquímicas, morfométricas do miocárdio e suas associações.

#### Específicos:

- Avaliar a sensibilidade dos reflexos comandados pelos pressorreceptores, receptores cardiopulmonares e quimiorreceptores na hipertensão induzida pelo bloqueio da síntese do óxido nítrico durante uma, duas e quatro semanas de tratamento.
- Medir as alterações de massa do coração após uma, duas e quatro semanas de bloqueio do NO e compará-los com o grupo controle.
- Medir a atividade da renina plasmática, enzima conversora de angiotensina plasmática e tecidual após uma, duas e quatro semanas de bloqueio do NO e compará-las com o grupo controle.
- Medir o estresse oxidativo através da quantificação de enzimas antioxidantes e de lipoperoxidação pela quimiluminescência.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 98 ratos machos Wistar, provenientes do biotério da Universidade Federal de Pelotas e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com aproximadamente 12 semanas de idade, pesando entre 250 e 300g. Os animais foram mantidos em caixas individuais, em ambiente com temperatura controlada (20°C - 25°C) e com um ciclo claro escuro de 12 horas (das 6:00h às 18:00h).

### 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

#### 4.2.1 Grupo Controle Normotenso

Animais que receberam água e comida *ad libitum* foram subdivididos em três grupos: para avaliação da sensibilidade reflexa, para avaliação da função vagal e para as medidas bioquímicas.

#### 4.2.2 Grupos Tratados Hipertensos

Animais que receberam L-NAME e comida *ad libitum* também foram subdivididos em três grupos. Um grupo recebeu L-NAME para avaliação da sensibilidade reflexa; outro grupo foi tratado para avaliação da função vagal e

no terceiro grupo foram feitas as medidas bioquímicas. Os tempos de tratamento foram os seguintes:

- Uma semana de hipertensão
- Duas semanas de hipertensão
- Quatro semanas de hipertensão

### 4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 4.3.1 Indução da Hipertensão

Os animais foram tratados com N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 750mg/l) diluído na água de beber durante uma (100mg/kg/dia), duas (125mg/kg/dia) e quatro (128mg/kg/dia) semanas. A solução foi trocada a cada 2 dias e/ou suplementada quando necessário.

#### 4.3.2 Procedimento Cirúrgico

No dia anterior ao registro de pressão arterial/reflexos, os animais foram anestesiados com Ketamina (100mg/kg) e Cloridrato de Xylazina (20mg/kg) para implantação dos catéteres de polietileno. As cânulas foram preenchidas com soro fisiológico 0,9% e heparina sódica (Liquelme-Roche, 5000U) na proporção de 0,5ml para 0,02ml, respectivamente, e posicionadas no interior da aorta abdominal (PE-10, diâmetro interno de 0,01 mm), e da veia cava inferior (PE-50, diâmetro interno de 0,05 mm). Através de uma pequena incisão na região ingnal esquerda em direção ao feixe vasculo-nervoso, as extremidades

das cânulas foram introduzidas na artéria e veia femural, para obtenção dos registros de pressão arterial, frequência cardíaca e administração das drogas, respectivamente. As cânulas foram fixadas com fio de algodão, passadas subcutaneamente, e exteriorizadas no dorso da região cervical onde foram fixadas à pele com fio de algodão. Ao final da cirurgia, os animais receberam uma única injeção (0,1ml) intramuscular de penicilina G (Benzetacil<sup>®</sup>, Fontoura-Wyeth, 60.000 U).

#### 4.3.3 Registro de Pressão Arterial

Vinte e quatro horas após a canulação, estando o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa (Plexiglas, 25x15x10cm) durante todo o experimento. A extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético (P23 Db, Gould-Statham, Oxnard, CA, EUA) ligado a um pré amplificador (Hewlett-Packard 8805C, Puerto Rico, EUA). Os sinais de pressão arterial foram gravados durante 20 minutos em um microcomputador equipado com sistema de aquisição de dados (CODAS, 1Kz, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA) que permitiu a análise dos pulsos da pressão, batimento a batimento (frequência de amostragem 1000 Hz por canal), para estudo dos valores de pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca. Os valores de frequência cardíaca foram derivados do sinal pulsátil da pressão arterial.

#### 4.3.4 Coleta de Sangue

Após 24 horas da medida de pressão arterial/reflexo, procedeu-se a coleta de 1 ml de sangue através da cânula arterial. O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA (3,8%), mantido no gelo, e rapidamente centrifugado a 4°C por 10 minutos a 3000 rpm (Sorvall RC-5B, Du Pont Instruments, Connecticut, EUA). As amostras foram armazenadas em freezer -70°C para posterior análise dos níveis plasmáticos de renina.

#### 4.3.5 Peso do coração e peso corporal

Os animais foram pesados minutos antes de serem mortos e o coração foi pesado imediatamente após a sua retirada. Esses dados foram utilizados para calcular a relação entre o peso do coração/peso corporal (índice de hipertrofia), expressa em mg de coração/g de peso corporal. Essa relação é aceita pela literatura como uma medida adequada de hipertrofia cardíaca no rato (Kawagushi et al., 1997).

### 4.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE REFLEXA

#### 4.4.1 Pressorreceptora

Após o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca em repouso durante 20 minutos, foram injetadas as drogas vasoativas fenilefrina e nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA).

Fenilefrina um potente estimulador  $\alpha_1$ , cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição, foi usada para provocar o

aumento da pressão arterial, com conseqüente bradicardia reflexa comandada pelos pressorreceptores.

Nitroprussiato de sódio, um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias, cuja ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'-guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos, foi usado para provocar queda de pressão arterial com conseqüente taquicardia reflexa comandada pelos pressorreceptores.

Após conectar o animal ao sistema de registro, aguardou-se a estabilização da pressão arterial e freqüência cardíaca aos níveis de repouso, para dar início a gravação por 20 minutos dos níveis cardiovasculares basais.

A sensibilidade pressorreceptora foi testada através da injeção em bolus de fenilefrina e nitroprussiato de sódio (0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 8 e 10 µg) de forma randomizada. O volume injetado foi de 0,1 ml em cada dose, sendo observado um intervalo mínimo entre injeções para que a pressão arterial e freqüência cardíaca retornassem aos valores basais de repouso. Os picos, máximos e mínimos, da pressão arterial média foram registrados após cada dose de fenilefrina ou nitroprussiato e comparados aos valores de pressão arterial média do período controle. Para cada dose de droga injetada, a variação máxima ou mínima da freqüência cardíaca foi comparada com os valores de freqüência cardíaca do período controle, imediatamente antes da injeção das drogas, para posterior quantificação das respostas.

Os índices de resposta pressora ou depressora foram calculados a partir da inclinação da reta, obtida da variação da PA (mmHg) em relação a cada

dose de fenilefrina ou nitroprussiato de sódio (por dose em  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) para cada rato avaliado. Os valores apresentados representam a média dos índices obtidos em cada grupo.

Os índices médios de bradicardia e taquicardia reflexa foram estabelecidos através do cálculo da razão entre as variações da frequência cardíaca a da pressão arterial média ( $\Delta\downarrow\text{FC}/\Delta\uparrow\text{PAM}$ , para aumentos de pressão arterial e  $\Delta\uparrow\text{FC}/\Delta\downarrow\text{PAM}$ , para quedas de pressão arterial), sendo que a variação de pressão arterial foi o estímulo e a variação da frequência cardíaca foi a resposta reflexa decorrente deste estímulo.

A sensibilidade do reflexo pressorreceptor também foi analisada através de uma equação logística sigmoide (equação 4), utilizando o método proposta por Head & McCarty (1987) e descrito por Potieri, Venezuela, Scavone & Michelini (1998). Nesta análise utilizam-se o programa Sigmóide v5 cedido por Geoffrey Head. No ajuste da equação logística sigmoide, as variações reflexas da frequência cardíaca, foram relacionadas com as variações da pressão arterial média. O ganho obtido através da equação logística foi utilizado como índice de sensibilidade do reflexo pressorreceptor.

Equação 4

$$Y_{(x)} = P_1 + \frac{P_2}{1 + e^{P_3(x-P_4)}}$$

Onde  $P_1$  = limite inferior da frequência cardíaca;  $P_2$  = Faixa de variação da frequência cardíaca (compreendida entre o limite superior e inferior da frequência cardíaca);  $P_3$  = coeficiente de curvatura da equação;  $P_4$  =  $\text{PAM}_{50}$ , que corresponde ao valor de PAM localizada na metade da faixa de variação da FC;  $G$  = Ganho ou inclinação da curva entre os pontos de inflexão,



calculado pela seguinte fórmula:  $G = -P_2 (P_3/4)$ . O limite superior de taquicardia reflexa foi calculado através da soma algébrica de  $P_1$  e  $P_2$ .

#### 4.4.2 Cardiopulmonar

Assim que os valores de pressão arterial e frequência cardíaca mais uma vez retornaram aos seus valores basais, foi dado início às injeções endovenosas (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 $\mu$ g/kg) de serotonina.

A serotonina estimula receptores cardiopulmonares do tipo 5HT<sub>3</sub> que possuem aferências vagais mielinizadas quimiossensíveis, desencadeando o reflexo de Bezold-Jarisch. O reflexo de Bezold-Jarisch envolve uma diminuição do tonus simpático nos vasos de resistência e, uma ativação das aferências vagais sobre o marcapasso cardíaco. Como resultado, ocorre queda simultânea da pressão arterial e frequência cardíaca. Para cada injeção da droga, as variações de pressão e frequência mínimas, foram registradas por um período de dez segundos antes e quinze segundos após a injeção da droga. Esses valores foram comparados com os valores basais imediatamente antes das injeções, para posterior quantificação das respostas. As doses subseqüentes só foram administradas após os parâmetros cardiovasculares terem retornado aos níveis basais de repouso.

**As respostas hipotensoras decorrentes da diminuição do tono simpático nos vasos de resistência e bradicárdicas, provocadas pela ativação da eferência vagal sobre o coração, que caracterizam o reflexo cardiopulmonar Bezold-Jarisch, foram consideradas para quantificar a sensibilidade do reflexo cardiopulmonar.**

#### 4.4.2.1 Bloqueio farmacológico

O bloqueio farmacológico do sistema nervoso parassimpático foi realizado em outro grupo de animais, através da administração endovenosa de um anti-colinérgico (Atropina, 4mg/Kg, Sigma – EUA), verificando-se a resposta às injeções de serotonina (pressão arterial e frequência cardíaca) 15 minutos após a administração da atropina.

#### 4.4.3 Quimiorreceptora

Após os parâmetros cardiovasculares terem retornado aos valores basais, o reflexo comandado pelos quimiorreceptores foi testado através de injeções endovenosas de cianeto de potássio (KCN, Merck).

KCN produz hipóxia histotóxica, pela combinação com a hemoglobina, diminuindo a produção de ATP, o que por sua vez estimula as células quimiorreceptoras, desencadeando o quimiorreflexo. Em resposta a sua estimulação, ocorre intensa bradicardia seguida de aumento da pressão arterial.

Para testar a sensibilidade quimiorreceptora foram feitas injeções em bolus de dose crescentes de KCN ( 60, 100, 140, 180 µg/kg, Franchini et al., 1996). O volume injetado em cada dose variou entre 0,10 e 0,15 ml. Simultaneamente, sinais de pressão arterial e frequência cardíaca foram registrados por um período de 10 segundos antes e 15 segundos após a injeção da droga para análise posterior. Os valores de bradicardia imediatamente antes do aumento da pressão arterial, assim como os valores

máximos de pressão arterial, obtidos pela comparação entre os valores basais e aqueles encontrados após a injeção do KCN, foram usados para quantificar as respostas da frequência cardíaca e da pressão arterial provocadas pela ativação dos quimiorreceptores. As doses subsequentes só foram administradas após os parâmetros cardiovasculares terem retornado aos níveis basais de repouso. Para quantificação das respostas de cada injeção da droga, as variações de frequência mínima e de pressão máxima, foram comparadas com os valores basais imediatamente antes das injeções.

#### 4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

##### 4.5.1 Morte dos animais e preparo do material de estudo

Os animais pertencentes aos grupos de dosagens foram pesados e sacrificados através de decaptação. O sangue foi coletado e centrifugado por cinco minutos a 3000rpm em centrífuga refrigerada, entre 0 e 4°C (Sorval RC 5B-rotor SM24, Du Pont Instruments, EUA), para separação do plasma. Os glóbulos vermelhos foram lavados três vezes em solução fisiológica e mantidos na geladeira (sem congelar). As amostras consistiram de 75µl de glóbulos lavados, adicionados à 500µl de soro fisiológico. A análise da quimiluminescência foi realizadas no mesmo dia ou no máximo no dia seguinte. Para determinação da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase foram tomados 100µl da solução contendo os glóbulos vermelhos lavados. Essa solução de glóbulos vermelhos foi diluída em 1 ml da solução com 1mM de ácido acético e 4 mM de sulfato de magnésio. As

amostras foram congeladas e posteriormente determinadas as atividades das enzimas.

#### 4.5.2 Dosagem de Proteínas e da concentração de hemoglobina

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/ml (Lowry, 1951). Os resultados foram expressos em mg de proteína/ml de amostra.

A medida da concentração de hemoglobina foi realizada de acordo com o método de cianometahemoglobina. Esse método baseia-se na oxidação do ferro da hemoglobina pelo ferricianeto de potássio em pH fracamente alcalino (7,7-8,0). Forma-se metahemoglobina que é convertida em cianometahemoglobina ao reagir com cianeto de potássio. Para a realização da medida, foram pipetados 5ml de solução de Drabkin (KCN 9 mM e  $K_3[Fe(CN)_6]$  0,9mM) e 20  $\mu$ l de glóbulos vermelhos previamente preparados. A leitura foi feita em espectrofotômetro Cary com comprimento de onda de 546 nm. A concentração de hemoglobina foi expressa em mg/ml

#### 4.5.3 Medida de Lipoperoxidação (LPO)

##### 4.5.3.1 Quimiluminescência Iniciada por t-BOOH (QL)

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (o hidroperóxido de tert-butil – t-BOOH) à solução contendo os glóbulos vermelhos, avaliando-se a capacidade de resposta produzida pela amostra. A base para esse teste reside no fato de os hidroperóxidos serem espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios da amostra, por um mecanismo radicalar, e gerando produtos emissores de luz quantificável.

A quimiluminescência foi medida, no mesmo dia em que foi realizada a coleta de sangue, em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 4 mL de uma solução tampão de fosfatos (30mM), contendo KCl 120 mM (pH 7,4), ao qual foi adicionado 10 µl dos glóbulos vermelhos previamente lavados e diluídos em soro fisiológico. Foram realizadas três leituras, considerada como a emissão basal de luz pelo homogeneizado. O hidroperóxido de tert-butila foi usado na concentração de 400 mM, dos quais foram adicionados 30 µL no meio de reação. Foi medida a emissão máxima de luz e desta, descontada a emissão basal do homogeneizado para fins de cálculo. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por grama de hemoglobina (Gonzales Flecha et al, 1991).

#### 4.5.4 Enzimas antioxidantes

##### 4.5.4.1 Catalase (CAT)

A taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade da CAT, e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem com relação a este. Desta forma, o consumo de  $H_2O_2$  pode ser utilizado como uma medida de atividade da enzima CAT.

O ensaio consiste em medir a diminuição da absorvância a 240nm, comprimento de onda onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda no qual foram realizadas as medidas.

Para a realização das medidas foi usada uma solução tampão constituída de fosfatos a 50 mM em pH 7,4. Foram adicionados 955 $\mu$ l deste tampão e 30 $\mu$ l de amostra (solução de glóbulos vermelhos previamente preparada) na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir foram adicionados 15 $\mu$ l de peróxido de hidrogênio (0,3 mol/l) e foi monitorada a diminuição da absorvância durante dois minutos no comprimento de onda selecionado.

Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (Boveris & Chance, 1973).

#### 4.5.4.2 Superóxido Dismutase (SOD)

As superóxido dismutases catalisam a reação de dois ânions superóxido, com a conseqüente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT e a

glutathiona peroxidase. A velocidade da reação catalisada pela SOD é 104 vezes maior que a velocidade de dismutação espontânea em pH fisiológico.

A técnica utilizada neste trabalho para determinação da SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção.

Uma vez que não se consegue determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (Marklund, 1985).

Para tanto, primeiramente foi efetuada uma curva padrão usando as concentrações de 0; 0,25; 0,5 e 1 unidade de SOD, através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos. Foram adicionados à cubeta a solução tampão (tris 50mM e EDTA 1mM), 4 $\mu$ l de solução de catalase (30 $\mu$ M) e volumes adequados das soluções de SOD, obtendo-se as concentrações desejadas.

No meio de reação, foram utilizados 15  $\mu$ l da amostra de glóbulos vermelhos previamente preparada, tampão Tris-Fosfato, 8  $\mu$ l de pirogalol (24mM) e 4  $\mu$ l de catalase (30 $\mu$ M). O aparelho foi zerado e as leituras realizadas. A variação na absorbância foi acompanhada a 420 nm durante 2 minutos e os resultados expressos em U SOD/mg de proteína.

#### 4.5.4.3 Glutathione Peroxidase (GPx)

A amostra foi preparada adicionando-se uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina, a fim de que esta não interferisse no ensaio. Para medir a concentração de hemoglobina, misturou-se 100  $\mu$ l da solução de glóbulos vermelhos com 1ml da solução de Drabkin e fez a leitura a um comprimento de onda de 546nm.

Depois de conhecida a concentração de hemoglobina, tomou-se, para cada 0,6mg/ml de hemoglobina, 100  $\mu$ l de solução transformante que transforma toda a hemoglobina em cianometahemoglobina inibindo a atividade peroxidante da hemoglobina.

##### SOLUÇÃO DE DRABKIN:

- 8,5% da solução de KCN (9mM)
- 66% da solução de  $K_3[Fe(CN)_6]$  (0,9mM)
- q.s.p. 10 ml de água destilada

##### SOLUÇÃO TRANSFORMANTE:

- 50% de KCN (9mM)
- 50% de  $K_3[Fe(CN)_6]$  (0,9mM)

Como a GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, a atividade da enzima pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx.



Para tanto, na cubeta do espectrofotômetro, foram adicionados 2,15  $\mu$ l de tampão (EDTA 1mM em fosfato de potássio, pH 7,7), 100 $\mu$ l de NADPH (10mM), 150  $\mu$ l de hidroperóxido de tert-butil (10 mM) e 50  $\mu$ l de glutathione redutase. Foi registrada a absorbância por um período de aproximadamente um minuto a 340nm, para obtenção da linha de base. Após esse momento, foram adicionados 50  $\mu$ l de glutathione reduzida (100mM em ácido metáforico a 5%) por mais um minuto. Logo após foram adicionados 500  $\mu$ l da amostra transformada e leu-se por mais um minuto. A atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro de marca Varian, modelo Cary. Os resultados foram expressos em  $\mu$ moles/min/mg de proteína (Flohé & Gunzler, 1984).

#### 4.5.5 Determinação da Atividade da Renina Plasmática

A atividade indireta da renina plasmática foi determinada por radioimunoensaio (REN-CT2, Cis Bio International) para determinação de Angiotensina I no plasma coletado com EDTA. Este ensaio permite uma medida indireta da atividade da renina plasmática. Os resultados são expressos como ng de angiotensina I liberados por ml por hora (ng de AngI/ml/h).

#### 4.5.6 Dosagem da atividade da ECA

A atividade da enzima foi determinada em homogenatos de coração, pulmão, rim e aorta. A dosagem da atividade enzimática em tecidos foi realizada de acordo com (Oliveira & Krieger, 1995). Os tecidos

foram homogeneizado em tampão borato 0,4 M contendo sacarose 0,32 M, pH 7,2. Os homogenatos foram centrifugado (3000 rpm, 10 min.) e o sobrenadante utilizado para as medidas fluorimétricas. 20  $\mu$ l de amostra de tecido e 10  $\mu$ l de soro foram incubados com 480  $\mu$ l ou 490  $\mu$ l de Hip-His-Leu (5 mM) por 15 min para soro e pulmão, e por 30 min para os demais tecidos à 37 °C. Após esse tempo a reação foi paralisada pela adição 1,2 ml de NaOH 0,34 N. O produto da reação, His-Leu, foi medido fluorimetricamente (365 nm para excitação e 495 nm para emissão) após a adição de 100  $\mu$ l de uma solução de o-phthaldialdehyde (2 % em metanol) cuja reação foi interrompida após 10 min com a adição de 200  $\mu$ l de HCl (3 N) e posterior centrifugação (3000 rpm, por 10 min., temperatura ambiente). Nos brancos (To), o homogenato dos tecidos e soro foram adicionados após o término da reação com NaOH, com o objetivo de corrigir a fluorescência intrínseca das amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Em todos os experimentos são feitas curvas-padrão, relacionando-se intensidade de fluorescência com a quantidade de produto formado (His-Leu). Os resultados foram expressos em nMoles His-Leu/ min./mg de proteína ou nMoles His-Leu/min/ml para soro. A proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se como padrão albumina bovina (BSA, 1mg/ml).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística dos dados, foi utilizado o software GraphPad Instat, versão 3.0 para Windows 95 (GraphPad Software, San Diego, California,

EUA). Os gráficos mostrados nas figuras foram gerados pelo software MS Excel 2000.

Para as análises estatísticas dos resultados foram calculadas as médias e erros padrões das médias. Diferentes testes foram utilizados para comparação das médias dos grupos e estabelecer correlações.

Para as respostas cardiovasculares foram utilizadas análise de variância para medidas repetidas (ANOVA), quando se fez necessário. O teste complementar usado foi o teste de TUKEY.

As dosagens bioquímicas foram comparadas entre os grupos através de ANOVA para dados não pareados.

O teste de regressão linear foi utilizado para testar correlação entre ao dados individuais.

Os valores apresentados são as médias  $\pm$  erro padrão e foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.2 CONSUMO DE L-NAME

O consumo de L-NAME (mg/kg/dia) foi aumentando gradativamente da primeira à quarta semana. Esses aumentos em mg/kg/dia foi significativamente diferente entre os grupos tratados por uma semana ( $99,91 \pm 6,59$ ;  $n=12$ ) e quatro semanas ( $128,39 \pm 7,80$ ;  $n=13$ ). Quando comparados, uma e duas semanas ( $125,38 \pm 6,94$ ;  $n=12$ ), a diferença não foi significativa. Estes resultados estão apresentados na FIGURA 3.

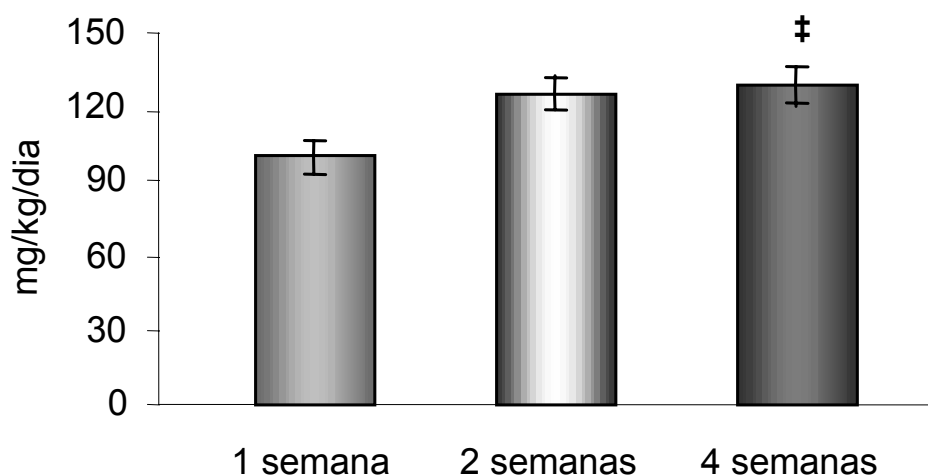


FIGURA 3 – Consumo de L-NAME (mg/kg/dia) dos animais tratados por uma semana, duas e quatro semanas. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão.

‡  $p < 0,05$  em relação ao grupo de uma semana de tratamento.

## 5.2 EFEITO DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL E A FREQUÊNCIA CARDÍACA

O bloqueio da síntese do óxido nítrico provocou um aumento significativo da pressão arterial média (mmHg) nos grupos tratados por uma ( $144,58 \pm 7,25$ ;  $n=12$ ), duas ( $153,34 \pm 4,58$ ;  $n=12$ ) e quatro semanas ( $167,63 \pm 5,51$ ;  $n=13$ ) em relação aos controles ( $102,61 \pm 1,79$ ;  $n=11$ ). A pressão no grupo de quatro semanas também foi maior do que o grupo tratado por uma semana. Os dados de pressão arterial obtidos dos registros contínuos de vinte minutos (batimento a batimento) estão apresentados na FIGURA 4 .

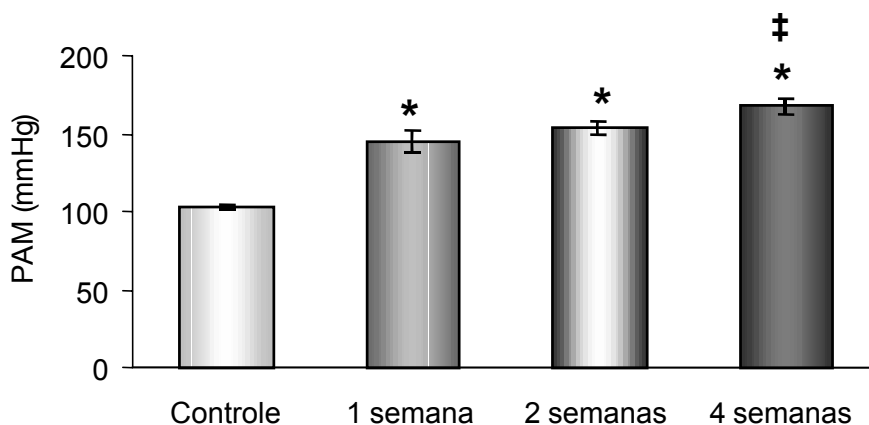


FIGURA 4 – Pressão arterial média (mmHg) durante registro de repouso por vinte minutos nos grupos estudados. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

‡  $p < 0,05$  em relação ao grupo tratado por uma semana.

A frequência cardíaca em batimentos por minuto (bpm) não diferiu significativamente entre o grupo controle ( $377 \pm 12,72$ ) e os animais tratados por uma ( $395 \pm 13,67$ ), duas ( $419 \pm 16,31$ ) e quatro semanas ( $406 \pm 12,01$ ).

### 5.3 EFEITO DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A RESPOSTA DA PRESSÃO ARTERIAL

#### 5.3.1 Resposta hipotensora ao nitroprussiato de sódio

A resposta hipotensora (índice médio em mmHg) desencadeada pela injeção de doses crescentes de nitroprussiato de sódio, mostrou-se significativamente aumentada nos animais tratados por uma ( $5,48 \pm 1,07$ ;  $n=12$ ), duas ( $7,42 \pm 1,04$ ;  $n=12$ ) e quatro semanas ( $6,71 \pm 1,07$ ;  $n=13$ ) quando comparadas ao grupo controle ( $2,48 \pm 0,48$ ;  $n=11$ ). Não houve diferença considerando o tempo de tratamento entre os grupos. Os resultados são mostrados na (FIGURA 5).

#### 5.3.2 Resposta pressora à fenilefrina

A resposta pressora (índice médio em mmHg) desencadeada pela injeção de doses crescentes de fenilefrina mostrou-se sem alteração significativa entre o grupo controle ( $4,51 \pm 0,39$ ;  $n=11$ ) e os tratados por uma ( $5,48 \pm 0,24$ ;  $n=12$ ), duas ( $5,67 \pm 0,28$ ;  $n=12$ ) e quatro semanas ( $5,13 \pm 0,65$ ;  $n=13$ ).

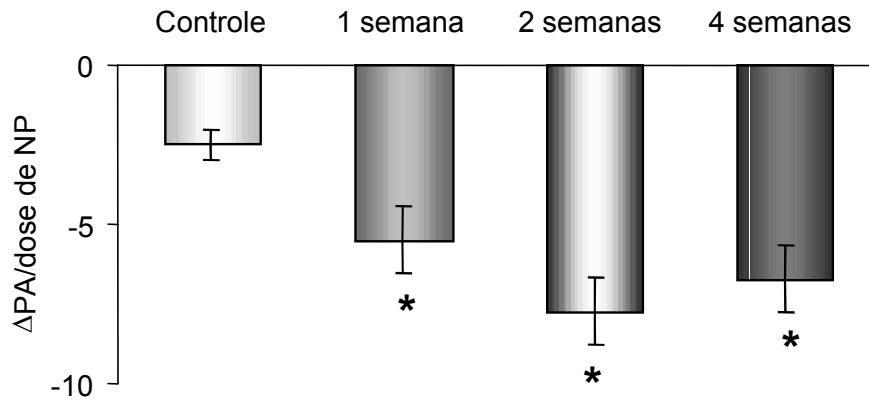


FIGURA 5 – Resposta hipotensora (índice/inclinação da reta) pela injeção de nitroprussiato de sódio. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

#### 5.4 EFEITO DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A SENSIBILIDADE DO REFLEXO PRESSORRECEPTOR ANALISADA PELO ÍNDICE DE SENSIBILIDADE

##### 5.4.1 Taquicardia reflexa

A resposta taquicárdica ( $\Delta FC/\Delta PAM$ ; índice médio em bpm/mmHg), decorrentes das quedas de PAM produzidas pelas injeções de doses crescentes de nitroprussiato de sódio, foi significativamente reduzida nos animais tratados por uma ( $1,10 \pm 0,15$ ), duas ( $0,79 \pm 0,15$ ) e quatro semanas ( $0,98 \pm 0,10$ ) quando comparados aos controles ( $3,16 \pm 0,27$ ) (FIGURA 6). Não houve diferença entre os grupos tratados.

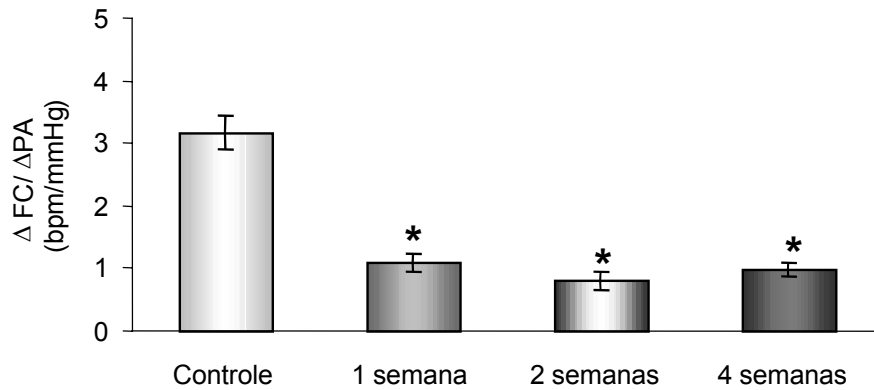


FIGURA 6 – Resposta taquicárdica (índice médio em bpm/mmHg) decorrente da injeção de nitroprussiato de sódio. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

#### 5.4.2 Bradicardia reflexa

A resposta bradicárdica (índice médio em bpm/mmHg), decorrente dos aumentos da PAM produzidas por injeções de doses crescentes de fenilefrina, não diferiu significativamente entre o grupo controle ( $1,58 \pm 0,14$ ;  $n=11$ ) e os tratados por uma ( $1,76 \pm 0,23$ ;  $n=12$ ), duas ( $1,71 \pm 0,19$ ;  $n=12$ ) e quatro semanas ( $1,79 \pm 0,26$ ;  $n=13$ ). Os resultados são representados pelas médias  $\pm$  erro padrão.

### 5.5 SENSIBILIDADE DO REFLEXO PRESSORRECEPTOR ANALISADA PELA CURVA SIGMÓIDE



A TABELA 1 e a FIGURA 7 mostram a sensibilidade do reflexo pressorreceptor para a frequência cardíaca, avaliada a partir do ajuste de uma equação logística sigmoidal aos dados de pressão arterial média e frequência cardíaca.

#### 5.5.1 Ganho médio do barorreflexo

Observou-se uma diminuição significativa no ganho da equação logística sigmoidal (bpm/mmHg) entre os grupos tratados por uma, duas e quatro semanas, quando comparados ao grupo controle. Esses resultados expressam uma diminuição no controle reflexo da frequência cardíaca, frente à variações da pressão arterial média, provocadas pela injeções de drogas vasoativas (TABELA 1; FIGURA 7).

#### 5.5.2 Ponto de equilíbrio da curva sigmóide

O ponto de equilíbrio da pressão ( $PAM_{50}$  em mmHg), determinado pelas correções na frequência cardíaca (bpm), visto na curva sigmóide como resultado das injeções em doses crescentes de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, diferiu significativamente entre os grupos (TABELA 1; FIGURA 7).

### 5.5.3 Variações da frequência cardíaca

A frequência cardíaca máxima, e mínima (bpm); e a faixa de variação da frequência cardíaca ( $\Delta$ bpm) da curva sigmóide, não diferiram significativamente entre os grupos (TABELA 1; FIGURA 7).

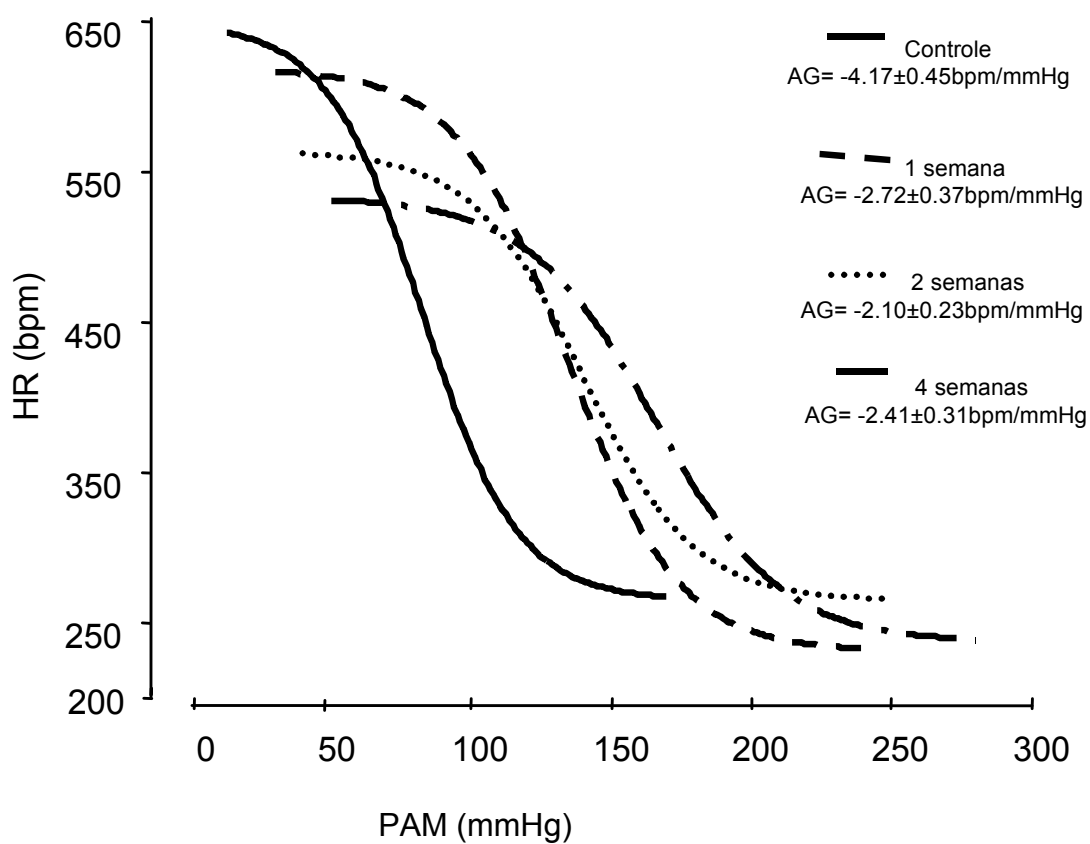


FIGURA 7 – Apresentação gráfica do ajuste logístico sigmoidal médio dos ratos tratados e controles. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão.

TABELA 1 – Sensibilidade do reflexo pressorreceptor para a frequência cardíaca, avaliada a partir do ajuste de uma equação logística sigmoideal aos dados de pressão arterial média e frequência cardíaca.

	Controles (n=10)	1 semana (n=11)	2 semanas (n=11)	4 semanas (n=09)
Ganho (bpm/mmHg)	-4,17 ± 0,45	-2,72 ± 0,37*	-2,10 ± 0,23*	-2,41 ± 0,31*
MAP <sub>50</sub> (mmHg)	82,4 ± 3,9	134,5 ± 16*	139,9 ± 9,4*	165,4 ± 8,2*‡
FC máx. (bpm)	653 ± 41,5	623 ± 43,9	570 ± 27,9	537 ± 24,2
FC mín. (bpm)	269 ± 17,1	235 ± 18,1	269 ± 38,8	241 ± 39,4
Δ FC (bpm)	384 ± 49,8	387 ± 54,2	299 ± 50,7	296 ± 46,1

Os valores apresentados representam as medias ± erro padrão.

\* p<0,05 em relação ao grupo controle.

‡ p<0,05 em relação ao grupo de uma semanas de tratamento.

## 5.6 EFEITO DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A SENSIBILIDADE DO REFLEXO CARDIOPULMONAR

### 5.6.1 Resposta hipotensora

A queda da PAM (mmHg) induzida por doses crescentes de serotonina (respostas hipotensoras) foi maior nos grupos tratados por uma (-28,41 ± 2,16; n=12), duas semanas (-28,95 ± 2,01; n=12), e quatro semanas (-31,57 ± 1,97; n=13) do que no grupo controle (-14,81 ± 2,27; n=11), (FIGURA 8). Entretanto,

o tempo de tratamento não modificou a queda da PAM nos animais que receberam L-NAME.

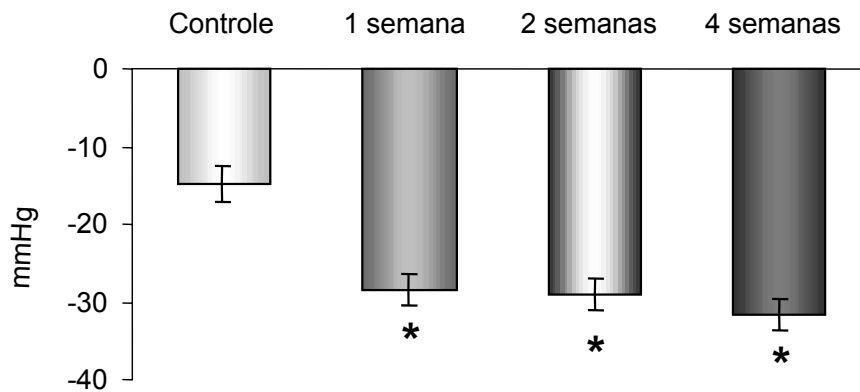


FIGURA 8 – Respostas hipotensoras, em mmHg, decorrentes das injeções de serotonina. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

#### 5.6.2 Bradicardia reflexa

Da mesma forma, a bradicardia reflexa (bpm) produzida pela estimulação dos receptores cardiopulmonares pela serotonina, foi maior nos grupos tratados por uma ( $-109,28 \pm 7,99$ ;  $n=12$ ), duas semanas ( $-114,73 \pm 7,44$ ;  $n=12$ ), e quatro semanas ( $-122,01 \pm 7,27$ ;  $n=13$ ) do que no grupo controle ( $-77,84 \pm 8,38$ ;  $n=11$ ), (FIGURA 9).

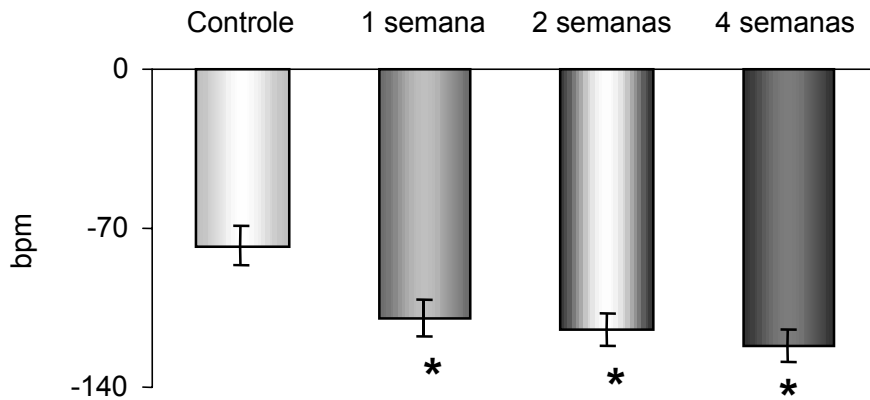


FIGURA 9 – Resposta bradicárdica, em bpm, produzida pela estimulação dos receptores cardiopulmonares pela serotonina. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão.

\* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle

## 5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PARASSIMPÁTICA SOBRE A RESPOSTA REFLEXA (HIPOTENSORA E BRADICÁRDICA) PRODUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO DOS RECEPTORES CARDIOPULMONARES COM SEROTONINA

### 5.7.1 Reflexo cardiopulmonar após bloqueio com atropina

O bloqueio com atropina reduziu a resposta hipotensora em todos os grupos. Entretanto a queda reflexa da PAM continuou sendo maior nos grupos tratados por uma ( $-8,09 \pm 0,90$ ;  $n=7$ ), duas ( $-6,46 \pm 0,83$ ;  $n=8$ ) e quatro semanas ( $-9,95 \pm 0,90$ ;  $n=7$ ) do que os controle ( $-2,32 \pm 0,92$ ;  $n=6$ ). Também

houve diferença significativa na hipotensão entre duas e quatro semanas de tratamento (FIGURA 10).

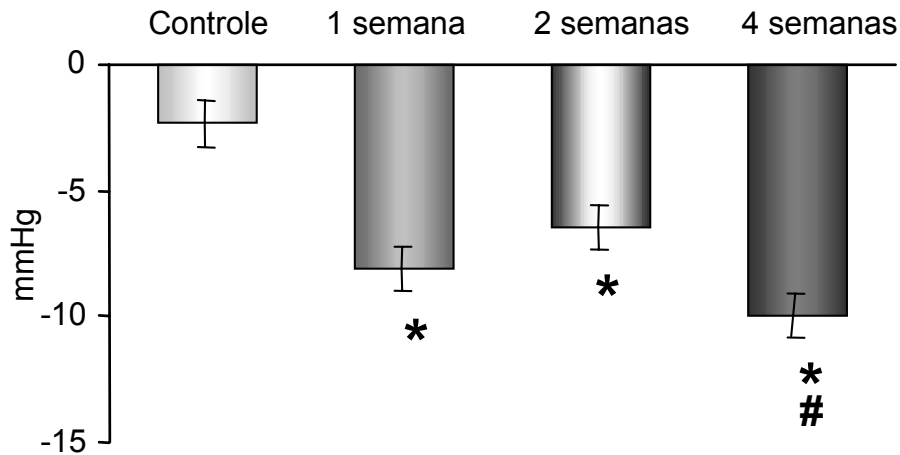


FIGURA 10 – Resposta hipotensora (mmHg) decorrente das injeções de serotonina após bloqueio com atropina. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle

#  $p < 0,05$  em relação ao grupo de duas semana de tratamento.

Da mesma forma, a atropina reduziu de modo importante a bradicardia reflexa em todos os grupos, abolindo as diferenças observadas previamente ao bloqueio do vago. Esses resultados sugere que essas diferenças se deveram ao parassimpático cardíaco. As respostas não diferiram entre os grupos controle (-8,34  $\pm$  1,04; n=6), uma (-8,33  $\pm$  1,09; n=7), duas (-6,48  $\pm$  1,00; n=8) e quatro semanas (-9,41  $\pm$  1,70; n=7).

## 5.8 EFEITO DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A SENSIBILIDADE DO REFLEXO COMANDADO PELOS QUIMIORRECEPTORES

### 5.8.1 Resposta pressora

As respostas pressoras desencadeadas pela estimulação dos quimiorreceptores por doses crescentes de KCN e expressas em variação percentual da PAM, aparecem na TABELA 2 e na FIGURA 11.

**TABELA 2 – Percentagens das respostas pressoras resultantes das injeções de doses crescentes de cianeto de potássio.**

	Controles (n=11)	1 semana (n=12)	2 semanas (n=12)	4 semanas (n=13)
100µg/kg (k2)	37,00± 5,42	26,14 ± 4,06	42,02 ± 2,99	36,40 ± 3,42
120µg/kg (k3)	48,00± 5,13	35,64 ± 4,78	42,31 ± 4,01	40,01± 2,93
140µg/kg (k4)	56,00± 6,33	33,36 ± 4,59*	47,68 ± 5,42	37,22 ± 2,46*
180µg/kg (k5)	54,00± 4,52	33,74 ± 3,79*	41,27 ± 3,43*	38,26 ± 3,23*

Os valores apresentados representam as médias ± erro padrão.

\* p<0,05 em relação ao grupo controle.

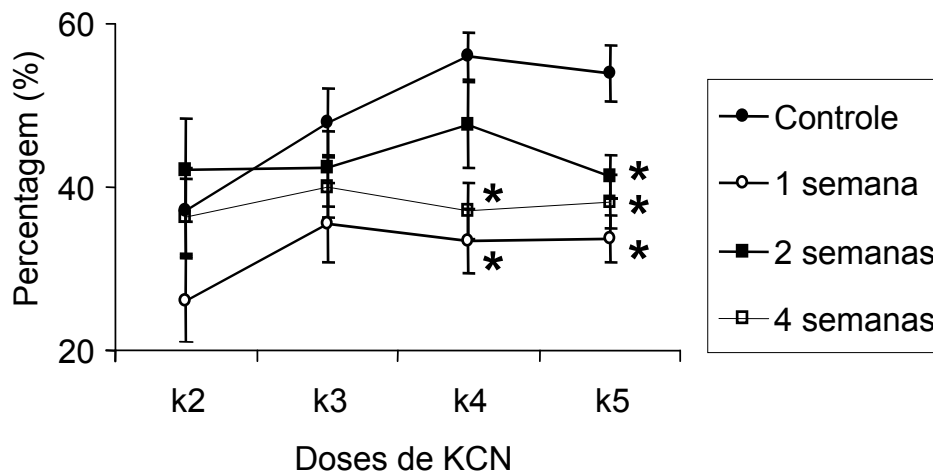


FIGURA 11 – Resposta hipertensora, em percentagem, decorrente das injeções de cianeto de potássio (K2=100 $\mu$ g/kg; K3=120 $\mu$ g/kg; K4=140 $\mu$ g/kg; K5=180 $\mu$ g/kg). Os valores representam medias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle

### 5.8.2 Resposta bradicárdica

A bradicardia reflexa induzida pela estimulação dos quimiorreceptores a partir da FC basal, expressa em variação percentual, diferiu entre os grupos tratados por uma (-42,97  $\pm$  2,23; n=12) e duas (-55,79  $\pm$  2,21; n=12) semanas. Quatro semanas (-50,80  $\pm$  2,25; n=13) de tratamento e grupo controle (48,99  $\pm$  2,47; n=11) não diferiram entre si e dos demais grupos (FIGURA 13).



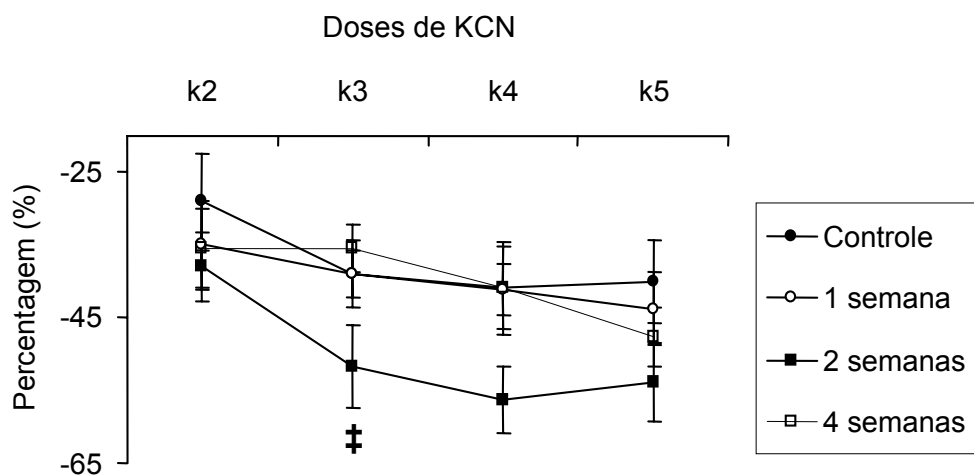


FIGURA 12 – Resposta bradicárdica, em percentagem, às injeções de doses crescentes de KCN (K2=100 $\mu$ g/kg; K3=120 $\mu$ g/kg; K4=140 $\mu$ g/kg; K5=180 $\mu$ g/kg). Os valores representam medias  $\pm$  erro padrão.

‡  $p < 0,05$  em relação ao grupo de uma semana de tratamento.

### 5.8.3 Relação entre dose (KCN) e efeito ( $\Delta$ PAM)

A correlação linear (FIGURA 13) mostra o comportamento da %PAM para cada injeção de KCN. Observa-se que no grupo controle existe uma significativa correlação positiva ( $r$  próximo de 1) entre as doses de KCN e os aumentos na %PAM, enquanto nos animais tratados esta correlação positiva perde significância.

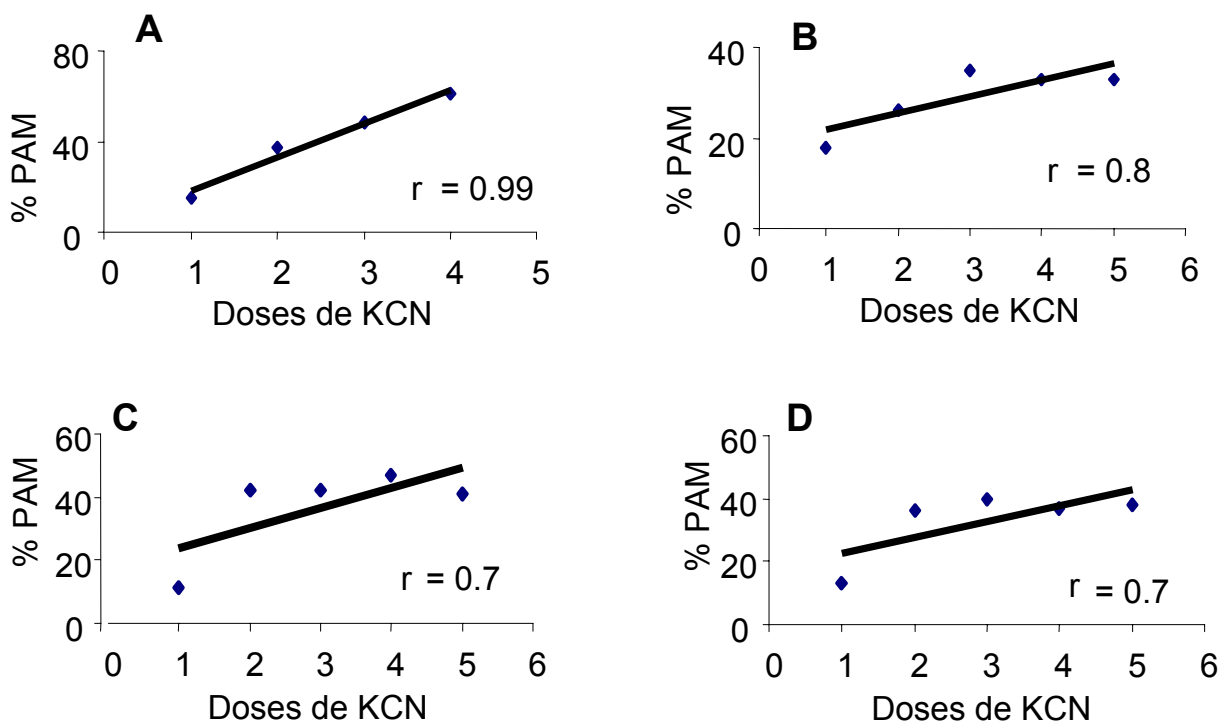


FIGURA 13 – Correlações entre as doses de KCN (K1=60 $\mu$ g/kg; K2=100 $\mu$ g/kg; K3=120 $\mu$ g/kg; K4=140 $\mu$ g/kg; K5=180 $\mu$ g/kg) e as variações na %PAM. Letra **A**= grupo controle ( $p < 0,05$ ); **B**= 1 semana; **C**= 2 semanas e **D**= 4 semanas de tratamento.

## 5.9 AVALIAÇÕES MORFOMÉTRICAS

### 5.9.1 Peso do coração e índice de hipertrofia

O tratamento com L-NAME alterou significativamente o índice de hipertrofia, porém não alterou o peso do coração. Os animais tratados por duas e quatro semanas apresentaram um índice de hipertrofia significativamente aumentado quando comparados aos controles. Não houve diferença

significativa quanto ao índice entre uma semana de tratamento e controles (TABELA 3).

**TABELA 3 – Índice de hipertrofia dos grupo controle e tratados**

	Controles (n=6)	1 semana (n=10)	2 semanas (n=14)	4 semanas (n=17)
Peso(g)	0,73± 0,17	0,72 ± 0,11	0,76 ± 0,15	0,85 ± 0,17
Índice (mg/g)	2,8± 0,11	3,3 ± 0,17	3,6 ± 0,91*	3,6 ± 0,15*

Os valores apresentados representam as medias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle

Foi obtida uma correlação positiva ( $r=0,9$ ;  $p \leq 0,05$ ) entre a PAM (mmHg) e o índice de hipertrofia, mostrando que quanto maiores os valores de pressão arterial maior a hipertrofia cardíaca (FIGURA 14).

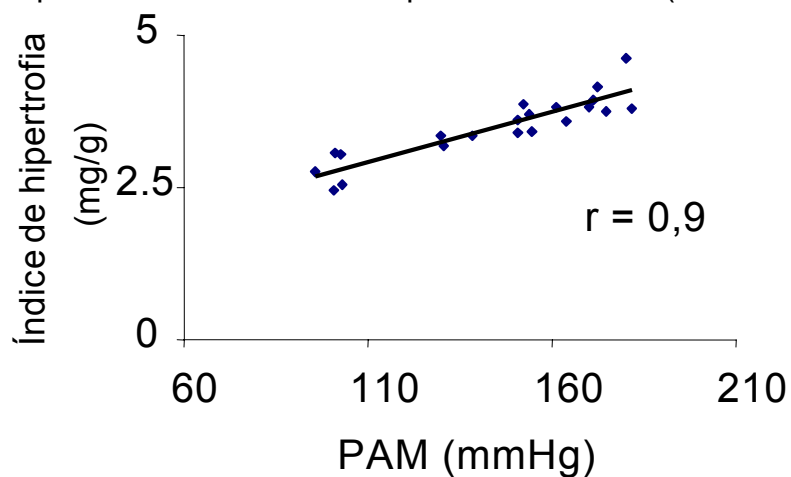


FIGURA 14 – Correlações entre a PAM e o índice de hipertrofia cardíaca ( $p < 0,05$ ).

### 5.9.2 Peso corporal

O peso corporal dos animais diferiu significativamente entre uma e duas semanas de tratamento. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e quatro semanas quando comparados entre si e aos demais grupos. O peso foi obtido no final do tratamento quando foram iniciados os registros de pressão arterial ou imediatamente antes dos animais serem mortos (TABELA 4).

TABELA 4 – Peso corporal dos animais controle e tratados

	Controles (n=11)	1 semana (n=12)	2 semanas (n=12)	4 semanas (n=13)
Peso (g)	219 ± 25	244 ± 35	208 ± 33‡	235 ± 26

Os valores apresentados representam as médias  $\pm$  erro padrão.

‡  $p < 0,05$  em relação ao grupo de uma semana de tratamento.

## 5.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 5.10.1 Quimiluminescência

Os valores de QL nos eritrócitos (contagem por segundo/mg de proteína) mostraram-se significativamente diferentes entre o grupo tratado por um mês ( $5185 \pm 521$ ;  $n=5$ ) e os grupos controle ( $7543 \pm 296$ ;  $n=5$ ) e uma semana ( $7148 \pm 509$ ) de tratamento (FIGURA 15).

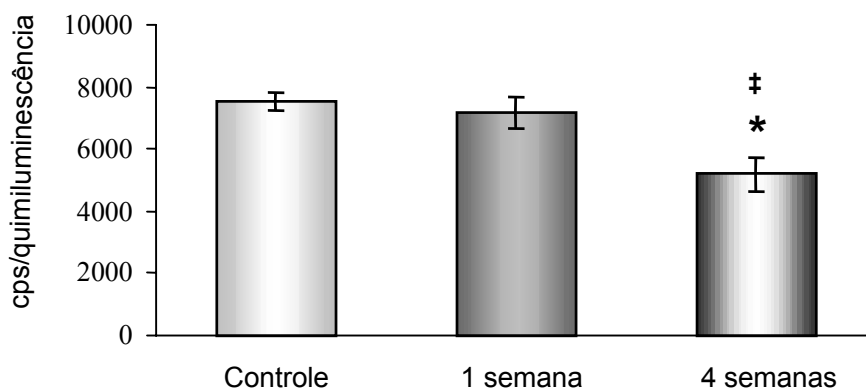


FIGURA 15 – Quimiluminescência é apresentada em contagem por segundo por mg de proteína (cps/mg de proteína). Os valores representam medias  $\pm$  erro padrão.

\* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

‡  $p < 0,05$  em relação ao grupo de uma semana de tratamento.

#### 5.10.2 Atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos

##### 5.10.2.1 Catalase

A atividade da CAT (pmoles/mg de proteína) apresentou-se significativamente diferente quando comparados o grupo controle ( $0,804 \pm 0,047$ ;  $n=7$ ) com os grupos tratados por duas ( $1,436 \pm 0,114$ ;  $n=7$ ) e quatro semanas ( $1,784 \pm 0,111$ ;  $n=10$ ). O grupo tratado por uma semana ( $0,675 \pm 0,034$ ;  $n=5$ ) também apresentou diferença significativa daqueles tratados por duas ( $1,436 \pm 0,114$ ;  $n=7$ ) e quatro semanas ( $1,784 \pm 0,111$ ;  $n=10$ ), (FIGURA 16).

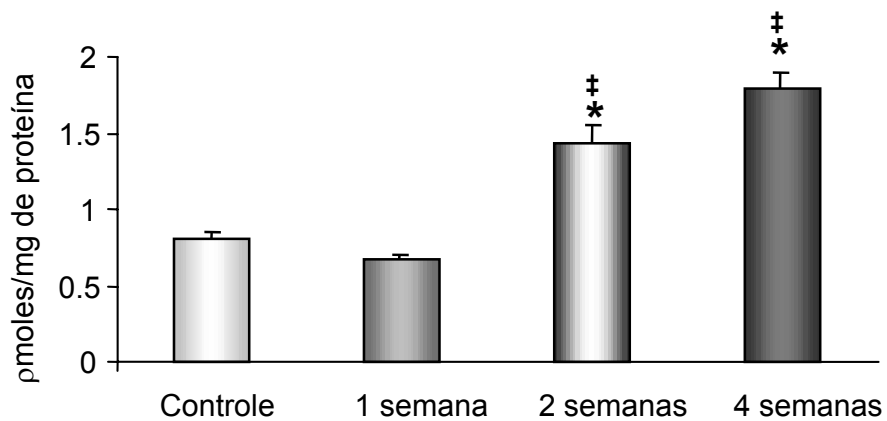


FIGURA 16 – Atividade da catalase apresentada em  $\mu\text{moles/mg}$  de proteína.

Os valores representam medias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

‡  $p < 0,05$  em relação ao grupo de uma semana de tratamento.

#### 5.10.2.2 Superóxido dismutase

Os valores da atividade da SOD (U SOD/mg de proteína) mostraram-se diferentes significativamente somente entre os grupos controle ( $14,99 \pm 2,51$ ;  $n=5$ ) e quatro semanas ( $29,21 \pm 1,67$ ;  $n=6$ ) de tratamento. Os grupos tratados por uma ( $20,71 \pm 1,88$ ;  $n=6$ ) e duas ( $23,05 \pm 2,65$ ;  $n=7$ ) semanas não diferiram (FIGURA 17).

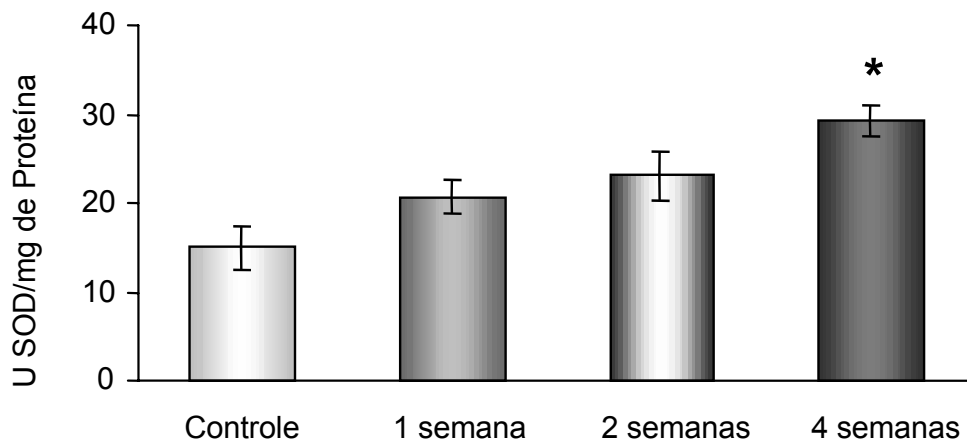


FIGURA 17 – Atividade da superóxido dismutase apresentada em U SOD/mg de proteína. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo de uma semana de tratamento.

#### 5.10.2.3 Glutathiona peroxidase

A atividade da GPx (nmoles/min./mg de proteína) diferiu significativamente entre os grupos controle ( $1,24 \pm 0,09$ ;  $n=5$ ), uma ( $3,25 \pm 0,65$ ;  $n=5$ ) e duas semanas ( $4,29 \pm 0,24$ ;  $n=5$ ) de tratamento. Os grupos tratados por duas e quatro ( $2,03 \pm 0,46$ ;  $n=6$ ) também apresentaram diferença significativa (FIGURA 18).

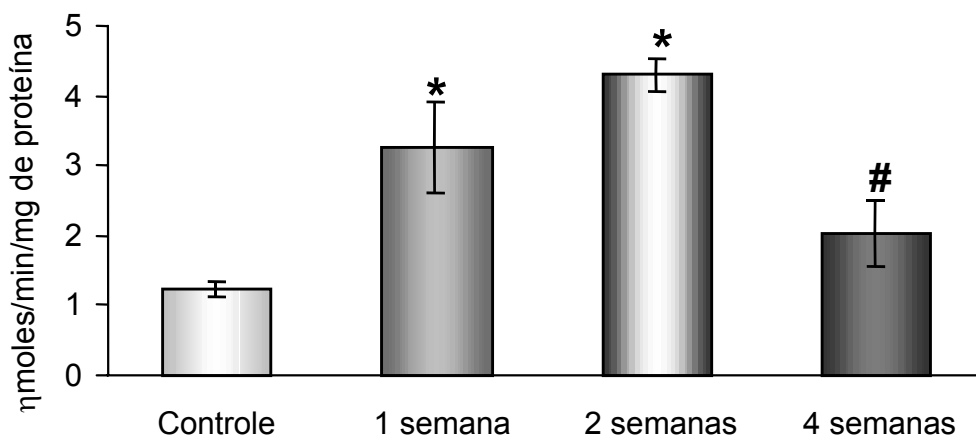


FIGURA 18 – Atividade da glutathione peroxidase expressos em nmoles/min./mg de proteína. Os valores representam medias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

#  $p < 0,05$  em relação ao grupo de duas semana de tratamento.

### 5.10.3 Atividade da renina plasmática

A atividade da renina plasmática (ng de AngI/ml/h) mostrou-se significativamente diferente entre os grupos controle ( $0,52 \pm 0,1$ ;  $n=9$ ) e duas semanas ( $1,09 \pm 0,22$ ;  $n=6$ ). Os grupos tratados por uma ( $0,65 \pm 0,07$ ;  $n=7$ ) e quatro semanas ( $0,77 \pm 0,11$ ;  $n=8$ ) não diferiram (FIGURA 19).



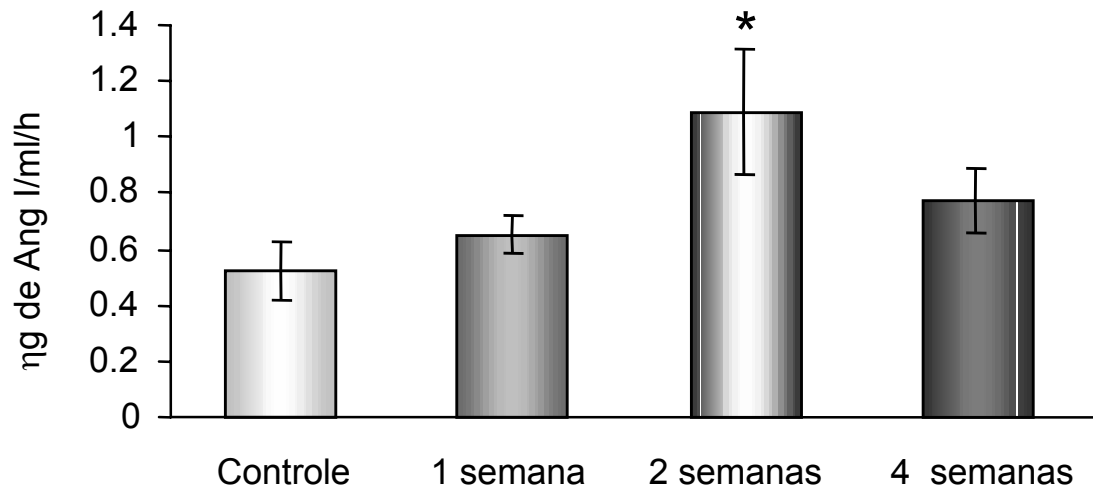


FIGURA 19 – Atividade de renina plasmática (ng de Angiotensina I liberado por ml/hora). Os valores representam medias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Foi obtida uma correlação positiva ( $r=0,7$ ) entre a renina plasmática e a frequência cardíaca, mostrando que a frequência cardíaca é maior quando os níveis de renina plasmática estão aumentados (FIGURA 20).

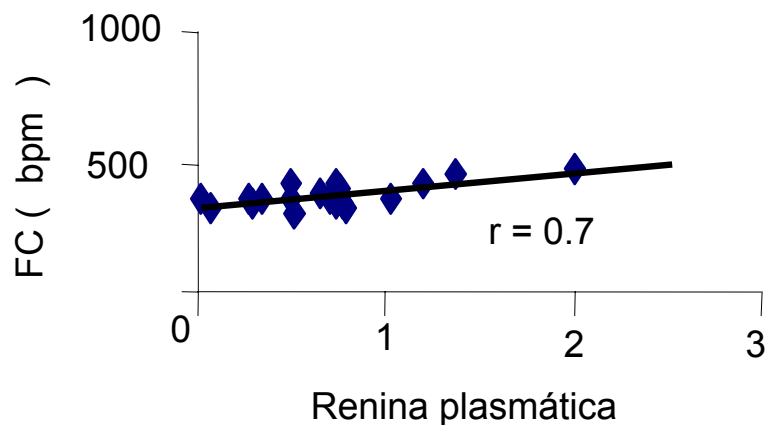


FIGURA 20 – Correlação positiva entre a atividade da renina plasmática (ng de Angiotensina I liberado por ml/hora) e a frequência cardíaca (bpm) ( $p < 0,05$ ).

#### 5.10.4 Medida da atividade da ECA

##### 5.10.4.1 Renal

A dosagem da atividade da ECA no rim (nMoles His-Leu/min./mg de proteína) diferiu significativamente entre os grupos controle ( $5,8 \pm 0,53$ ;  $n=8$ ) e uma ( $9,1 \pm 0,60$ ;  $n=8$ ) semana. Quatro semanas de tratamento foi diferente de uma e duas semanas ( $8,1 \pm 0,81$ ;  $n=8$ ) de tratamento. O grupo tratado por quatro ( $5,5 \pm 0,47$ ;  $n=10$ ) não diferiu (FIGURA 21).

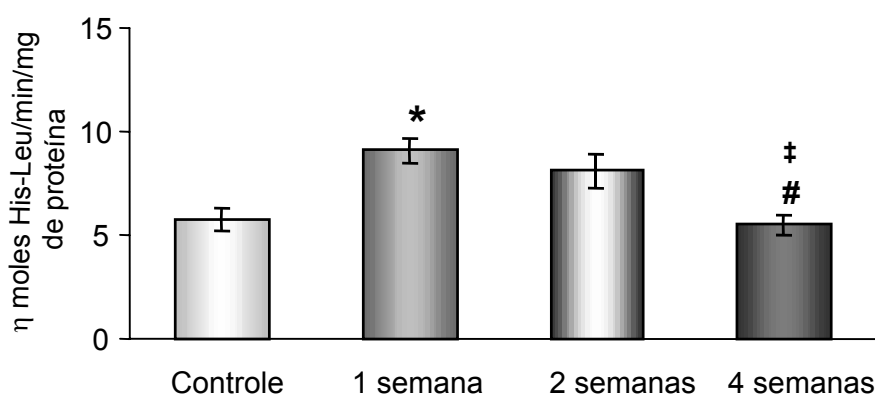


FIGURA 21 – Valores da medida da atividade da ECA no rim (nmoles His-Leu/min./mg de proteína). Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle

‡  $p < 0,05$  em relação ao grupo de uma semana de tratamento

#  $p < 0,05$  em relação ao grupo de duas semana de tratamento

A medida da atividade da ECA no rim foi inversamente correlacionada ( $r = -0,8$ ) com o consumo total de L-NAME, demonstrando que quanto maior o consumo de L-NAME, menor a atividade da ECA renal (FIGURA 22).

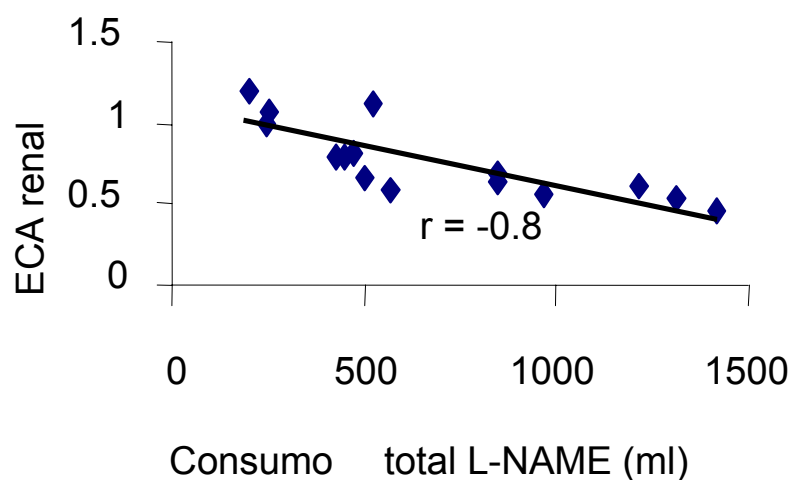


FIGURA 22 – Correlação inversa entre o consumo total de L-NAME e da atividade da ECA renal ( $p < 0,05$ )

#### 5.10.4.2 Ventricular

A atividade da ECA no ventrículo (nMoles His-Leu/min./mg de proteína) mostrou-se significativamente diferente entre os grupos controle ( $1,74 \pm 0,21$ ;  $n=7$ ) e duas semanas ( $2,68 \pm 0,18$ ;  $n=9$ ). Os grupos tratados por uma ( $2,44 \pm 0,32$ ;  $n=6$ ) e quatro semanas ( $1,93 \pm 0,16$ ;  $n=9$ ) não diferiram (FIGURA 23).

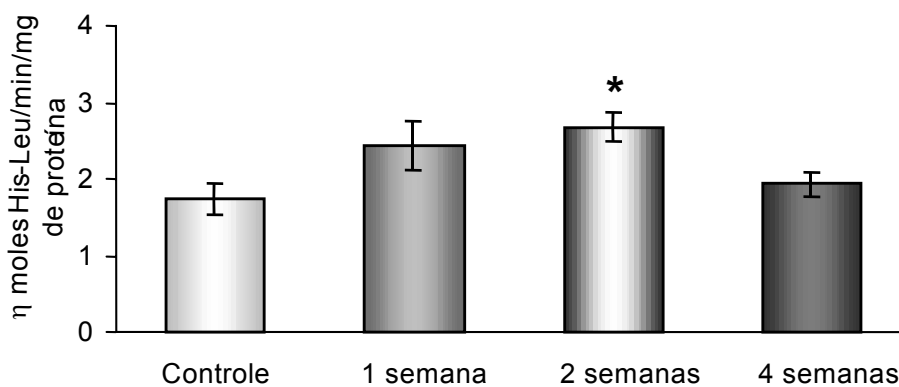


FIGURA 23 – Valores da medida da atividade da ECA no ventrículo (nmoles His-Leu/min./mg de proteína). Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo de uma semana de tratamento.

A atividade da ECA no ventrículo estava positivamente correlacionada à pressão arterial ( $r = 0,7$ ) indicando que quanto maior a PAM (mmHg) maior a atividade da ECA no ventrículo ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 24).

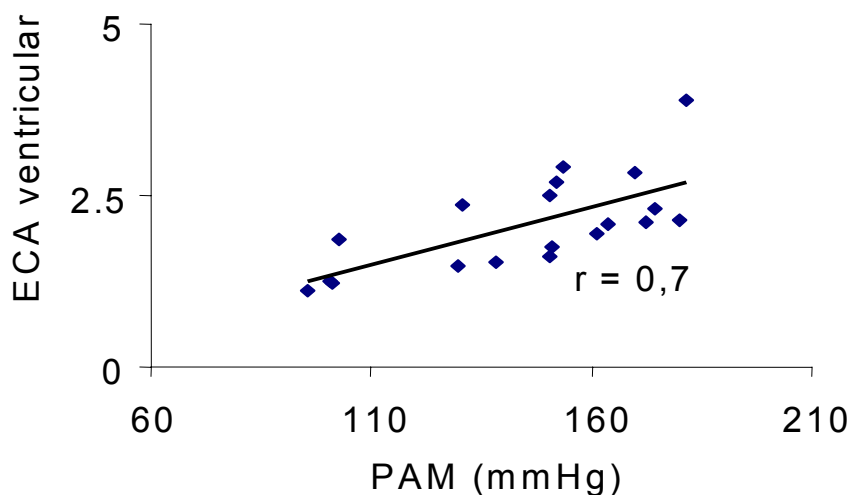


FIGURA 24 – Correlação positiva ( $r=0,7$ ) entre atividade da ECA no ventrículo (nmoles His-Leu/min./mg de proteína) e a PAM (mmHg) ( $p < 0,05$ ).

#### 5.10.4.3 Aórtica

Os valores da medida da atividade da ECA na aorta (nMoles His-Leu/min./mg de proteína) não apresentou-se diferente significativa entre os grupos controle ( $64,88 \pm 7,31$ ;  $n=8$ ), uma ( $54,36 \pm 4,79$ ;  $n=7$ ), duas ( $64,99 \pm 6,19$ ;  $n=9$ ) e quatro semanas ( $74,60 \pm 6,41$ ;  $n=8$ ) de tratamento, porém apresentou correlação positiva com o consumo de L-NAME (FIGURA 25)

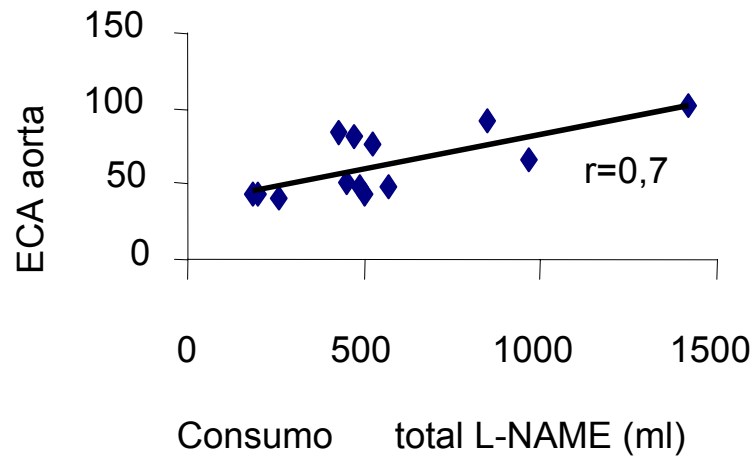


FIGURA 25 – Correlação positiva ( $r=0,7$ ) entre atividade da ECA na aorta (nmoles His-Leu/min./mg de proteína) e o consumo total de L-NAME (ml) ( $p<0,05$ ).

#### 5.10.4.4 Pulmonar

Os valores da medida da atividade da ECA no pulmão (nMoles His-Leu/min./mg de proteína) não mostrou diferença significativa entre os grupos controle ( $189 \pm 9,31$ ;  $n=6$ ), uma ( $212 \pm 23,40$ ;  $n=8$ ), duas ( $193 \pm 24,04$ ;  $n=7$ ) e quatro semanas ( $171 \pm 18,43$ ;  $n=9$ ) de tratamento.

## 6. DISCUSSÃO

O objetivo desta tese foi estudar o efeito temporal do bloqueio da síntese do óxido nítrico, produzido pelo L-NAME, sobre a pressão arterial, a frequência cardíaca e o controle reflexo da circulação: e estudar as alterações bioquímicas do estresse oxidativo e do sistema renina angiotensina, que ocorrem nesse modelo de hipertensão, bem como correlacioná-las com as alterações encontradas no controle reflexo da pressão arterial.

### 6.1 Pressão arterial e frequência cardíaca

O bloqueio da síntese do óxido nítrico administrado na água de beber produziu aumento da PAM, pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) em todos os grupos tratados, independente do tempo de tratamento. Esse aumento não foi entretanto, acompanhado de variação da FC basal uma vez que não se observou diferença entre os grupos tratados e o controle.

Desde a disponibilização dos primeiros bloqueadores da NO sintase (Rees et al. 1989) ficou demonstrado que o bloqueio agudo ou crônico dessa enzima foi capaz de aumentar a PA de forma fugaz ou sustentada (Vasquez et al. 1994; Minami et al. 1995; Gardiner et al. 1990a; Souza et al. 2001; Sander et al. 1997; Cunha et al. 1993). Em 1989, Rees e col. mostraram que a súbita interrupção da síntese de NO com o análogo da L-arginina N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA) marcadamente elevou a PA em coelhos, um efeito que foi

revertido pela administração de L-arginina. Esse achado foi confirmado em várias espécies, incluindo o homem (Filep 1993). Esse efeito agudo entretanto, não significava que o NO era indispensável no controle da circulação de forma crônica, uma vez que outros sistemas vasodilatadores poderiam ser recrutados, a longo prazo, para compensar a deficiência do NO. De fato, depois dos trabalhos de Baylis e col. (1992) e Ribeiro e col. (1982), usando L-NAME em duas diferentes doses, ficou estabelecido que o bloqueio crônico do óxido nítrico pode levar a hipertensão arterial sistêmica. Muitos são os trabalhos na literatura que atualmente referem a hipertensão pelo uso dos bloqueadores da NO sintase (Arnal et al. 1992; Lahera et al. 1992). Entretanto, existem grandes diferenças quanto ao tempo de tratamento e quanto a dose empregada e naturalmente quanto aos mecanismos fisiológicos envolvidos na manutenção da hipertensão nessas circunstâncias. Por exemplo, a ingestão de L-NAME (60-90 mg/dia) durante 6 dias promoveu marcada hipertensão ( $176 \pm 5$  mmHg) em ratos Wistar machos (250-300g de peso corporal) (Vasquez et al. 1994) enquanto o consumo de 50 mg/dia durante duas e meia a três semanas elevou a PAM para  $155 \pm 13$  mmHg, também em ratos Wistar (Banting et al. 1996). Esse mesmo autor observou que a administração aguda de L-NAME (50mg/kg, intraperitonal) elevou a PA de  $109 \pm 10$  para  $145 \pm 15$  mmHg.

Mais recentemente, (Sander et al. 1997) demonstraram que injeções endovenosas de L-NAME produziram aumentos na PAM dose dependente usando 0,5; 1,0; 2,5 e 5mg/kg de L-NAME em ratos "Sprague-Dawley."

Além de todas essas diferenças vale lembrar que o uso de bloqueadores diferentes pode produzir respostas variáveis, dependendo da dose como já foi demonstrado por Gardiner e col. (1990b).

É provável que a hipertensão obtida pela administração aguda ou crônica de curta duração (6-8 dias) esteja relacionada mais a alterações funcionais (Mattson & Wu 2000) enquanto que o bloqueio crônico parece estar associado a complexas alterações estruturais, independente do nível de pressão arterial atingido. Dados de Ribeiro e col. (1992) mostraram que após uma semana de tratamento com L-NAME, a correção da hipertensão pela L-arginina aguda foi apenas parcial. Os mesmos autores mostraram, entretanto, que a retirada do tratamento após quatro semanas, regride a hipertensão, enquanto Morton e col. (1993) observaram hipertensão persistente após suspensão da inibição do NO depois de quatorze semanas de tratamento. No presente trabalho a PAM aumentou em todos os grupos tratados, embora esse aumento tenha sido mais pronunciado após quatro semanas. Esse aumento foi acompanhado pelo aumento do consumo de L-NAME da primeira para a segunda semana, enquanto a PAM não se alterou. Somente na quarta semana, mesmo sem alteração do consumo de L-NAME, a PAM aumentou mais ainda, indicando que outros mecanismos, talvez estruturais, pudessem estar participando.

Da mesma forma que a PA, diferentes ajustes da FC basal acompanham variações agudas ou crônicas da hipertensão pela inibição do NO. No presente estudo, não foi observado alterações da FC basal entre os grupos controle e tratados. Entretanto existem dados na literatura mostrando que o aumento agudo (por administração endovenosa) é acompanhado de bradicardia, um efeito provavelmente mediado pelos pressorreceptores arteriais (Gardiner et al. 1990a) e dependentes da variação aguda da PA. Já as observações feitas até



8 horas após a ingestão espontânea de uma solução de L-NMMA (Gardiner et al. 1990a) não mostrou alterações consistentes de FC, salvo na primeira hora. Considerando que o mecanismo de adaptação dos pressoreceptores arteriais pode se estender até 48 horas, é possível que os valores de FC basais dentro de normalidade após o tratamento com L-NAME sejam devidos não só a adaptação aguda dos pressoreceptores (Krieger 1989) mas também ao comprometimento da função pressoreceptora nesses animais. De fato, trabalhos de Silva e col. (1994) demonstraram que o tratamento com L-NAME reduz a resposta estimulatória induzida pelo isoproterenol. No presente trabalho, uma, duas e quatro semanas de tratamento pela ingestão espontânea de L-NAME na água de beber, não modificou a FC basal. Entretanto, Vasquez e col. (1994) mostraram taquicardia de repouso em animais tratados por seis dias, que foi atribuída ou a retirada quase total do vago (Cunha et al. 1993) ou mesmo ao aumento da atividade simpática para o coração (Souza et al. 2001). Em tratamentos crônicos (Qadri et al. 1999) de até onze semanas (Angelis et al. 1999), não foram observadas alterações tônicas da função vagal ou simpática para o coração, sugerindo que novos ajustes possam ter ocorrido durante esse tempo.

## 6.2 Reflexo pressorreceptor

Um dos mais poderosos mecanismos de controle da PA, momento a momento, é o comandado pelos pressorreceptores arteriais (Krieger 1970). Uma atenuação do reflexo pressorreceptor pode repercutir na variabilidade da PAM e da FC determinando ajustes mais ou menos adequados em

situações de risco como no infarto agudo do miocárdio ou na hipertensão (Parati et al. 2001). Dessa forma, alterações na sensibilidade do controle reflexo da FC ou da PA podem contribuir para o estado hipertensivo (Cat et al. 2001).

No presente estudo, observamos redução da sensibilidade do controle reflexo da FC especialmente com relação a taquicardia, em resposta às quedas de PAM, em todos os grupos tratados. A bradicardia reflexa em resposta aos aumentos de PAM, não foi diferente daquela observada nos animais controle. Nosso objetivo nesse estudo, ao avaliarmos o efeito do tempo de tratamento, foi melhor entender os achados controversos da literatura (Lantelme et al. 1994; Scrogin et al. 1998), uma vez que a melhora ou atenuação do barorreflexo tem sido documentado. Nossos resultados de atenuação confirmam aqueles obtidos após tratamento de curta duração (7 dias) (Souza et al. 2001) ou longa duração (4-5 semanas) (Lantelme et al. 1994), mas algumas considerações se fazem necessárias. A maior parte dos trabalhos avalia a sensibilidade pela equação sigmóide, expressando as variações com um único valor de ganho (Lantelme, 1994; Souza et al. 2001; Scrogin et al. 1994). Em nosso estudo avaliamos que o ganho pela equação da sigmóide estava reduzido e podemos ainda acrescentar que esta redução se deve a taquicardia reflexa, uma vez que a resposta bradicárdica avaliada pelo índice de sensibilidade, não mudou pelo tratamento.

Deve-se ressaltar que nos trabalhos que referem alteração da bradicardia reflexa, seja para aumento de sensibilidade (Vasquez et al., 1994) ou redução (Souza et al. 2001) os animais apresentaram taquicardia basal em menores tempos de tratamento (6-7 dias). É possível que nestas circunstâncias (6-7 dias) e durante a hipertensão de mais longa duração (2 a 5 semanas)

diferentes mecanismos na regulação de FC possam estar participando. Uma das possibilidades é a de que um aumento do tonus simpático para o coração pudesse estar justificando um aumento da FC basal e uma redução na reserva para aumentos desse FC (Souza et al. 2001) assim como justificaria um aumento da reserva para quedas de FC (Vasquez et al. 1994). Nossos animais tratados por 7 dias, entretanto, apresentaram FC basal igual a dos controles, sugerindo um controle autonômico diferente. Entretanto, a redução da resposta de taquicardia poderia indicar não só um aumento do tonus simpático como uma redução do tonus vagal (Cunha et al. 1993). Vale lembrar que 2 ou 4 semanas de tratamento não mudou o padrão de resposta reflexa comandada pelos baroreceptores, embora não possamos excluir mecanismos diferentes envolvidos em respostas reflexas de igual intensidade.

Observando a variação total de FC ( $\Delta FC$ ) obtida pela equação da sigmoide podemos ver que não há diferença entre os grupos, enquanto que a  $PAM_{50}$  e o ganho apresentam variações simultâneas. Entretanto os aumentos de PAM de 63, 69 e 100% em 1, 2 ou 4 semanas de tratamento, são acompanhados de redução do ganho de 35, 50 e 43%, indicando que as mudanças de PA e do controle reflexo resultam de diferentes mecanismos. De fato, se considerarmos a FC máxima obtida pela sigmoide veremos que ela é proporcionalmente menor, começando pelos controles até as 4 semanas de tratamento, mas as diferenças não são significativas. Uma análise de correlação entretanto, mostrou uma relação inversa entre tratamento e FC máxima ( $r=0,9$ ;  $p \leq 0,02$ ) indicando que quanto mais longo o tratamento, menor a reserva máxima de frequência cardíaca. Que fatores estariam contribuindo para isso? Novos ajustes do sistema nervoso autônomo, ou outras alterações.

Um fator a ser considerado é o índice de hipertrofia que está aumentado em 2 e 4 semanas de tratamento. Esse processo sabidamente pode alterar a sensibilidade do baroreflexo, sendo considerado um fator determinante na redução dessa sensibilidade (Banting et al. 1996). Existem na literatura dados de que o déficit do baroreflexo está associado com o desenvolvimento da hipertrofia em SHR (Head & Adams 1988) e que a regressão da hipertrofia ventricular esquerda está associada a uma melhora da sensibilidade dos receptores cardiopulmonares (Grassi et al. 1988). Esses achados remetem a uma possibilidade: a de que poderia haver uma ligação entre o grau de hipertrofia cardíaca e o nível de déficit do baroreflexo. Adams e col. (1995) não encontraram em ratos tratados por L-NAME nem hipertrofia cardíaca, nem redução da sensibilidade dos pressoreceptores.

Tantas diferenças e resultados contraditórios devem ser devidos a diferenças metodológicas tais como duração do tratamento, recuperação da anestesia, diferentes tempos pós operatórios que foram respeitados para testar os reflexos ou mesmo diferenças na sensibilidade dos animais ao bloqueio do óxido nítrico (Forster et al. 2001).

Alterações do arco reflexo comprometendo a via aferente, a integração central e/ou a via eferente podem ser consideradas como responsáveis pela atenuação do baroreflexo. Os aferentes baroreceptores podem ter sua atividade modificada pela falta crônica de óxido nítrico (com o uso de L-NAME), uma vez que não existem evidências de que a função baroreceptora possa ser afetada pelo óxido nítrico (Matsuda et al. 1995). Entretanto, dados não publicados de nosso laboratório não mostraram diferenças na curva de função dos pressoreceptores (atividade do nervo aórtico x PAM) entre ratos normais e

tratados com L-NAME por 7 dias. Existem estudos sugerindo que o NO pode ter um papel na integração central do baroreflexo, principalmente no núcleo do trato solitário (NTS) (Pontieri et al. 1998). Também o NO agindo no NTS poderia levar a um aumento na PAM e na FC (Matsumura et al. 1998). Além desses, vários outros estudos indicam um papel para o NO de regulação central dos reflexos (Hirooka et al. 1996, Kagiya et al. 1997). Dessa forma, a atenuação do controle reflexo da FC observada nesses estudos podem também ser devidas a ação central do L-NAME uma vez que está demonstrado que esse inibidor atravessa a barreira hematoencefálica (Ma et al. 1995).

Como citado anteriormente, alterações da função vagal e da atividade simpática periférica (Cunha et al. 1993) observadas após alguns dias de tratamento, não mais são detectados após 11 semanas (Angelis et al. 1999), sugerindo alterações temporais nas vias eferentes do reflexo. Outro mecanismo que poderia estar envolvido na redução de sensibilidade do baroreflexo, poderia ser a ativação do sistema renina angiotensina, uma vez que está bem estabelecido o papel da angiotensina na redução dessa sensibilidade (Oliveira et al. 1992, Pontieri et al. 1998). Entretanto, um aumento da atividade da renina plasmática só foi observada após duas semanas de tratamento enquanto que a atenuação do baroreflexo ocorreu em todos os tempos de tratamento. Mesmo a correlação positiva entre a atividade da renina plasmática e a FC basal não parece contribuir para o entendimento da sua regulação reflexa, embora maior renina estivesse associada com maior FC de repouso no grupo L-NAME duas semanas. Desta maneira, parece que a inibição do baroreflexo sobre a FC em todos os tempos de tratamento, poderia estar associada a alguma alteração do controle cardiovascular que tivesse

ocorrido também em todos esses tempos.

Uma outra possibilidade que deve ser considerada, é a inter-relação entre os diferentes aferentes responsáveis por diferentes reflexos, uma vez que já se demonstrou a modulação de um grupo de aferentes sobre a função reflexa comandada por outro grupo de receptores (Abboud et al. 1976).

### 6.3 Reflexo Cardiopulmonar

De fato, o reflexo mediado pelos receptores cardiopulmonares esteve em todos os tempos de tratamento, exacerbado nos animais hipertensos no presente estudo.

A importância dos reflexos cardiopulmonares na regulação cardiovascular tem sido reconhecida há mais de um século (Bezold & Hirt, 1867). A maioria dos estudos sobre esses reflexos tem sido feita em cães e gatos, mas nos últimos quinze anos um crescente número de trabalhos tem sido realizados no rato e no homem, inclusive no nosso laboratório (Consolim-Colombo et al. 2000, Oliveira et al. 1999). Estes receptores estão localizados em diferentes estruturas da região cardiopulmonar incluindo o átrio, ventrículos, vasos pulmonares e parênquima pulmonar (Kappagoda et al. 1972) o que torna seu estudo muito difícil. Os sinais neurais seriam conduzidos através de fibras vagais não mielinizadas e em menor número, mielinizadas (Thoren 1979). Os efeitos reflexos da estimulação dos receptores cardiopulmonares podem induzir alterações na mesma direção. Por exemplo, a infusão de volume induz um aumento simultâneo na FC e na PA (reflexo de Bainbridge) e a ativação de receptores ventriculares mediados pelo vago induz simultaneamente

bradicardia e hipotensão (o reflexo de Bezold-Jarisch). Os sinais aferentes dos receptores cardiopulmonares são integrados centralmente no tronco cerebral.

No presente estudo, o reflexo de Bezold-jarish (ou reflexo cardiopulmonar) foi determinado por injeções crescentes em bolus de serotonina e as respostas de FC e da PA, bradicardia e hipotensão, foram sempre maiores nos animais hipertensos. Essas respostas normalmente são medidas por ativação do vago, e inibição do simpático, respectivamente (Thoren 1979). Na hipertensão renovascular existem relatos de atenuação do reflexo cardiopulmonar em coelhos, cães (Kezdi 1976, Mohanty et al. 1986) e ratos (Thames & Johnson 1985). Na hipertensão humana tem sido demonstrado que o reflexo cardiopulmonar está aumentado, normal ou mesmo diminuído (Zanchetti & Mancia 1991).

Alterações deste reflexo na hipertensão parecem ser secundários ao estado hipertensivo, e além disso, acompanhados de hipertrofia cardíaca. Esta hipótese tem suporte em estudos no homem mostrando um aumento da resposta reflexa em hipertensos limítrofe e normalidade da resposta em hipertensos moderados, ambos sem evidências ecocardiográfica e eletrocardiografica de hipertrofia cardíaca. Por outro lado, em hipertensos severos e com hipertrofia cardíaca, a resposta reflexa estava atenuada. Além disso a regressão da hipertrofia está associada com a melhora das respostas à ativação dos receptores cardiopulmonares (Zanchetti & Mancia 1991).

Nossos resultados comparados a esses da literatura, parecem paradoxais. Não só observamos aumento da sensibilidade do reflexo comandado pelos receptores cardiopulmonares em todos os tempos de tratamento, como a hipertensão pelo bloqueio do NO foi acompanhada de

hipertrofia cardíaca, aqui expressa pela relação peso do coração/peso corporal. E note-se, não houve diferença entre o peso corporal dos animais nos diferentes grupos. Assim, observamos aumento da resposta de bradicardia e aumento da resposta de hipotensão, sugerindo maior ativação do vago e maior retirada do simpático. O bloqueio com a atropina mostrou uma redução de mais de três vezes nessas respostas de bradicardia e hipotensão, tanto nos controles como nos grupos hipertensos.

Entretanto, mesmo reduzida, a resposta de hipotensão manteve-se maior nos hipertensos, sugerindo que à uma mesma intensidade de estímulo dos cardiopulmonares, a resposta de retirada do simpático foi maior.

Como explicar esse aumento na resposta reflexa em presença de hipertensão e de hipertrofia, dois fatores que solidamente contribuem para a redução dos reflexos elicitados por estimulação dos receptores cardiopulmonares?

Sabidamente, o processo de hipertrofia cardíaca pode levar a uma modificação estrutural do arranjo das fibras miocárdicas relacionado com redução da resposta dos receptores cardiopulmonares nessa condição. Os achados de redução das respostas reflexas elicitadas pelos cardiopulmonares em atletas normotensos e com hipertrofia ventricular esquerda (Giannattasio 1990), bem como em ratos com hipertrofia induzida por catecolaminas sem alteração de PA (Meyrelles et al. 1994), confirmam esta idéia.

Deve-se considerar, entretanto, que os aferentes vagais aqui estimulados pela serotonina são provavelmente fibras C-vagais que se originam da região cardiopulmonar (Thoren 1979). Estímulos mínimos ou variações dos volumes e das pressões intra-cardíacas são capazes de



estimular esse aferentes (Thames & Johnson 1985). O modelo de hipertensão pelo bloqueio do NO induz uma provável redução dos volumes de sangue e plasmáticos (Balaszczuk et al. 2002) sugerindo que a contração cardíaca na sístole ocorre em um ventrículo com um reduzido volume. Ora, esta parece ser uma situação experimental que simula o que ocorre na síncope vaso-vagal, onde existe também um aumento da sensibilidade dos cardiopulmonares, que ativados, levam a uma grande bradicardia e hipotensão com perda da consciência nos indivíduos acometidos (SRA 1993). Em outras palavras, indivíduos suscetíveis e que portanto sofrem da chamada síndrome neurocardiogênica, quando em ortostatismo deslocam o sangue para os membros inferiores. Os barorreceptores arteriais assim ativados induziriam um aumento da atividade simpática sobre o coração levando a um aumento da contratilidade cardíaca. Esse aumento resultaria em estímulo poderoso conduzido por fibras C vagais, que provocariam a resposta clássica de bradicardia e hipotensão.

De fato, resultados de nosso laboratório ainda não publicados mostram redução do débito cardíaco e do volume sistólico de animais tratados com L-NAME por 7 dias acompanhado do aumento da resposta reflexa dos cardiopulmonares (De Angelis et al., 2000).

Dessa forma, parece que a redução dos volumes intracardíacos e a ativação do simpático sobre o coração poderia ser relativamente mais importante em aumentar, do que a hipertrofia em reduzir a sensibilidade do reflexo cardiopulmonar nesse modelo.

Outra questão interessante nesse sentido é a idéia de que a importância relativa de um estímulo ou fator na sensibilidade de um reflexo, depende do

balanço final entre fatores estimuladores ou inibidores. Por exemplo, sabe-se que um dos mais importantes moduladores da atividade simpática renal é o reflexo cardiopulmonar. Pequenas variações de volume ou distensão do átrio levam a uma importante redução da atividade simpática renal (Thames 1978). É possível que nos nossos animais hipertensos o aumento da sensibilidade dos cardiopulmonares evidenciado pela maior bradicardia e hipotensão, não cause inibição semelhante de atividade simpática renal, uma vez que já se demonstrou aumento da atividade simpática renal nesse modelo de hipertensão (Matsuoka et al. 1994). Em outras palavras parece que não ocorre redução da atividade simpática que levaria ao aumento do volume urinário de água e sal nesse modelo, uma vez que homeostaticamente pode ser mais importante regular volume, mesmo as custas da PA elevada. Dados anteriores do nosso laboratório, em animais diabéticos, evidenciaram que a expansão de volume nesses animais não reduz a atividade simpática renal como ocorre nos normais, pois a regulação do volume parece ser prioritária nesse modelo (Oliveira et al. 1999).

Finalizando, deve-se levar em conta que o aumento de sensibilidade dos cardiopulmonares pode estar associado a redução de sensibilidade do baroreflexo nesse modelo, uma vez que essa associação parece ocorrer em todos os tempos de tratamento. Está bem estabelecido que a variação da sensibilidade dos reflexos com fibras aferentes vagais module a integração central do baroreflexo (Abboud et al. 1976).

## 6.4 Quimiorreflexo

O quimiorreflexo tem sido estudado como um dos componentes neurais da regulação da PA (Marshall 1987). Um grande número de evidências da literatura tem mostrado que os quimiorreceptores periféricos não só contribuem para o controle da ventilação, mas também participam dos mecanismos neurais envolvidos no controle da PA (Sun et al. 1995).

Mudanças na atividade dos aferentes quimiorreceptores especialmente hipóxia severa, causam respostas reflexas primárias sobre o sistema cardiovascular; elicitam ajustes centrais na ventilação e na função cardiovascular como uma tentativa de manter uma perfusão adequada aos diferentes órgãos e tecidos (Mifflin 1992).

No presente estudo, as respostas hipertensoras desencadeadas pela administração do KCN (TABELA 2) não se modificam nas doses menores, mas estão reduzidas nas doses maiores nos animais tratados por uma, duas e quatro semanas, quando comparadas ao grupo controle.

Sabendo que as respostas hipertensoras dependem de ativação do simpático, e reconhecendo que pode haver hiperatividade simpática para diferentes territórios (Souza et al. 2001), a redução dessas respostas pode estar relacionada com uma menor reserva em face de um maior nível tônico. Por outro lado, a observação da figura 11 sugere que os grupos tratados não modificam a resposta hipertensora a medida que a dose de KCN foi aumentando. Por esse motivo, as diferenças observadas são só nas doses maiores, onde o controle apresentou resposta significativa. De fato, se observarmos a figura 13, veremos que a relação dose (KCN)/efeito ( $\Delta\%$ PAM) só foi significativa no grupo controle (A). Isso poderia indicar saturação das respostas nos grupos tratados desde a primeira dose, pois a medida que aumenta a dose, não se modifica a resposta de hipertensão. É possível que se tivéssemos usado dose menores de KCN pudéssemos ver essas respostas nos animais hipertensos. Pelos resultados que dispomos podemos apenas dizer

que os grupos hipertensos respondem igual ou de forma reduzida quando comparados ao grupo controle.

A análise de resposta de bradicardia induzida pela administração de KCN foi semelhante em todos os grupos, exceto por uma resposta maior observada nos animais tratados por duas semanas. De fato, a figura 12 mostra mais claramente que o grupo de duas semanas de L-NAME apresentou as maiores bradicardias. Considerando os resultados obtidos no teste do reflexo baroreceptor e do reflexo cardiopulmonar onde a resposta bradicárdica estava normal ou aumentada respectivamente, podemos concluir que o tratamento com L-NAME por uma, duas e quatro semanas não modifica ou até aumenta a função cardio-vagal.

Trabalhos anteriores de nosso laboratório mostraram em animais diabéticos redução da resposta de bradicardia reflexa em resposta ao KCN, e aumento da bradicardia em resposta a estimulação elétrica do vago (Dall'Ago et al. 1997) e pela administração de metacolina, sugerindo que a redução do reflexo estivesse associada a uma redução do tonus vagal. Essa redução, por seu lado, estaria associada a um aumento adaptativo do número de receptores muscarínicos no coração.

Embora se tenha referências de que a ativação do quimiorreflexo pela hipóxia esteja aumentada nos ratos espontaneamente hipertensos (Fukuda et al. 1987), em ratos hipertensos por bloqueio do óxido nítrico isso não está claro.

Considerando que na hipóxia crônica, as influências vasoconstritoras reflexas do sistema simpático estão reduzidas e/ou a influência vasodilatadora locais de hipóxia estão aumentadas, o óxido nítrico poderia ter um papel

facilitatório na vasodilatação induzida pela adenosina e outros dilatadores dependentes do NO, e um papel de atenuador da vasoconstrição evocada pela noradrenalina (Marshall 1998).

No presente modelo de hipertensão, o bloqueio do NO deve alterar necessariamente estas respostas homeostáticas.

Finalizando, dados recentes do nosso laboratório (não publicados) indicam que no bloqueio crônico do NO (7 dias) a intensa vasoconstrição é acompanhada de uma maior captação de O<sub>2</sub> nesses animais, revelados por aumento da PO<sub>2</sub> arterial em presença de PCO<sub>2</sub> normal.

#### 6.5 Estresse oxidativo

Segundo, Nordmann (1994) as EAO promovem estresse oxidativo quando as defesas antioxidantes da célula são insuficientes para deter a produção pró-oxidante. Grandes quantidades de EAO, incluindo o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, são produzidas nas células vasculares, e atuam como importantes sinalizadores intracelulares. Um número crescente de trabalhos na literatura tem demonstrado o papel fundamental do estresse oxidativo na patogênese das doenças cardiovasculares (Cai & Harrison 2000). Geralmente, o aumento da produção das EAO contribui para a desregulação de processos fisiológicos, que levam as alterações estruturais e funcionais observadas nas doenças (Zalba et al. 2000).

Trabalhos na literatura vem evidenciando que a maior geração de EAO causa uma diminuição do NO biodisponível, o que induz prejuízo na função endotelial, levando (entre outras) a uma redução na vasodilatação dependente do endotélio (Panza et al. 1990). Rubanyi & Vanhoutte (1986) e

Gryglewski e col. (1986) determinaram que o NO pode ser destruído pelo radical superóxido e protegido por *scavenger* de EAO como a SOD. Dessa forma, a redução na disponibilidade de NO pode resultar não só da diminuição da atividade das vias de produção de NO como também do aumento da inativação oxidativa do NO pelo radical superóxido. A disfunção da vasodilatação dependente do endotélio, associadas com aumento do estresse oxidativo, particularmente com a maior produção do radical superóxido, tem sido observada em pacientes com hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes, fumantes, além de velhos (Berry et al. 2001; Cai & Harrison 2000; Carr & Frei 2000).

Em modelos animais, muitos trabalhos recentes vem somando evidências do aumento da geração de EAO em tecidos vasculares de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Cosentino et al. 1998, Suzuki et al. 1995, Zalba et al. 2001). Suzuki et al. (1995) demonstraram aumento da produção de superóxido em arteríolas mesentéricas de SHR in vivo. Grunfeld et al. (1995) verificaram maior geração do ânion superóxido em cultura de células endoteliais de aorta de SHR comparada com culturas de ratos Wistar Kyoto. Cosentino et al. (1998) mostraram aumento na liberação de superóxido e peróxido de hidrogênio em preparações de anéis de aorta de SHR. Além disso, Zalba et al. (2001) evidenciaram que a disfunção endotelial estava mais associada com um excesso de geração de ânion superóxido do que com a diminuição da produção de NO em aortas de SHR adultos.

A reação do ânion superóxido com o NO leva a produção do peroxinitrito (Beckman et al. 1990), um potente oxidante provavelmente responsável pela injúria tecidual. Os peroxinirritos induzem a oxidação de proteínas, de DNA e de lipídeos nas células vasculares (Ballinger et al. 2000). Além disso, achados recentes sugerem que o aumento das EAO

podem estimular a hipertrofia e a hiperplasia das células musculares lisas do vaso (Griendling et al. 2000).

O estresse oxidativo tem sido implicado como fator comum de vários modelos de hipertensão, incluindo hipertensão: renal (Vaziri et al. 1998), induzida por ciclosporina (Lopez-Ongil et al. 1998), sal-sensível (Swei et al. 1997), pré-eclâmpsia (Roggensack et al. 1999), essencial (Lacy et al. 1998) Kumar & Das et al., 1997), associada ao diabetes (Giugliano et al. 1995) (Orie et al. 1999), e associada à obesidade (Dobrian et al. 2001). Além disso, o importante papel do estresse oxidativo na gênese e na manutenção da hipertensão tem sido corroborada por estudos que demonstram melhora nas disfunções da hipertensão pelo tratamento com anti-oxidantes (Atarashi et al. 1997, Suzuki et al. 1995, Usui et al. 1999).

No modelo de hipertensão induzida pelo bloqueio da síntese do NO pela administração de L-NAME, Usui et al. (1999) demonstraram aumento da produção do radical superóxido em anéis de aorta de ratos Wistar Kyoto hipertensos (7 dias L-NAME, 1mg/mL), sugerindo um aumento de estresse oxidativo. No presente estudo, a medida de QL em eritrócitos, que reflete o balanço entre pró-oxidantes e anti-oxidantes, não apresentou alteração após 7 dias de bloqueio da síntese do NO, sugerindo um equilíbrio oxidativo nesta fase da hipertensão por L-NAME, em contraposição aos achados de Usui et al. (1999).

Neste aspecto, mudanças nas defesas anti-oxidantes poderiam estar bloqueando o aumento dos fatores pró-oxidantes (aumento do radical superóxido), levando a uma QL semelhante entre os grupos controles e L-NAME hipertensos (1 semana). De fato, a atividade da GPx, uma enzima importante na defesa contra o dano oxidativo, apresentou-se aumentada ( $\approx 100\%$ ) após uma semana de tratamento com L-NAME, no entanto, a atividade da CAT não foi alterada. A atividade da SOD, que catalisa a

dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio, uma EAO potencialmente menos deletéria, foi semelhante entre controles e L-NAME de 1 semana, apesar de  $\approx 40\%$  de aumento em valores absolutos nos ratos hipertensos. Esses resultados sugerem que a maior geração do radical superóxido pode estar sendo contrabalançada com o aumento das enzimas antioxidantes, resultando em valores normais de QL após 1 semana de hipertensão induzida por L-NAME.

No entanto, alguns aspectos metodológicos devem também ser levados em consideração para interpretação destes resultados. Primeiro, a dose utilizada por Usui et al. (1999) foi mais elevada (1g/L) em comparação ao utilizado no presente estudo (750 mg/L). Segundo, as medidas foram realizadas em tecidos diferentes (aorta x eritrócito) e de ratos de linhagens diferentes.

Após 4 semanas de hipertensão por L-NAME as atividades da SOD ( $\approx 100\%$ ) e da CAT ( $\approx 120\%$ ) nos eritrócitos apresentaram um exacerbado aumento em relação ao grupo controle. Provavelmente esta grande ativação dos mecanismos antioxidantes celulares preveniu o estresse oxidativo, induzindo redução da QL no grupo hipertenso tratado 4 semanas com L-NAME quando comparado aos controles.

Além disso, a normalização da atividade da GPx em 4 semanas, que até a 2ª semana estava aumentada, pode ser devido ao aumento da geração de peróxido de hidrogênio anteriormente documentada na literatura (Arnaiz et al., 1997; De Angelis et al. 2000). Apesar de no presente estudo a produção de peróxido de hidrogênio não ter sido quantificada, o aumento da atividade da CAT, um *scavenger* específico desta EAO, a partir da 2ª semana de hipertensão pode indicar um aumento na formação de peróxido de hidrogênio neste modelo. De fato, trabalhos anteriores de nosso laboratório demonstraram uma correlação positiva entre a redução da atividade da GPx



e o aumento da atividade da CAT no músculo grande dorsal de ratos diabéticos (De Angelis et al., 2000). Dessa forma, o aumento da atividade da SOD deve estar contribuindo para a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que por sua vez, está sendo reduzido em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> pela aumentada atividade da CAT e da GPx.

Recentemente, vários autores vem demonstrando que o bloqueio crônico (4-8 semanas) da síntese do NO por L-NAME, produz mudanças na estrutura vascular (fibrose e espessamento da camada media) e remodelamento ventricular (fibrose e hipertrofia) em modelos de animais *in vivo*. Takemoto et al. (1997a e b) evidenciaram um aumento da atividade da ECA associado a danos vasculares e no miocárdio após 1 semana de L-NAME. Estes mesmos autores verificaram que o uso de bloqueadores da ECA ou de receptor da angiotensina II na hipertensão por L-NAME preveniam estas alterações. Essa observação sustenta a hipótese de que uma diminuição da atividade da NO sintase poderia levar a uma ativação local da ECA, gerando angiotensina II, o que contribuiria para o hipertrofia ventricular. Além disso, Usui et al (1999) demonstraram que ratos hipertensos por L-NAME (7 dias) apresentavam hipertensão, diminuição da NOx, aumento da geração de superóxido e aumento da atividade da ECA na aorta. O tratamento simultâneo de antioxidantes e L-NAME na água de beber, induziu hipertensão, mas sem alteração na produção de superóxido e na atividade da ECA em relação aos controles normotensos. Estes achados indicam um importante papel do estresse oxidativo na ativação da ECA tecidual.

No presente estudo observamos alterações no perfil de estresse oxidativo nas células sanguíneas, sugerindo que outros tecidos, como o cardíaco, estariam expostos ao dano oxidativo induzido pelo bloqueio da síntese do NO. Dessa forma, um possível aumento do estresse oxidativo no miocárdio poderia estar associados ao aumento da ECA ventricular

verificada na 2ª semana de tratamento com L-NAME. A correlação positiva obtida entre a atividade da ECA e a hipertrofia ventricular, bem como entre a PAM e a hipertrofia ventricular, reforçam a hipótese que o bloqueio da síntese do NO por L-NAME, aumenta o estresse oxidativo no miocárdio, ativando a ECA ventricular, induzindo, por fim, a hipertrofia ventricular observada neste trabalho a partir da 2ª semana de hipertensão por L-NAME.

Reforçando a participação do sistema renina-angiotensina na hipertensão por bloqueio da síntese do NO muitos autores demonstraram que a o tratamento agudo ou crônico com L-NAME induz aumento da renina plasmática e da função simpática (Hu et al. 1994; Laflamme et al. 1998, Ribeiro et al. 1992). Este aumento da renina circulante foi documentada no presente estudo na 2ª semana de tratamento com L-NAME. Dobrian et al. (2001) demonstraram que o aumento da renina circulante, e possivelmente de angiotensina II, poderia estar relacionado ao aumento do estresse oxidativo observado em ratos obesos hipertensos.

## 6.6 Papel do sistema renina angiotensina na hipertensão pelo bloqueio da síntese de NO

Tem-se estudado exaustivamente o papel do sistema renina angiotensina (SRA) sobre o endotélio vascular e seu envolvimento com a pressão arterial (Ribeiro et al. 1992). O envolvimento do SRA e mais especificamente da AngII na alteração das funções cardiovasculares tem sido um achado constante em vários modelos de hipertensão (Berecek et al. 1983, Floras et al. 1988, Guo & Abboud 1984, Irigoyen et al. 1991, Korner 1975). O

envolvimento da PA no controle da liberação de renina foi mostrado pela primeira vez pelo grupo de Goldblatt em 1934, quando ficou estabelecido que uma substância vasopressora era liberada pelo rim em resposta à hipovolemia e/ou hipotensão. Esta substância foi posteriormente identificada como sendo a renina liberada pelo aparelho justaglomerular (AJG) (Inagami 1998, Phillips & Schmidt-Ott 1999).

Na década de 50 ficou estabelecida a relação inversa entre a pressão de perfusão e a liberação de renina pelo AJG (Stella & Zanchetti 1991). Além disso tem sido mostrado atividade simpática aumentada em presença de níveis endógenos elevados de AngII (Guo & Abboud 1984, Lee et al. 1980, Reid 1992, Saxena 1992, Unger et al. 1985, Wong et al. 1993). Sabe-se que a AngII potencializa a atividade simpática centralmente e estimula a transmissão ganglionar, bem como facilita a transmissão simpática por ação pré sináptica (Saxena 1992).

O aumento da liberação de renina e conseqüentemente da formação de angiotensina, leva tanto a vasoconstrição da musculatura lisa dos vasos, pela sua ação direta, como aumento da atividade simpática periférica e central. Além desses efeitos, ocorre estimulação da síntese e secreção de aldosterona e vasopressina, bem como estimulação da sede (Guo & Abboud 1984, Jones & Floras 1980, Moreira et al. 1988, Moreira et al. 1990). Estes efeitos, em conjunto promovem aumento da pressão arterial tanto em situações fisiológicas como patológicas.

Estudo tem demonstrado que a hipertensão causada pelo bloqueio central agudo e crônico (Qadri et al. 1999), da síntese do óxido nítrico, é acompanhada pelo aumento da atividade simpática renal. Estes achados

indicam que a atividade central autonômica é, pelo menos parcialmente, controlada pelo NO, sugerindo que os efeitos sistêmicos da inibição da síntese do NO podem ser devidas a inibição da síntese de NO a nível central. De fato, como discutido anteriormente, o L-NAME atravessa a barreira hematoencefálica e interfere na formação de óxido nítrico a nível central.

Considerando estas informações, de que forma a inibição da síntese do óxido nítrico pode estar influenciando nossos resultados? Como o NO é capaz de modular o tônus vascular, tem se sugerido que o NO seria mais um mecanismo de regulação da renina. A presença do NO na mácula densa (MD) reforça a possibilidade do papel do NO nos eventos dependentes da MD (Schnermann 1998). Além disso, como visto anteriormente, a inibição da síntese de óxido nítrico pelo L-NAME determina aumento da pressão arterial e portanto altera a pressão de perfusão renal e tecidual. Nossos resultados mostram um aumento significativo da renina plasmática nas duas semanas de tratamento com L-NAME, provavelmente devida a diminuição da perfusão causada pelo forte constrição do leito vascular. Esta vasoconstrição é provocada não só pela ausência do NO mas também pelo aumento na atividade simpática central como demonstrado por Eshima e col. (2000).

Por outro lado, a diminuição da renina plasmática às quatro semanas de tratamento, provavelmente se deva ao aumento da pressão arterial que melhora a pressão de perfusão renal e tecidual. Essa melhora na perfusão tecidual explicaria a diminuição da liberação de renina pelo AJG. Tal fato poderia explicar por que tanto no grupo tratado por uma e quatro semanas os níveis de renina plasmática encontram-se muito semelhantes aos níveis dos animais controles. Embora com causas diferentes, o efeito final na perfusão

tecidual parece ser semelhante pois em ambos os tempos de tratamento não se verifica aumento da atividade da renina plasmática. Estas respostas estão de acordo com os resultados obtidos em vários estudos mostrando que sob normo ou hipertensão a pressão de perfusão renal tem ação preponderante sobre a secreção de renina (Wagner et al. 1999). Em nosso estudo, foi medida a formação de angiotensina I a partir do angiotensinogênio e portanto o aumento nas taxas de renina ativa.

Cabe ainda ressaltar que Scrogin e col. (1998) demonstraram que, em ratos Sprague-Dawley tratados com L-NAME (100mg/l) durante uma semana, houve aumento do volume urinário, embora esses animais tenham comido e bebido quantidades similares aos controles e não tenha perdido peso. Estes autores também demonstraram que a taxa de filtração glomerular estava aumentada, provavelmente devida ao aumento da diurese de pressão (Scrogin et al. 1998). A diurese de pressão que ocorreria nos primeiros dias de hipertensão provavelmente determinaria a redução nos níveis de renina plasmática já que neste caso a perfusão renal não estaria diminuída.

Os dados da literatura são bastante controversos quanto a atividade da renina plasmática, pois podemos encontrar resultados onde a renina plasmática está aumentada (Ribeiro et al. 1992), inalterada (Jover et al. 1993) ou diminuída (Arnal et al. 1993; Pollock et al. 1993) no modelo de hipertensão pelo bloqueio do NO. O aumento observado por nós após 2 semanas de tratamento é naturalmente resultado de alguns mecanismos já discutidos. Entretanto, o aumento da atividade da renina plasmática não parece estar relacionado nem com a PAM nem com o controle reflexo, uma vez que essas variáveis se mantiveram alteradas durante todo o tratamento, mesmo quando a

renina estava normal. Evidências sugerem que a atividade de renina plasmática pode ser imprevisível não se correlacionando com a ação protetiva do bloqueio crônico da Ang II (Zatz & Baylis 1998).

#### 6.7 Regulação da ECA durante a inibição da síntese do óxido nítrico

A ECA é uma metalopeptidase amplamente distribuída, ocorrendo primariamente como glicoproteína ligada à membrana. Sua ampla distribuição sugere que o controle da expressão gênica depende especialmente do tipo celular e do ambiente (Corvol et al. 1995). Estudos recentes mostram que a expressão gênica da ECA endotelial é inibida pelos níveis de angiotensina no plasma (Schunkert et al. 1993) e é estimulada por inibidores da ECA (King & Oparil 1992). Ribeiro e col. (1992) mostraram que a administração de losartan (antagonista de receptor  $AT_1$ ) a ratos tratados cronicamente com L-NAME preveniu tanto a hipertensão quanto a injúria renal, sugerindo que o SRA participa de forma decisiva nesse modelo de hipertensão.

Analisando os resultados obtidos no presente trabalho, verifica-se que a atividade da ECA no rim encontra-se aumentada após uma semana de tratamento e diminui às duas semanas. Nas quatro semanas de tratamento ocorre uma diminuição significativa em relação aos controles. A partir desse diminuindo gradativamente até quatro semanas.

#### 6.8 Considerações finais

A manutenção da pressão arterial em níveis adequados bem como da composição dos líquidos corpóreos e do volume fluído extracelular depende de

uma série de interações entre os diferentes sensores capazes de perceber alterações relacionadas aos parâmetros cardiovasculares. No presente trabalho testamos diferentes aferentes relacionados ao controle do sistema cardiovascular e da pressão arterial com diferentes padrões de projeção às áreas do tronco cerebral, mas cujos núcleos podem estar recebendo informações de diferentes tipos de aferentes mediando diferentes respostas reflexas (Abboud & Thames, 1983). Entretanto, a interação desses sinais aferentes no núcleo do trato solitário quando diferentes reflexos estão sendo ativados simultaneamente bem como de que forma as vias eferentes atuam para garantir o controle da circulação são temas ainda não bem entendidos (Chalmers et al., 1992). Experimentos em coelhos, por exemplo, mostraram que a presença de uma inibição tônica do sistema cardiovascular provocada pelo baroreflexo reduz o reflexo de Bezold-Jarisch, enquanto que os baroreceptores não funcionam adequadamente se houver bloqueio da inibição tônica pelo reflexo cardiogênico (Chen, 1979). No presente trabalho, a redução da resposta reflexa comandada pelos pressorreceptores é acompanhada de aumento da resposta reflexa comandada pelos receptores cardiopulmonares nos animais hipertensos, independente do tempo de tratamento. Da mesma forma, a atenuação do baroreflexo (aumentando) e a exacerbação do reflexo cardiopulmonar (reduzindo) funcionam como forças opostas na determinação da atividade simpática periférica, especialmente a renal. O aumento da atividade simpática periférica visto aqui pela manutenção da resposta de hipotensão após o bloqueio com atropina nos animais tratados com l-name, pode se dever a um predomínio dos aferentes cardiopulmonares em presença da adaptação dos pressorreceptores ao novo nível de PA (Krieger, 1989). De

fato, enquanto a resposta de retirada do simpático foi maior nos animais hipertensos, sugerindo um aumento tônico dessa atividade simpática, as respostas de taquicardia e hipertensão, que dependeram de um aumento adicional sobre esse tônus estavam reduzidas ou não se modificaram durante a estimulação dos baro e dos quimiorreceptores. Por outro lado, as respostas reflexas relacionadas a ativação do parassimpático cardíaco foram normais ou aumentadas nos animais hipertensos. O aumento da bradicardia reflexa elicitada pela serotonina (cardiopulmonares) poderia sugerir um aumento da atividade do vago. Entretanto a resposta bradicárdica normal pela estimulação dos pressorreceptores com fenilefrina indica o contrário, a menos que os aferentes aórticos estivessem alterados. Entretanto, trabalhos não publicados de nosso laboratório demonstraram que a curva de função dos baroreceptores está normal 7 dias após o bloqueio com o L-Name.

Além disso, a resposta quimiorreflexa não foi claramente maior nos animais hipertensos. Fica difícil portanto aceitar que o tônus vagal reduzido pudesse ser o responsável pelas respostas aumentadas de bradicardia como referido por Vasquez e col. (1997) O tempo de tratamento pode ser o fator responsável por essas diferenças.

A medida das enzimas anti-oxidantes e da QL mostrou que durante o curso temporal da hipertensão pelo bloqueio do óxido nítrico, ajustes homeostáticos ocorreram de maneira a reduzir o estresse oxidativo ao final do tratamento. O aumento da superóxido dismutase sugere participação do íon superóxido no processo hipertensivo, especialmente em face do bloqueio do óxido nítrico. Não se observou correlação dessas variáveis com o controle reflexo da circulação. A ativação do sistema renina angiotensina parece ter



mais importância a nível do miocárdio, onde a atividade da ECA se relacionou com a peso do ventrículo, do que a nível sistêmico. Não se observou relação direta do sistema renina angiotensina e a hipertensão L-NAME dependente.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Abboud, F. M., D. D. Heistad, A. L. Mark, and P. G. Schmid. 1976.** Reflex control of the peripheral circulation. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 18:371-403.

**Abboud, F. M. and M.D. Thames. 1983.** Interaction of cardiovascular reflexes in circulatory control. In: Sheperd J.T and F.M. Abboud (eds) – *Handbook of Physiology. The cardiovascular system. Cardiovascular reflex and circulatory integration.* Bethesda. American Physiological Society, V3: p. 675-753.

**Adams, M. A., K. E. Thompson, J. D. Banting, M. A. Madigan, and P. Friberg. 1995.** Evidence in vivo for induction of cardiovascular growth processes by vasoconstrictor systems. *Blood Press Suppl* 2:61-67.

**Andrew, P. J. and B. Mayer. 1999.** Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 43:521-531.

**Angelis Lobo, d. K., G. Gadonski, J. Fang, P. Dall'Ago, V. L. Albuquerque, L. R. Peixoto, T. G. Fernandes, and M. C. Irigoyen. 1999.** Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained L-NAME- hypertensive rats. *Hypertension* 34:768-772.

**Araujo, M. T., A. M. Cabral, and E. C. Vasquez. 1995.** Exaggerated Bezold-Jarisch reflex in the hypertension induced by inhibition of nitric oxide synthesis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28:1009-1012.

- Arnaiz S.L., M. Travacio, A.J Monserrat, J.C. Cutrín, Llesuy S., A. Boveris**  
**1997** Chemiluminescence and antioxidant levels during peroxisome proliferation by fenofibrate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1360: 222-228.
- Arnal, J. F., A. I. el Amrani, G. Chatellier, J. Menard, and J. B. Michel. 1993.**  
Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension* 22:380-387.
- Arnal, J. F., L. Warin, and J. B. Michel. 1992.** Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest* 90:647-652.
- Atarashi, K., A. Ishiyama, M. Takagi, M. Minami, K. Kimura, A. Goto, and M. Omata. 1997.** Vitamin E ameliorates the renal injury of Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Hypertens.* 10:116S-119S.
- Averill, D. B. and D. I. Diz. 2000.** Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Res. Bull.* 51:119-128.
- Balaszczuk, A. M., A. Tomat, S. Bellucci, A. Fellet, and C. Arranz. 2002.**  
Nitric oxide synthase blockade and body fluid volumes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35:131-134.
- Ballinger, S. W., C. Patterson, C. N. Yan, R. Doan, D. L. Burow, C. G. Young, F. M. Yakes, B. Van Houten, C. A. Ballinger, B. A. Freeman, and M. S. Runge. 2000.** Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ. Res.* 86:960-966.

- Banting, J. D., S. L. Wiseman, and M. A. Adams. 1996.** Hypertension without cardiac hypertrophy does not induce a cardiac baroreflex deficit. *J. Hypertens.* 14:1209-1214.
- Baylis, C., B. Mitruka, and A. Deng. 1992.** Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J. Clin. Invest* 90:278-281.
- Beckman, J. S., T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, and B. A. Freeman. 1990.** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:1620-1624.
- Berecek, K. H., T. Okuno, S. Nagahama, and S. Oparil. 1983.** Altered vascular reactivity and baroreflex sensitivity induced by chronic central administration of captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 5:689-700.
- Berry, C., M. J. Brosnan, J. Fennell, C. A. Hamilton, and A. F. Dominiczak. 2001.** Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10:247-255.
- Bohr, D. F. and A. F. Dominiczak. 1991.** Experimental hypertension. *Hypertension* 17:139-144.
- Boveris, A. and B. Chance. 1973.** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134:707-716.

**Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

**Cabral, A. M., E. C. Vasquez, M. R. Moyses, and A. Antonio. 1988.** Sex hormone modulation of ventricular hypertrophy in sinoaortic denervated rats. *Hypertension* 11:193-197.

**Cai, H. and D. G. Harrison. 2000.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87:840-844.

**Carey, R. M., H. E. McGrath, E. S. Pentz, R. A. Gomez, and P. Q. Barrett. 1997.** Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J. Clin. Invest* 100:1566-1574.

**Carr, A. and B. Frei. 2000.** The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1806-1814.

Carvalho, M.H.C., D. Nigro, Z.B. Fortes, R. Scivoletto. 1995. **Reatividade vascular, hipertensão arterial e endotélio. Hiper Ativo: 2(1):22-31.**

**Cat, G. G., F. Veglio, F. Rabbia, A. Milan, T. Grosso, and L. Chiandussi. 2001.** Baroreflex sensitivity in secondary hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 23:89-99.

**Chalmers, J. P., V. Kapoor, I. J. Llewellyn-Smith, J. B. Minson, and P. M. Pilowsky. 1992.** Central control of blood pressure. *Eur. Heart J.* 13 Suppl A:2-9.

- Chen, H. I. 1979.** Interaction between the baroreceptor and Bezold-Jarisch reflexes. *Am. J. Physiol* 237:H655-H661.
- Consolim-Colombo, F. M., J. A. Filho, H. F. Lopes, C. R. Sobrinho, M. E. Otto, G. M. Riccio, C. Mady, and E. M. Krieger. 2000.** Decreased cardiopulmonary baroreflex sensitivity in Chagas' heart disease. *Hypertension* 36:1035-1039.
- Corvol, P., A. Michaud, F. Soubrier, and T. A. Williams. 1995.** Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. *J. Hypertens. Suppl* 13 Suppl 3:S3-10.
- Cosentino, F., S. Patton, L. V. d'Uscio, E. R. Werner, G. Werner-Felmayer, P. Moreau, T. Malinski, and T. F. Luscher. 1998.** Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J. Clin. Invest* 101:1530-1537.
- Crane, B. R., A. S. Arvai, R. Gachhui, C. Wu, D. K. Ghosh, E. D. Getzoff, D. J. Stuehr, and J. A. Tainer. 1997.** The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* 278:425-431.
- Cunha, R. S., A. M. Cabral, and E. C. Vasquez. 1993.** Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L- NAME-induced hypertension in conscious rats. *Am. J. Hypertens.* 6:806-809.
- da Silva, S. V., V. J. Da Silva, G. Ballejo, M. C. Salgado, and H. C. Salgado. 1994.** Blockers of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway facilitate baroreceptor resetting. *Hypertension* 23:160-163.

- Dall'Ago, P., T. G. Fernandes, U. F. Machado, A. A. Bello, and M. C. Irigoyen. 1997.** Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30:119-124.
- Daly, M. B. and A. Taton. 1979.** Interactions of cardio-respiratory reflexes elicited from the carotid bodies and upper airways receptors in the conscious rabbit [proceedings]. *J. Physiol* 291:34P.
- Danser, A. H. and M. A. Schalekamp. 1996.** Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? *Heart* 76:28-32.
- De Angelis K.L.D., Ogawa T., Gimenes R., Peixoto L.R.A., Irigoyen MC. 2000.** "Alterações de fluxo sanguíneo regional em ratos hipertensos por bloqueio da síntese do óxido nítrico em repouso e durante o exercício." *Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão*, 3 (Supl): 49.
- De Angelis, K. L., I. A. Cestari, J. Barp, P. Dall'Ago, T. G. Fernandes, P. I. de Bittencourt, A. Bello-Klein, A. A. Bello, S. Llesuy, and M. C. Irigoyen. 2000.** Oxidative stress in the latissimus dorsi muscle of diabetic rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33:1363-1368.
- Dobrian, A. D., M. J. Davies, S. D. Schriver, T. J. Lauterio, and R. L. Prewitt. 2001.** Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension* 37:554-560.
- Dominiczak, A. F. and D. F. Bohr. 1995.** Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension* 25:1202-1211.
- Dormandy, T. L. 1978.** Free-radical oxidation and antioxidants. *Lancet* 1:647-650.

- Dzau, V. J. 1988.** Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77:14-13.
- Erdos, E. G. and R. A. Skidgel. 1987.** The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 56:345-348.
- Eshima, K., Y. Hirooka, H. Shigematsu, I. Matsuo, G. Koike, K. Sakai, and A. Takeshita. 2000.** Angiotensin in the nucleus tractus solitarii contributes to neurogenic hypertension caused by chronic nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension* 36:259-263.
- Ferrari R., C. Ceconi, S. Curello, A. Cargnoni, E. Condorelli, and R. Raddino. 1985.** Role of oxygen in myocardial ischaemic and reperfusion damage: effect of alpha-tocopherol. *Acta Vitaminol.Enzymol.* 7 Suppl:61-70.
- Filep, J. G. 1993.** Endothelin peptides: biological actions and pathophysiological significance in the lung. *Life Sci.* 52:119-133.
- Flohe, L. and W. A. Gunzler. 1984.** Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105:114-121.
- Floras, J. S., M. O. Hassan, J. V. Jones, B. A. Osikowska, P. S. Sever, and P. Sleight. 1988.** Consequences of impaired arterial baroreflexes in essential hypertension: effects on pressor responses, plasma noradrenaline and blood pressure variability. *J. Hypertens.* 6:525-535.
- Forster, J., P. Beebe, H. Wang, and J. G. Wood. 2001.** The effect of nitric oxide inhibition on blood pressure depends on rat strain. *J. Surg. Res.* 96:218-223.



**Franchini, K. G. and A. W. Cowley, Jr. 1996.** Renal cortical and medullary blood flow responses during water restriction: role of vasopressin. *Am. J. Physiol* 270:R1257-R1264.

**Franchini, K. G. and E. M. Krieger. 1992.** Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic- denervated rats. *Am. J. Physiol* 262:R677-R683.

**Franchini, K. G., I. A. Cestari, and E. M. Krieger. 1994.** Restoration of arterial blood oxygen tension increases arterial pressure in sinoaortic-denervated rats. *Am. J. Physiol* 266:H1055-H1061.

**Fukuda, Y., A. Sato, and A. Trzebski. 1987.** Carotid chemoreceptor discharge responses to hypoxia and hypercapnia in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 19:1-11.

**Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki. 1980.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.

**Gardiner, S. M., A. M. Compton, T. Bennett, R. M. Palmer, and S. Moncada. 1990a.** Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 15:486-492.

**Gardiner, S. M., A. M. Compton, T. Bennett, R. M. Palmer, and S. Moncada. 1990b.** Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L- arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. *Br. J. Pharmacol.* 101:10-12.

- Garlick, P. B., M. J. Davies, D. J. Hearse, and T. F. Slater. 1987.** Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ. Res.* 61:757-760.
- Gibbons, G. H. and V. J. Dzau. 1994.** The emerging concept of vascular remodeling. *N. Engl. J. Med.* 330:1431-1438.
- Gimbrone, M. A., Jr. 1999.** Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am. J. Pathol.* 155:1-5.
- Gimbrone, M. A., Jr., T. Nagel, and J. N. Topper. 1997.** Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J. Clin. Invest* 100:S61-S65.
- Giugliano, D., A. Ceriello, and G. Paolisso. 1995.** Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism* 44:363-368.
- Gonzalez Flecha B, Llesuy S & Boveris A. 1991** Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radical Biol Med*, , 10: 1093-100.
- Gordon, F. J., H. Matsuguchi, and A. L. Mark. 1981.** Abnormal baroreflex control of heart rate in prehypertensive and hypertensive Dahl genetically salt-sensitive rats. *Hypertension* 3:1135-1141.
- Grassi, G., C. Giannattasio, J. Cleroux, C. Cuspidi, L. Sampieri, G. B. Bolla, and G. Mancia. 1988.** Cardiopulmonary reflex before and after regression of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Hypertension* 12:227-237.

**Griendling, K. K., B. Lassegue, and R. W. Alexander. 1993.** The vascular angiotensin (AT1) receptor. *Thromb. Haemost.* 70:188-192.

**Griendling, K. K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai. 2000.** NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 86:494-501.

**Grunfeld, S., C. A. Hamilton, S. Mesaros, S. W. McClain, A. F. Dominiczak, D. F. Bohr, and T. Malinski. 1995.** Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 26:854-857.

**Gryglewski, R. J., R. M. Palmer, and S. Moncada. 1986.** Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320:454-456.

**Guo, G. B. and F. M. Abboud. 1984.** Angiotensin II attenuates baroreflex control of heart rate and sympathetic activity. *Am. J. Physiol* 246:H80-H89.

**Guyton, A. C., T. G. Coleman, D. B. Young, T. E. Lohmeier, and J. W. DeClue. 1980.** Salt balance and long-term blood pressure control. *Annu. Rev. Med.* 31:15-27.

**Head, G. A. and M. A. Adams. 1988.** Time course of changes in baroreceptor reflex control of heart rate in conscious SHR and WKY: contribution of the cardiac vagus and sympathetic nerves. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 15:289-292.

**Head, G. A. and R. McCarty. 1987.** Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 21:203-213.

**Head, G. A., N. Minami, M. A. Adams, and A. Bobik. 1991.** Development of cardiac hypertrophy and its relationship to the cardiac baroreflex deficit in hypertension. *J. Hypertens. Suppl* 9:S80-S81.

**Hirooka, Y., J. W. Polson, and R. A. Dampney. 1996.** Pressor and sympathoexcitatory effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla. *J. Hypertens.* 14:1317-1324.

**Hooper, N. M., J. Keen, D. J. Pappin, and A. J. Turner. 1987.** Pig kidney angiotensin converting enzyme. Purification and characterization of amphipathic and hydrophilic forms of the enzyme establishes C-terminal anchorage to the plasma membrane. *Biochem. J.* 247:85-93.

**Hu, L., R. D. Manning, Jr., and M. W. Brands. 1994.** Long-term cardiovascular role of nitric oxide in conscious rats. *Hypertension* 23:185-194.

**Inagami, T. 1998.** A memorial to Robert Tiegerstedt: the centennial of renin discovery. *Hypertension* 32:953-957.

**Irigoyen, M. C. and E. M. Krieger. 1998.** Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31:1213-1220.

**Irigoyen, M. C., E. D. Moreira, I. A. Cestari, and E. M. Krieger. 1991.** The relationship between renal sympathetic nerve activity and arterial pressure

after selective denervation of baroreceptors and chemoreceptors. Braz. J. Med. Biol. Res. 24:219-222.

**Jones, J. V. and J. S. Floras. 1980.** Baroreflex sensitivity changes during the development of Goldblatt two- kidney one-clip hypertension in rats. Clin. Sci. (Lond) 59:347-352.

**Jover, B., A. Herizi, F. Ventre, M. Dupont, and A. Mimran. 1993.** Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. Hypertension 21:944-948.

**Kagiyama, S., T. Tsuchihashi, I. Abe, and M. Fujishima. 1997.** Cardiovascular effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of rats. Brain Res. 757:155-158.

**Kappagoda, C. T., R. J. Linden, and H. M. Snow. 1972.** The effect of stretching the superior vena caval-right atrial junction on right atrial receptors in the dog. J. Physiol 227:875-887.

**Kawaguchi, H., H Sano A Kitabatake 1997** Increased mRNA Expression of Renin-Angiotensin System in hypertrophied rat heart. In Sharma et al (eds). Adaptation Biology and medicine (vol1), Narosa Publishing House, New Delhi

**Kezdi, P. 1976.** Cardiac reflexes conducted by vagal afferents in normotensive and renal hypertensive dogs. Clin. Sci. Mol. Med. Suppl 3:353s-355s.

- King, S. J. and S. Oparil. 1992.** Converting-enzyme inhibitors increase converting-enzyme mRNA and activity in endothelial cells. *Am. J. Physiol* 263:C743-C749.
- Korner, P. I. 1975.** Central and peripheral 'resetting' of the baroreceptor system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol Suppl* 2:171-178.
- Krieger E. M., P. C. Brum, and C. E. Negrao. 1999.** State-of-the-Art lecture: influence of exercise training on neurogenic control of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 34 (4 Pt 2):720-723.
- Krieger, E. M. 1970.** Time course of baroreceptor resetting in acute hypertension. *Am. J. Physiol* 218:486-490.
- Krieger, E. M. 1987.** Aortic diastolic caliber changes as a determinant for complete aortic baroreceptor resetting. *Fed. Proc.* 46:41-45.
- Krieger, E. M. 1989.** Arterial baroreceptor resetting in hypertension (the J. W. McCubbin memorial lecture). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol Suppl* 15:3-17.
- Kumar, D.V, Das UN 1993** Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commum*, 19-:59-66
- Lacchini, S., E. L. Ferlin, R. S. Moraes, J. P. Ribeiro, and M. C. Irigoyen. 2001.** Contribution of nitric oxide to arterial pressure and heart rate variability in rats submitted to high-sodium intake. *Hypertension* 38:326-331.
- Lacy, F., D. T. O'Connor, and G. W. Schmid-Schonbein. 1998.** Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J. Hypertens.* 16:291-303.

- Laflamme, A., S. Foucart, P. Moreau, C. Lambert, R. Cardinal, and J. de Champlain. 1998.** Sympathetic functions in NG-nitro-L-arginine-methyl-ester-induced hypertension: modulation by the renin-angiotensin system. *J. Hypertens.* 16:63-76.
- Lahera, V., J. Navarro-Cid, V. Cachofeiro, J. Garcia-Estan, and L. M. Ruilope. 1997.** Nitric oxide, the kidney, and hypertension. *Am. J. Hypertens.* 10:129-140.
- Lahera, V., J. Salazar, M. G. Salom, and J. C. Romero. 1992.** Deficient production of nitric oxide induces volume-dependent hypertension. *J. Hypertens. Suppl* 10:S173-S177.
- Lahera, V., M. G. Salom, F. Miranda-Guardiola, S. Moncada, and J. C. Romero. 1991.** Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am. J. Physiol* 261:F1033-F1037.
- Lantelme, P., M. Lo, and J. Sassard. 1994.** Decreased cardiac baroreflex sensitivity is not due to cardiac hypertrophy in NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. *J. Hypertens.* 12:791-795.
- Lee, W. B., M. J. Ismay, and E. R. Lumbers. 1980.** Mechanisms by which angiotensin II affects the heart rate of the conscious sheep. *Circ. Res.* 47:286-292.
- Llesuy, S. F., J. Milei, H. Molina, A. Boveris, and S. Milei. 1985.** Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 71:241-249.

- Lopez-Ongil, S., O. Hernandez-Perera, J. Navarro-Antolin, d. L. Perez, M. Rodriguez-Puyol, S. Lamas, and D. Rodriguez-Puyol. 1998.** Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 124:447-454.
- Lowry OH, Rosenbrough NT, Farr AL. 1951** Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, , 193: 265-275.
- Luscher, T. F. and G. Noll. 1995a.** The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 118 Suppl:S81-S90.
- Luscher, T. F. and G. Noll. 1995b..** Local regulation of the coronary circulation in health and disease: role of nitric oxide and endothelin. *Eur.Heart J.* 16 Suppl C:51-58.
- Luscher, T. F., L. L. Aarhus, and P. M. Vanhoutte. 1990.** Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Hypertens.* 3:55-58.
- Ma, S., F. M. Abboud, and R. B. Felder. 1995.** Effects of L-arginine-derived nitric oxide synthesis on neuronal activity in nucleus tractus solitarius. *Am. J. Physiol* 268:R487-R491.
- Marshall, J. M. 1994.** Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiol Rev.* 74:543-594.



**Marshall, J. M. 1987.** Analysis of cardiovascular responses evoked following changes in peripheral chemoreceptor activity in the rat. *J. Physiol* 394:393-414.

**Marshall, J. M. 1998.** Chemoreceptors and cardiovascular control in acute and chronic systemic hypoxia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31:863-888.

**Matsuda, T., J. N. Bates, S. J. Lewis, F. M. Abboud, and M. W. Chapleau. 1995.** Modulation of baroreceptor activity by nitric oxide and S-nitrosocysteine. *Circ. Res.* 76:426-433.

**Matsumura, K., T. Tsuchihashi, S. Kagiya, I. Abe, and M. Fujishima. 1998.** Role of nitric oxide in the nucleus of the solitary tract of rats. *Brain Res.* 798:232-238.

**Matsuoka, H., H. Nishida, G. Nomura, B. N. Van Vliet, and H. Toshima. 1994.** Hypertension induced by nitric oxide synthesis inhibition is renal nerve dependent. *Hypertension* 23:971-975.

**Mattson, D. L. and F. Wu. 2000.** Control of arterial blood pressure and renal sodium excretion by nitric oxide synthase in the renal medulla. *Acta Physiol Scand.* 168:149-154.

**Menard, J. 1993.** Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. *J. Hypertens. Suppl* 11:S3-11.

- Meyrelles, S. S., A. M. Cabral, and E. C. Vasquez. 1994.** Impairment of the Bezold-Jarisch reflex in conscious rats with myocardial hypertrophy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27:1065-1069.
- Mifflin, S. W. 1992.** Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am. J. Physiol* 263:R368-R375.
- Minami, N., Y. Imai, J. Hashimoto, and K. Abe. 1995.** The role of nitric oxide in the baroreceptor-cardiac reflex in conscious Wistar rats. *Am. J. Physiol* 269:H851-H855.
- Miyata, S. and T. Haneda. 1994.** Hypertrophic growth of cultured neonatal rat heart cells mediated by type 1 angiotensin II receptor. *Am. J. Physiol* 266:H2443-H2451.
- Mohanty, P. K., M. D. Thames, J. R. Capehart, A. Kawaguchi, B. Ballon, and R. R. Lower. 1986.** Afferent reinnervation of the autotransplanted heart in dogs. *J. Am. Coll. Cardiol.* 7:414-418.
- Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. 1989.** Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38:1709-1715.
- Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. 1991.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142.
- Moreira, E. D., F. Ida, and E. M. Krieger. 1990.** Reversibility of baroreceptor hyposensitivity during reversal of hypertension. *Hypertension* 15:791-796.

- Moreira, E. D., M. de Oliveira, and E. M. Krieger. 1988.** Impaired baroreflex control of heart rate in high-renin renal hypertension. *J. Hypertens.* 6:619-625.
- Morgan, H. E. and K. M. Baker. 1991.** Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation* 83:13-25.
- Morton, J. J., E. C. Beattie, A. Speirs, and F. Gulliver. 1993.** Persistent hypertension following inhibition of nitric oxide formation in the young Wistar rat: role of renin and vascular hypertrophy. *J. Hypertens.* 11:1083-1088.
- Nathan, C. and Q. W. Xie. 1994.** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269:13725-13728.
- Nordmann, R. 1994.** Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol* 29:513-522.
- Oliveira, E. M., M.K. Koike, M.L. Junqueira, V.L.L. Oliveira, M.D. Pires, P.L. Fortner, J.E. Krieger. 1996.** Isoproterenol Induced Hypertrophy Increases Left Ventricle Ace Activity and Promoter Expression in Vivo. **J. of Hypertension** 14 (suppl 1): S211.
- Oliveira, E. M., R. A. Santos, and J. E. Krieger. 2000.** Standardization of a fluorimetric assay for the determination of tissue angiotensin-converting enzyme activity in rats. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 33 (7):755-764.

- Oliveira, E.M. and J.E. Krieger. 1995.** Standardization of the fluorimetric assay to determine tissue ACE activity in rats. In: XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. **Anais da SBBq**, K-33, pg. 130.
- Oliveira, V. L., E. D. Moreira, V. D. Farah, F. Consolim-Colombo, E. M. Krieger, and M. C. Irigoyen. 1999.** Cardiopulmonary reflex impairment in experimental diabetes in rats. *Hypertension* 34:813-817.
- Oliveira, V. L., M. C. Irigoyen, E. D. Moreira, C. Strunz, and E. M. Krieger. 1992.** Renal denervation normalizes pressure and baroreceptor reflex in high renin hypertension in conscious rats. *Hypertension* 19:II17-II21.
- Orie, N. N., W. Zidek, and M. Tepel. 1999.** Reactive oxygen species in essential hypertension and non-insulin- dependent diabetes mellitus. *Am. J. Hypertens.* 12:1169-1174.
- Pakala, R. and C. R. Benedict. 1999.** Endothelial cells regulate the proliferation of monocytes in vitro. *Atherosclerosis* 147:25-32.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige, and S. Moncada. 1987.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
- Panza, J. A., A. A. Quyyumi, J. E. Brush, Jr., and S. E. Epstein. 1990.** Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 323:22-27.

- Parati, G., M. Di Rienzo, and G. Mancia. 2001.** Dynamic modulation of baroreflex sensitivity in health and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 940:469-487.
- Paul, M., J. Bachmann, D. Ganten. 1992.** The tissue renin-angiotensin systems in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2: 94-99.
- Phillips, M. I. and K. M. Schmidt-Ott. 1999.** The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News Physiol Sci.* 14:271-274.
- Pietri, S., M. Culcasi, and P. J. Cozzone. 1989.** Real-time continuous-flow spin trapping of hydroxyl free radical in the ischemic and post-ischemic myocardium. *Eur. J. Biochem.* 186:163-173.
- Pollock, D. M., J. S. Polakowski, B. J. Divish, and T. J. Opgenorth. 1993.** Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension* 21:660-666.
- Pontieri, V., M. K. Venezuela, C. Scavone, and L. C. Michelini. 1998.** Role of endogenous nitric oxide in the nucleus tractus solitarius on baroreflex control of heart rate in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 16:1993-1999.
- Qadri, F., O. A. Carretero, and A. G. Scicli. 1999.** Centrally produced neuronal nitric oxide in the control of baroreceptor reflex sensitivity and blood pressure in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 81:279-285.

- Rees, D. D., R. M. Palmer, and S. Moncada. 1989.** Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:3375-3378.
- Reid, I. A. 1992.** Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am. J. Physiol* 262:E763-E778.
- Ribeiro, M. O., E. Antunes, G. de Nucci, S. M. Lovisolo, and R. Zatz. 1992.** Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20:298-303.
- Roggensack, A. M., Y. Zhang, and S. T. Davidge. 1999.** Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension* 33:83-89.
- Rubanyi, G. M. 1993.** The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22 Suppl 4:S1-14.
- Rubanyi, G. M. and P. M. Vanhoutte. 1986.** Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol* 250:H822-H827.
- Sander, M., J. Hansen, and R. G. Victor. 1997.** The sympathetic nervous system is involved in the maintenance but not initiation of the hypertension induced by N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester. *Hypertension* 30:64-70.

- Saxena, P. R. 1992.** Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 19 Suppl 6:S80-S88.
- Scherrer, U., D. Randin, P. Vollenweider, L. Vollenweider, and P. Nicod. 1994.** Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J. Clin. Invest* 94:2511-2515.
- Schnermann, J. 1998.** Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am. J. Physiol* 274:R263-R279.
- Schunkert, H., B. Jackson, S. S. Tang, F. J. Schoen, J. F. Smits, C. S. Apstein, and B. H. Lorell. 1993.** Distribution and functional significance of cardiac angiotensin converting enzyme in hypertrophied rat hearts. *Circulation* 87:1328-1339.
- Scrogin, K. E., D. C. Hatton, Y. Chi, and F. C. Luft. 1998.** Chronic nitric oxide inhibition with L-NAME: effects on autonomic control of the cardiovascular system. *Am. J. Physiol* 274:R367-R374.
- Scrogin, K. E., R. Veelken, and F. C. Luft. 1994.** Sympathetic baroreceptor responses after chronic NG-nitro-L-arginine methyl ester treatment in conscious rats. *Hypertension* 23:982-986.
- Sies, H. and R. Mehlhorn. 1986.** Mutagenicity of nitroxide-free radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 251:393-396.
- Slezak, J., N. Tribulova, J. Pristacova, B. Uhrik, T. Thomas, N. Khaper, N. Kaul, and P. K. Singal. 1995.** Hydrogen peroxide changes in ischemic

and reperfused heart. Cytochemistry and biochemical and X-ray microanalysis. *Am. J. Pathol.* 147:772-781.

**Soubrier, F., F. Alhenc-Gelas, C. Hubert, J. Allegrini, M. John, G. Tregear, and P. Corvol. 1988.** Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85:9386-9390.

**Souza, H. C., G. Ballejo, M. C. Salgado, V. J. Da Silva, and H. C. Salgado. 2001a.** Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 280:H844-H850.

**Stella, A. and A. Zanchetti. 1991.** Functional role of renal afferents. *Physiol Rev.* 71:659-682.

**Sun, S., E. S. Stoflet, J. G. Cogan, A. R. Strauch, and M. J. Getz. 1995.** Negative regulation of the vascular smooth muscle alpha-actin gene in fibroblasts and myoblasts: disruption of enhancer function by sequence-specific single-stranded-DNA-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* 15:2429-2436.

**Suzuki, H., A. Swei, B. W. Zweifach, and G. W. Schmid-Schonbein. 1995.** In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously



hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension* 25:1083-1089.

**Swei, A., F. Lacy, F. A. DeLano, and G. W. Schmid-Schonbein. 1997.**

Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* 30:1628-1633.

**Szabo, C. 1995.** Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz.* 3:2-32.

**Taddei, S., A. Viridis, L. Ghiadoni, and A. Salvetti. 1995.** [Endothelial function and arterial hypertension]. *Ann. Ital. Med. Int.* 10 Suppl:85S-90S.

**Takemoto, M., K. Egashira, H. Tomita, M. Usui, H. Okamoto, A. Kitabatake,**

**H. Shimokawa, K. Sueishi, and A. Takeshita. 1997a.** Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade: effects on cardiovascular remodeling in rats induced by the long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Hypertension* 30:1621-1627.

**Takemoto, M., K. Egashira, M. Usui, K. Numaguchi, H. Tomita, H. Tsutsui,**

**H. Shimokawa, K. Sueishi, and A. Takeshita. 1997b.** Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J. Clin. Invest* 99:278-287.

**Tarazi, R. C., S. Sen, M. Saragoca, and P. Khairallah. 1982.** The multifactorial

role of catecholamines in hypertensive cardiac hypertrophy. *Eur. Heart J.* 3 Suppl A:103-110.

- Thames, M. D. 1978.** Contribution of cardiopulmonary baroreceptors to the control of the kidney. *Fed. Proc.* 37:1209-1213.
- Thames, M. D. and L. N. Johnson. 1985.** Impaired cardiopulmonary baroreflex control of renal nerves in renal hypertension. *Circ. Res.* 57:741-747.
- Thoren, P. 1979.** Role of cardiac vagal C-fibers in cardiovascular control. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* 86:1-94.
- Tipton, C. M. 1991.** Exercise, training and hypertension: an update. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 19:447-505.
- Trzebski, A. 1992.** Arterial chemoreceptor reflex and hypertension. *Hypertension* 19:562-566.
- Tulis, D. A., J. L. Unthank, and R. L. Prewitt. 1998.** Flow-induced arterial remodeling in rat mesenteric vasculature. *Am. J. Physiol* 274:H874-H882.
- Unger, T., H. Becker, M. Petty, G. Demmert, B. Schneider, D. Ganten, and R. E. Lang. 1985.** Differential effects of central angiotensin II and substance P on sympathetic nerve activity in conscious rats. Implications for cardiovascular adaptation to behavioral responses. *Circ. Res.* 56:563-575.
- Usui, M., K. Egashira, S. Kitamoto, M. Koyanagi, M. Katoh, C. Kataoka, H. Shimokawa, and A. Takeshita. 1999.** Pathogenic role of oxidative stress in vascular angiotensin-converting enzyme activation in long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension* 34:546-551.

**Vanhoutte, P. M. 1989.** Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. Hypertension 13:658-667.

**Vasquez, E. C., R. S. Cunha, and A. M. Cabral. 1994.** Baroreceptor reflex function in rats submitted to chronic inhibition of nitric oxide synthesis. Braz. J. Med. Biol. Res. 27:767-774.

**Vasquez, E. C., S. S. Meyrelles, H. Mauad, and A. M. Cabral. 1997.** Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. Braz. J. Med. Biol. Res. 30:521-532.

**Vaziri, N. D., F. Oveisi, and Y. Ding. 1998.** Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. Kidney Int. 53:1748-1754.

**Verberne, A. J., N. A. Young, and W. J. Louis. 1988.** Impairment of inhibitory cardiopulmonary vagal reflexes in spontaneously hypertensive rats. J. Auton. Nerv. Syst. 23:63-68.

**von Bezold, A.V. and L. Hirt. 1867.** Uber die physiologischen wirkungen des essigsauren veratrins. Untersch Physiol Lab Wurtzberg. 1: 75-156.

**Wagner, C., M. Hinder, B. K. Kramer, and A. Kurtz. 1999.** Role of renal nerves in the stimulation of the renin system by reduced renal arterial pressure. Hypertension 34:1101-1105.

**Weissberg, P. 1999.** Mechanisms modifying atherosclerotic disease - from lipids to vascular biology. *Atherosclerosis* 147 Suppl 1:S3-10.

**Wong, J., L. Chou, and I. A. Reid. 1993.** Role of AT1 receptors in the resetting of the baroreflex control of heart rate by angiotensin II in the rabbit. *J. Clin. Invest* 91:1516-1520.

**Yamazaki, T., I. Komuro, I. Shiojima, and Y. Yazaki. 1996.** The renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. *Heart* 76:33-35.

**Zalba, G., G. San Jose, M. U. Moreno, M. A. Fortuno, A. Fortuno, F. J. Beaumont, and J. Diez. 2001.** Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 38:1395-1399.

**Zalba, G., J. Beaumont, G. San Jose, A. Fortuno, M. A. Fortuno, and J. Diez. 2000.** Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol Biochem.* 56:57-64.

**Zanardi, R., L. Franchini, M. Gasperini, J. Perez, and E. Smeraldi. 1996.** Double-blind controlled trial of sertraline versus paroxetine in the treatment of delusional depression. *Am. J. Psychiatry* 153:1631-1633.

**Zanchetti, A. and G. Mancia. 1991.** Cardiovascular reflexes and hypertension. *Hypertension* 18:III13-III21.

**Zatz, R. and C. Baylis. 1998.** Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 32:958-964.