

AVALIAÇÃO DO CONTROLE BARORREFLEXO ARTERIAL
EM CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS (ApoE
KNOCKOUT) COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C

Veronica Accioly Peotta

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

Doutorado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória-ES, 2004

VERONICA ACCIOLY PEOTTA

AVALIAÇÃO DO CONTROLE BARORREFLEXO ARTERIAL
EM CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS (ApoE
KNOCKOUT) COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^a Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles

Co-orientador: Prof Dr Elisardo Corral Vasquez

Vitória
2004

Peotta, Veronica Accioly

AVALIAÇÃO DO CONTROLE BARORREFLEXO ARTERIAL EM
CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS (ApoE *KNOCKOUT*) COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR / Veronica Accioly Peotta – Vitória, 2004. XIX
135p.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas – Centro Biomédico – Universidade Federal do Espírito Santo

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles

1. Camundongo ApoE *knockout*
2. Barorreflexo
3. Hipertensão Renovascular
4. Aterosclerose

Veronica Accioly Peotta

AVALIAÇÃO DO CONTROLE BARORREFLEXO ARTERIAL EM
CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS (ApoE *KNOCKOUT*) COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Maria Claudia Irigoyen – Instituto do Coração USP (INCOR-
USP)

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva – Faculdade de Medicina do
Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Antonio de Melo Cabral – Universidade Federal do Espírito
Santo (UFES)

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez - Universidade Federal do Espírito
Santo (UFES)
Co-orientador

Profª Drª Silvana dos Santos Meyrelles - Universidade Federal do
Espírito Santo (UFES)
Orientadora

Prof^a Dr^a Ester Miyuki Nakamura Palacios

Coordenador do PPGCF - UFES

Vitória, 15 de dezembro de 2004.

À minha família, por todo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roberto e Maria Helena, os quais, por meio de uma educação que eu julgo perfeita, me proporcionaram uma segurança emocional para que eu construísse os meus objetivos e, assim, tentar realizá-los da melhor maneira possível. Obrigada pelo amor e carinho incondicional de vocês.

Aos meus irmãos, Bob e Bruno, por serem tão amorosos, brincalhões e, portanto, especiais para mim.

Ao Carlos, o melhor amigo e companheiro que alguém poderia desejar.

À Renata, minha filha de coração, a qual, com sua doçura, esperteza e alegria, conquistou um lugar eterno no meu coração.

À nona Pia, por ser a matriarca e uma das responsáveis pela existência da linda família que eu tenho.

Às minhas grandes amigas Angelina e Patrícia, pelo simples fato de serem amigas de verdade.

Aos meus pais científicos, Professor Vasquez e Professora Silvana, que, além da dedicação inquestionável, me contagiaram com o amor pela pesquisa científica na fisiologia cardiovascular.

Aos amigos do laboratório — Ágata, Breno, Camille, Débora, Lídia, Maíne, Michelly, Robéria e Thiago —, pelas horas de descontração e também pelo apoio nos momentos de frustração.

A Ágata em especial, uma das pessoas mais doces e amigas que já conheci.

Ao Breno em especial, um verdadeiro *gentleman*, que, além da sua bondade e amizade pura, realizou, com muita dedicação, os cortes histológicos dos animais experimentais.

Aos colegas da pós-graduação em Ciências Fisiológicas da UFES.

À Prof^a Dra Jacqueline Isaura Alvarez Leite, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade do Estado de Minas Gerais (UFMG), a qual contribuiu com a ferramenta principal deste estudo, os camundongos ApoE *knockout*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia da aorta de um camundongo ApoE ^{-/-} com 16 semanas de idade.....	31
Figura 2 – Fotografia de um clipe para a produção da hipertensão renovascular 2R1C.....	37
Figura 3 – Fotografia de um camundongo C57BL/6 com os cateteres arterial e venoso.....	39
Figura 4 – Valores basais de pressão arterial média e frequência cardíaca em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} <i>sham</i> e 2R1C.....	52
Figura 5 – Valores de peso corporal em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} <i>sham</i> e 2R1C.....	54
Figura 6 – Peso ventricular e relação peso ventricular/peso corporal em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} <i>sham</i> e 2R1C.....	55
Figura 7 – Fotografia dos rins de camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} <i>sham</i> e 2R1C.....	56
Figura 8 – Peso dos rins de camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} <i>sham</i> e 2R1C.....	57
Figura 9 – Relação peso do rim clipado/peso do rim contralateral e relação peso renal/peso corporal em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} <i>sham</i> e 2R1C.....	58
Figura 10 A – Registros típicos durante a avaliação do barorreflexo por meio de uma injeção de fenilefrina em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} <i>sham</i>	60

Figura 10 B – Registros típicos durante a avaliação do barorreflexo por meio de uma injeção de fenilefrina em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} 2R1C.....	61
Figura 11 A – Registros típicos durante a avaliação do barorreflexo por meio de uma injeção de nitroprussiato de sódio em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} sham.....	62
Figura 11 B – Registros típicos durante a avaliação do barorreflexo por meio de uma injeção de nitroprussiato de sódio em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} 2R1C.....	63
Figura 12 – Avaliação do barorreflexo ponto a ponto por meio de uma injeção de fenilefrina em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} sham e 2R1C.....	65
Figura 13 – Média dos ganhos durante a avaliação do barorreflexo (fenilefrina) ponto a ponto em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} sham e 2R1C.....	66
Figura 14 - Avaliação do barorreflexo ponto a ponto por meio de uma injeção de nitroprussiato de sódio em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} sham e 2R1C.....	68
Figura 15 - Média dos ganhos durante a avaliação do barorreflexo (nitroprussiato de sódio) ponto a ponto em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} sham e 2R1C.....	69
Figura 16 - Avaliação do barorreflexo por regressão linear durante uma injeção de fenilefrina em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} sham e 2R1C.....	71
Figura 17 - Avaliação do barorreflexo por regressão linear durante uma injeção de nitroprussiato de sódio em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} sham e 2R1C.....	73
Figura 18 - Avaliação do barorreflexo por barocurvas ajustadas em camundongos	

C57BL/6 e ApoE ^{-/-} sham e 2R1C.....	75
Figura 19 – Dosagem de colesterol plasmático em camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} sham e 2R1C.....	77
Figura 20 – Imunohistoquímica para receptores AT ₁ no arco aórtico de camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} sham e 2R1C.....	80
Figura 21 - Imunohistoquímica para receptores AT ₁ nos ventrículos de camundongos C57BL/6 e ApoE ^{-/-} sham e 2R1C.....	82
Figura 22 - Imunohistoquímica para receptores AT ₁ nos rins de camundongos C57BL/6 sham e 2R1C, aumento de 200X.....	84
Figura 23 - Imunohistoquímica para receptores AT ₁ nos rins de camundongos C57BL/6 sham e 2R1C, aumento de 400X.....	85
Figura 24 - Imunohistoquímica para receptores AT ₁ nos rins de camundongos ApoE ^{-/-} sham e 2R1C, aumento de 200X.....	87
Figura 25 - Imunohistoquímica para receptores AT ₁ nos rins de camundongos ApoE ^{-/-} sham e 2R1C, aumento de 400X.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2R1C: 2 rins - 1 clipe
- µg: micrograma
- µl: microlitro
- °C: grau Celsius
- ApoE: apolipoproteína E
- bpm: batimentos por minuto
- dl: decilitro
- DOCA: acetato de desoxicorticosterona
- ECA: enzima conversora de angiotensina
- epm: erro padrão da média
- FC: frequência cardíaca
- g: grama
- HDL: lipoproteína de alta densidade
- i.p.: intraperitonal
- i.v.: intravenosa
- kg: quilograma
- LDL: lipoproteína de baixa densidade
- L-NAME: N^w-nitro-L-arginina metil éster
- mg: miligrama
- ml: mililitro
- mm: milímetro
- mmHg: milímetro de mercúrio
- NaCl: Cloreto de sódio
- NO: óxido nítrico

- NOS: óxido nítrico sintase
- NTS: núcleo do trato solitário
- p: probabilidade
- PAM: pressão arterial média
- PAP: pressão arterial pulsátil
- PBS: solução de fosfato salina
- Ph: potencial hidrogeniônico
- UI: unidades internacionais
- VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade
- vs: versus

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Importância da Regulação Neural Reflexa da Pressão Arterial.....	16
1.2. Controle Neural da Pressão Arterial em Situações Fisiopatológicas.....	17
1.3. Mecanismos Envolvidos no Desenvolvimento da Hipercolesterolemia, Aterosclerose e Hipertensão.....	20
1.4. Hipertensão Renovascular 2R1C.....	25
1.5. Camundongos Apolipoproteína E Deficientes (<i>ApoE Knockout</i>).....	27
2. OBJETIVOS.....	33
2.2 Objetivos Gerais.....	33
2.3 Objetivos Específicos.....	33
3. METODOLOGIA.....	35
3.1. Animais Experimentais.....	35
3.2. Grupos Experimentais.....	35
3.3. Produção Experimental da Hipertensão Renovascular 2 Rins-1Clípe (2R1C).....	36
3.4. Instrumentação para Medidas Hemodinâmicas.....	37
3.5. Protocolos Experimentais.....	40
3.5.1. Drogas Utilizadas no Protocolo Experimental do Barorreflexo Arterial.....	40
3.5.2. Estudo 1: Avaliação do Controle Barorreflexo da Pressão Arterial.....	40
3.5.3. Estudo 2: Parâmetros Ponderais.....	45
3.5.4. Estudo 3: Histologia.....	45
3.5.5. Estudo 4: Imunohistoquímica.....	47
3.5.6. Estudo 5: Dosagem de Colesterol Plasmático.....	48
3.6. Análise Estatística.....	49
4. RESULTADOS.....	5
4.1. Valores Basais de Pressão Arterial Média e de Frequência cardíaca em Camundongos com Hipertensão Experimental Renovascular 2R1C.....	51
4.2. Parâmetros Ponderais de Camundongos com Hipertensão Renovascular 2R1C.....	53

4.3.	Avaliação do Barorreflexo.....	59
4.3.1.	Análise do Barorreflexo por Variações da Freqüência Cardíaca Ponto a Ponto.....	64
4.3.2.	Análise do Barorreflexo por Regressão Linear.....	70
4.3.3.	Análise do Barorreflexo por Barocurvas Ajustadas.....	74
4.4.	Dosagem do Colesterol Plasmático.....	76
4.5.	Imunohistoquímica.....	78
4.5.1.	Arco Aórtico.....	78
4.5.2.	Ventrículos.....	81
4.5.3.	Rins.....	83
5.	DISCUSSÃO.....	89
5.1.	Valores Basais de Pressão Arterial Média e de Freqüência cardíaca em Camundongos com Hipertensão Experimental Renovascular 2R1C.....	89
5.2.	Parâmetros Ponderais de Camundongos com Hipertensão Renovascular 2R1C.....	94
5.3.	Barorreflexo Arterial.....	97
5.4.	Colesterol Plasmático.....	103
5.5.	Histologia e Imunohistoquímica para os Receptores AT ₁ da Angiotensina II.....	104
5.5.1.	No Arco Aórtico.....	106
5.5.2.	Nos Ventrículos.....	109
5.5.3.	Nos Rins.....	110
6.	CONCLUSÕES.....	113
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

RESUMO

O barorreflexo arterial é um reflexo neural de controle cardiovascular que corrige as variações bruscas de pressão arterial, garantindo a perfusão adequada de todos os tecidos do organismo. Seus receptores, chamados de barorreceptores, estão localizados no arco aórtico e seio carotídeo. Este reflexo pode estar alterado diante de algumas fisiopatologias, tais como a hipertensão arterial e a aterosclerose. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o barorreflexo arterial em camundongos com hipertensão experimental renovascular 2 rins 1 clipe (2R1C - angiotensina II dependente) associada ou não com aterosclerose.

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 e ApoE^{-/-} *knockout*, machos, com 8 semanas de idade e peso corporal de 23g, em média. Estes animais foram submetidos a uma hipertensão experimental 2R1C, por meio de implantação de um clipe na artéria renal esquerda, produzindo uma estenose durante 28 dias, semelhante à estenose renal observada em humanos. Os animais controles (*sham*) passaram pelos mesmos procedimentos cirúrgicos, exceto por não receberem o clipe. Para os parâmetros hemodinâmicos, a artéria carótida foi cateterizada para o registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência (FC) e a veia jugular cateterizada para a administração de drogas vasoativas. Testamos o barorreflexo farmacologicamente com uma única injeção intravenosa de fenilefrina (48µg/kg) e nitroprussiato de sódio (24µg/kg). Ao término do teste do barorreflexo, coletamos amostras de sangue para a dosagem de colesterol plasmático e sacrificamos os animais, para analisarmos alguns parâmetros ponderais. Em seguida, realizamos a imunohistoquímica para os receptores AT₁ da angiotensina II no arco aórtico, ventrículos e rins dos animais.

Os valores de PAM e a FC foram significativamente maiores nos animais submetidos à técnica 2R1C quando comparados com os dos controles *sham*, sem diferenças entre C57BL/6 e ApoE^{-/-}. Os animais hipertensos apresentaram hipertrofia

ventricular quando comparados com os animais *sham*, sem diferenças entre os grupos C57BL/6 e ApoE^{-/-}. Nos animais C57BL/6 e ApoE^{-/-} com hipertensão 2R1C, o barorreflexo mostrou-se exagerado frente ao vasoconstritor fenilefrina e atenuado frente ao vasodilatador nitroprussiato de sódio. Interessante foi o resultado do grupo ApoE^{-/-} *sham*, que apresentou o dobro da resposta taquicárdica do animal C57BL/6 *sham* após a injeção do nitroprussiato de sódio. A imunohistoquímica revelou um mecanismo de *downregulation* dos receptores AT₁ no arco aórtico dos animais C57BL/6 2R1C e *upregulation* no mesmo vaso dos animais ApoE^{-/-} 2R1C, quando comparado com os respectivos animais *sham*. Nos ventrículos dos animais 2R1C, além de estar aumentada quando comparada com os animais *sham*, a expressão dos receptores AT₁ está localizada no pericárdio e endocárdio. Já nos animais ApoE^{-/-}, estavam distribuídos por todo o ventrículo. Nos rins, houve um aumento da expressão dos receptores AT₁ no rim contralateral, mas sobretudo no rim clipado dos animais C57BL/6 e ApoE^{-/-} quando comparado com os respectivos animais *sham*, sendo este aumento mais pronunciado nos animais ApoE^{-/-}2R1C.

Podemos concluir que, nos estágios iniciais da aterosclerose, o componente taquicárdico do barorreflexo está exagerado. A hipertensão 2R1C exacerba o componente bradicárdico e atenua o componente taquicárdico do barorreflexo nos camundongos C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice.

ABSTRACT

The arterial baroreflex is a cardiovascular neural reflex that adjust the changes in arterial pressure, promoting an adequate perfusion of all organism tissues. The baroreflex receptors, called baroreceptors, are localized in the aortic arch and carotid sinus. This reflex may be impaired in some pathophysiological conditions like arterial hypertension and atherosclerosis. Thus, our goal was to evaluate the arterial baroreflex in mice with 2 kidneys -1 clip (2K1C) renovascular hypertension associated or not with atherosclerosis.

Male C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice with 8 weeks and 23 g of body weight received a clip on the left renal artery for 28 days producing a stenosis like the renal human stenosis. This hypertensive group was called 2K1C. The control group was submitted to the same procedures, except for not receiving the clip and were called sham-operated. For the hemodynamic recordings, the carotid artery received a catheter for pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) measurements and the jugular vein received a catheter for the drugs administration. The baroreflex was evaluated with an intravenous single injection of phenylephrine (48 µg/kg) or sodium nitroprusside (24 µg/kg). At the end of the baroreflex evaluation we collected some blood samples for cholesterol analysis and the animals were euthanized for the body and organs parameters analysis. The immunohistochemical for the AT₁ angiotensin II receptors expression was done in the aortic arch, ventricles and kidneys.

The 2K1C group presented hypertension, tachycardia and ventricular hypertrophy with no differences between C57BL/6 and ApoE^{-/-}. The baroreflex response was exaggerated during the phenylephrine injection and attenuated during the sodium nitroprusside injection in both the 2K1C C57BL/6 and ApoE^{-/-} groups. Interesting data were observed in the ApoE^{-/-} sham group showing 2-fold the tachycardic response of the C57BL/6 sham group during the sodium nitroprusside

injection. The immunohistochemical reported a downregulation of the AT₁ receptors in the aortic arch of the C57BL/6 2K1C hypertensive group and an upregulation of these receptors in the ApoE^{-/-} 2K1C hipertensive group. The ventricles presented an upregulation of the AT₁ receptors in both renovascular C57BL/6 and ApoE^{-/-} groups. The non-stenotic kidney of the hypertensive groups showed an increase in the expression of the AT₁ receptors but the stenotic kidney presented an upregulation of these receptors when compared with the sham group, no differences were observed between the C57BL/6 and ApoE^{-/-} groups.

In conclusion, at the early stage of atherosclerosis the tachycardic component of the BR is exaggerated. The 2K1C hypertension exacerbates the bradycardic and attenuate the tachycardic component of the BR in C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice.

1. Introdução

1.1. Importância da Regulação Neural Reflexa da Pressão Arterial

O sistema cardiovascular mantém a perfusão dos tecidos, transportando para estes nutrientes e oxigênio e retirando deles os catabólitos do metabolismo intracelular. Para o bom desempenho dessa função, o organismo deve manter a pressão arterial em níveis adequados e, portanto, o bombeamento do sangue através do coração, a condução do sangue por meio do sistema arterial, as trocas capilares nos tecidos e o retorno venoso devem atuar em harmonia. A manutenção da homeostase cardiovascular é realizada por meio de mecanismos locais, humorais e neurais de regulação da função cardiovascular que interagem entre si.

O controle da pressão arterial momento-a-momento é um desses mecanismos e é realizado pelos barorreceptores arteriais, os quais são mecanorreceptores localizados na curvatura da artéria aorta e na bifurcação do seio carotídeo dos mamíferos (Alexander & Decuir, 1963). Este controle neural da função cardiovascular é conhecido como o controle barorreflexo da pressão arterial e, embora venha sendo investigado por anos, ainda não é completamente compreendido, principalmente nas diferentes fisiopatologias do sistema cardiovascular, como a aterosclerose e a hipertensão, e especialmente quando estas duas aparecem juntas.

Os barorreceptores são constituídos por terminações nervosas livres situadas na camada adventícia da aorta e do seio carotídeo na carótida interna, que dão origem aos nervos depressores aórtico e carotídeo, respectivamente. Estas aferências incorporam-se aos nervos vago e glossofaríngeo, os quais transmitem as informações das terminações barorreceptoras para o núcleo do

trato solitário na porção dorsal do bulbo (Chalmers e Pilowsky, 1991; Chapleau, 1999; Reis, 1999).

Em situações fisiológicas, aumentos na pressão arterial resultam em maior número de potenciais de ação que trafegam pelas aferências barorreceptoras para o núcleo do trato solitário, resultando em um aumento da atividade vagal para as células contráteis cardíacas, com simultânea diminuição da atividade simpática para as mesmas, e também para a vasculatura de resistência periférica. Esta ativação das eferências vagais com simultânea retirada da atividade simpática resulta em uma diminuição do débito cardíaco e da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, corrige a pressão arterial inicialmente elevada (Krieger, 1970). Por outro lado, durante diminuições na pressão arterial, ocorre um processo inverso ao descrito acima. Ou seja, o número de potenciais de ação que chegam ao núcleo do trato solitário é muito reduzido, uma vez que os barorreceptores não estão distendidos. Essa ausência de informação faz com que o núcleo do trato solitário interprete que a pressão arterial precisa ser corrigida para valores mais elevados e, portanto, há um crescimento da atividade simpática para o coração e para a vasculatura periférica, aumentando a resistência vascular com a conseqüentemente elevação da pressão arterial. Estes ajustes reflexos neurais são capazes de manter a pressão arterial em níveis adequados e estáveis, o que é uma condição fundamental para garantir a perfusão adequada de todos os tecidos e ajuda a manter a homeostase do sistema cardiovascular.

1.2. Controle Neural da Pressão Arterial em Situações Fisiopatológicas

Devido aos barorreceptores serem mecanorreceptores e, portanto, sensíveis ao estiramento, estes estão vulneráveis quando há alterações da pressão arterial. Por exemplo: quando a pressão arterial é mantida elevada

prolongadamente (hipertensão), esse sistema deixa de se opor ao aumento pressórico e se adapta a esse novo patamar de pressão arterial (Moreira et al., 1990; Krieger et al., 1982). O deslocamento da faixa normal de atuação do barorreflexo para esse novo nível de pressão arterial é conhecido como *resetting* ou reajuste (Krieger et al, 1982; Korner, 1989) e sabe-se hoje que esse processo pode ser bastante rápido, levando apenas alguns segundos para realização dos ajustes (Moreira et al., 1990).

Há estudos mostrando que o controle barorreflexo da frequência cardíaca e da atividade nervosa simpática para os vasos de resistência pode ser influenciado por diferentes fisiopatologias, tais como a hipertensão arterial (Head e Adams, 1988; Moysés et al., 1994; Vasquez et al., 1994; Dias da Silva et al., 1994; Meyrelles et al., 1998; Irigoyen & Krieger, 1998), infarto do miocárdio (Meyrelles et al., 1996) e hipertrofia cardíaca (Meyrelles et al., 1998).

Portanto, diante de determinadas fisiopatologias cardiovasculares, um dos mecanismos mais eficientes para corrigir momento-a-momento os desvios da pressão arterial deixaria de exercer plenamente seu papel e, desse modo, contribuiria para o agravamento das doenças cardiovasculares. Baseados nesse entendimento, a maioria dos pesquisadores desta área acredita que, mais do que causa, a disfunção barorreflexa é uma consequência de estados fisiopatológicos do sistema cardiovascular. Destacamos, ainda, que alterações no controle barorreflexo arterial poderiam resultar em alterações de outros importantes mecanismos neurais de regulação cardiovascular, tais como os reflexos cardiopulmonares (receptores que respondem a alterações de volume cardíaco) e o quimiorreflexo (que responde a variações na composição dos gases sanguíneos), e cuja importância para a manutenção da homeostase

cardiovascular tem sido amplamente demonstrada (Franchini e Krieger, 1992; Vasquez, 1994; Vasquez et al., 1997; Chapleau, 1999; Mohanty, 1999; Peotta et al., 2001).

Dentre as fisiopatologias cardiovasculares experimentais e clínicas, a hipercolesterolemia e a aterosclerose poderiam estar entre as que mais afetam a função barorreflexa, por tratar-se de doenças inflamatórias que comprometem a estrutura e a função das artérias e, conseqüentemente, também afetando as terminações nervosas barorreceptoras que se localizam na camada adventícia do arco aórtico e seio carotídeo.

Embora haja um grande número de estudos sobre o mecanismo de funcionamento do barorreflexo, principalmente após a publicação do modelo de desnervação sino-aórtica por Krieger (1964), pouco se sabe sobre as conseqüências da hipercolesterolemia e da doença aterosclerótica para o funcionamento do controle barorreflexo da pressão arterial, (Xie et al., 1988; Dart et al., 1991; Meyrelles e Chapleau, 2000), e ainda menos quando estas estão acompanhadas de hipertensão arterial.

1.3. Mecanismos Envolvidos no Desenvolvimento da Hipercolesterolemia, Aterosclerose e Hipertensão

O processo aterosclerótico, o qual pode ser favorecido por uma pré-disposição genética, consiste do excessivo acúmulo de lipídeos dentro da parede arterial, especialmente na camada íntima (Naito, 1996). Os níveis plasmáticos elevados do lipídeo colesterol, situação conhecida como hipercolesterolemia, é considerado um dos principais fatores de risco para a determinação de aterosclerose. O tipo de colesterol que está elevado na hipercolesterolemia é chamado de LDL (*Low Density Lipoproteins*).

Quando partículas de LDL tornam-se excessivas na artéria, acabam sofrendo uma oxidação, passando a chamar-se de LDL modificada e são internalizadas pelos macrófagos. A internalização leva à formação de peróxidos de lipídeo e facilita o acúmulo de éster de colesterol, resultando na formação das células espumosas na camada íntima dos vasos. Uma vez modificada e capturada pelos macrófagos, a LDL modificada ativa a formação de mais células espumosas. Essa remoção e a captura de LDL modificada são partes importantes do papel protetor dos macrófagos na resposta inflamatória inicial e minimizam os efeitos da LDL modificada nas células endoteliais e do músculo liso. A LDL modificada é a maior causa das lesões endoteliais e do músculo liso subjacente. Além disto, exerce efeitos quimiotáxicos para monócitos, resultando no recrutamento destas células para o local de acúmulo das células espumosas, bem como ativam a superexpressão do gene para o fator estimulador de colônias de macrófagos, contribuindo para expandir a resposta inflamatória através da diferenciação de monócitos em macrófagos e a entrada de novos monócitos nas lesões. Esta primeira etapa inflamatória é chamada de estrias gordurosas, ou seja, as primeiras lesões ateroscleróticas que vão se complicando e passam, posteriormente, a ser chamadas de lesões ateroscleróticas complicadas ou avançadas (Ross, 1999).

As lesões ateroscleróticas iniciais ocorrem em locais em que o fluxo de sangue apresenta-se alterado, interferindo no *shear stress* e nas características normais do endotélio, reduzindo a produção de óxido nítrico. Estes fatores ocorrem principalmente nas bifurcações da aorta, pois nesses locais o fluxo de sangue torna-se turbilhonar. O processo de formação das placas ateromatosas pode ser descrito como constituído por seis fases essenciais, tais quais: 1) disfunção endotelial; 2) infiltração de partículas de LDL, leucócitos circulantes,

especificamente os linfócitos T, e monócitos na camada subendotelial; 3) oxidação da LDL; 4) formação das células espumosas; 5) migração e proliferação do músculo liso vascular na camada subendotelial com síntese de matriz extracelular; 6) lesões estruturais no endotélio seguida de deposição de plaquetas e formação de trombos (Luz & Coimbra, 2004).

As lesões ateroscleróticas têm grande probabilidade de causar a isquemia no coração e cérebro, resultando em infarto do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais. Esta doença contribui majoritariamente para o alarmante número de indivíduos que morrem por doenças cardiovasculares e, por isto, constitui-se em um dos principais alvos de preocupação pelas organizações mundiais de saúde.

Apesar da aterosclerose ser freqüentemente associada com arteriosclerose, elas diferem entre si em algumas características (O'Rourke, 1999). Arteriosclerose é difusa, generalizada, dilatatória e causa problemas predominantemente na porção inicial do sistema arterial devido ao enrijecimento arterial, podendo estar presente em indivíduos idosos e hipertensos na ausência de outros fatores de risco. Em contrapartida, aterosclerose, a qual é um dos enfoques do presente estudo, é focal, vasoconstritiva, pode causar problemas isquêmicos predominantemente nas porções terminais do sistema arterial como conseqüência da obstrução vascular ou podendo causar ainda embolismo aterogênico. Aterosclerose poderia ser definida, geralmente, como uma conseqüência de estados crônicos de níveis elevados de colesterol plasmático, causando nos vasos sangüíneos uma doença inflamatória (Ross, 1999).

Embora aterosclerose e hipertensão sejam doenças distintas e nem todo indivíduo com aterosclerose desenvolva hipertensão arterial e, tampouco, a vice-versa, há um elevado número de indivíduos que manifestam esta combinação

(Alexander, 1995; Pullicino, 1999). Atualmente, existem várias evidências postulando que a hipertensão arterial predispõe a aceleração da aterosclerose, pelo menos em parte devido ao sinergismo entre pressão arterial elevada e estímulos aterogênicos via angiotensina II para indução de alterações nos vasos sanguíneos como ações pro inflamatórias, aumentando a formação de peróxido de hidrogênio e de radicais livres, como radicais hidroxil e ânions superóxidos. (Alexander, 1995; Sugiyama et al., 1997; Ross, 1999). Estas substâncias reduzem a formação de óxido nítrico pelo endotélio, aumentando a adesão de leucócitos e a resistência periférica. Portanto, alterações morfofuncionais na musculatura lisa e na camada endotelial vascular durante os processos hipertensivos são consideradas como um importante fator de risco para a aterosclerose (Chonobian, 1999; Doyle, 1992; Kannel e Wilson, 1999).

Evidências experimentais para o problema acima vêm de estudos demonstrando que a alimentação rica em colesterol poderia aumentar a expressão da enzima conversora de angiotensina e dos receptores da própria angiotensina II nas paredes vasculares (Hof e Hof, 1988; Potter et al., 1998; Yang et al., 1998). Experimentos feitos com coelhos *Watanabe*, que são geneticamente hiperlipidêmicos devido aos receptores de LDL serem ineficientes, mostraram que a indução de hipertensão arterial nesses animais leva a um dramático aumento do processo aterosclerótico (Chonobian et al., 1989).

A angiotensina II, o principal produto do sistema renina angiotensina, além de causar hipertensão arterial contribui também para a aterogênese e, conseqüentemente, para a aterosclerose via receptores AT₁. Dentre os efeitos vasoconstritores da angiotensina II já conhecidos, devem ser destacados também seus efeitos aterogênicos, principalmente oxidando LDL nos espaços

subendotélias, via ativação de macrófagos, transformando a LDL em uma lipoproteína modificada (LDL-ang-II), fazendo com que os macrófagos passem a capturá-las em uma taxa bem mais acelerada (Chonobian et al., 1989). Além disto, a angiotensina II aumenta a produção de ânions superóxidos e também de radicais hidroxil via ativação da NADPH oxidase (Keidar, 1998). Esses efeitos aparecem nos primeiros estágios de aterogênese, que são os de formação das células espumosas. Tudo indica que a angiotensina II, que está mais ativa nos processos ateroscleróticos, não é aquela produzida via enzima conversora da angiotensina (ECA), e sim pelas vias alternativas de produção, principalmente pela via da quimase, que é a geração mais comum de angiotensina II a partir de angiotensina I no coração e nos vasos sanguíneos. Portanto, a angiotensina II, com maior grau de atuação nos processos ateroscleróticos, parece ser a obtida pela via da quimase, uma vez que Arakawa e Urata (2000) observaram uma relação entre níveis elevados de colesterol plasmático e atividade aumentada da quimase arterial em pacientes com aterosclerose.

Devido ao fato da curvatura da aorta e da bifurcação das artérias carótidas estarem entre os locais comuns de aterosclerose e de placas ateromatosas (Simon et al., 1998; Ollin, 1999), coincidindo com o local das terminações barorreceptores arteriais, mudanças na distensibilidade, bem como no funcionamento destes vasos, devem provavelmente afetar a sensibilidade dos barorreceptores arteriais. Trabalhos recentes realizados em seres humanos (John et al., 1999) e em coelhos (Wilfert et al., 2000) demonstraram que a resposta vasoconstritora à angiotensina II está aumentada na aterosclerose e que a mesma poderia ser devida a uma atenuação da sensibilidade do barorreflexo (Wilfert et al., 2000).

Até o momento, poucos trabalhos experimentais foram desenvolvidos visando entender a influência da hipercolesterolemia e da aterosclerose na função barorreceptora (Xie et al., 1988; Dart et al., 1991). Embora o coelho tenha sido praticamente o animal preferencial para tais estudos, este apresenta algumas desvantagens, como o seu grande porte, os gastos para a manutenção, os cuidados na criação e o alto custo para a procriação em biotérios, além da dificuldade de manipulação de seus genes. Em contraste com estas dificuldades, o camundongo vem sendo o animal de laboratório cada vez mais utilizado e, atualmente, o mais indicado para estudos de doenças associadas com alterações hereditárias na expressão de seus genes (Vasquez et al., 1998, 1999), principalmente pela facilidade de manipulação de seu genoma para nascerem com predisposição para desenvolvimento de fisiopatologias cardiovasculares como aterosclerose e hipertensão arterial (Stec et al., 1988; Meyrelles e Chapleau, 1999, 2000).

1.4. Hipertensão Renovascular 2R1C

O modelo experimental de hipertensão renovascular dois rins e um clipe (2R1C) é amplamente estudado em ratos (Cabral et al., 1998; Moyses et al., 1994; Dedeoglu & Springate, 2001) e, mais recentemente, também em camundongos (Johns et al., 1996; Wiesel et al., 1997; Madeddu et al., 1998; Murat et al., 2000; Cervenka et al., 2002; Cervenka et al., 2003; Mazzolai et al., 2004; Lazartigues et al., 2004).

Neste modelo experimental, a hipertensão é induzida por uma estenose unilateral da artéria renal devido ao implante de um clipe (Goldblatt et al., 1934), que obstrui parcialmente o fluxo sangüíneo, causando uma redução da pressão de

perfusão renal, o que estimula o aumento da síntese da enzima renina e a liberação desta pelas células do aparelho justaglomerular do rim clipado. A renina cliva angiotensinogênio em angiotensina I que, por sua vez, é transformada em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina localizada principalmente no pulmão. A angiotensina II circulante, via efeitos diretos sobre os receptores AT_{1A}, aumenta a resistência periférica total agudamente. Conseqüentemente, aumenta a pressão arterial, além de também ter ação em quase todos os órgãos e tecidos (Mitchell & Navar, 1995). Várias dessas ações contribuem para aumentar a resistência vascular periférica e a pressão arterial.

Com o aumento progressivo da pressão arterial sistêmica, a pressão de perfusão e o fluxo para o rim clipado é restabelecido e o rim contralateral não clipado, submetido a elevações progressivas da pressão arterial, passa a não liberar mais renina. A cascata de eventos iniciada pelo aumento da secreção de renina pelo rim clipado leva a um aumento de angiotensina II circulante, a qual, por sua vez, inibe a produção de renina pelo rim não clipado. Essa redução é comprovada pela diminuição do RNA mensageiro para renina (von Thun et al., 1994). Os efeitos diretos e indiretos do aumento da concentração de angiotensina II circulante resultam em um crescimento da produção de aldosterona no córtex adrenal, avolumando ainda mais a atividade do sistema nervoso simpático e contribuindo para prejudicar a excreção do rim não clipado (Mitchell et al., 1995; Ploth 1983). Essa interação de efeitos contribui para os estágios iniciais da hipertensão 2R1C, em que a atividade de renina plasmática e de angiotensina II circulante estão elevadas. Assim que a pressão de perfusão renal é restabelecida, as concentrações de renina plasmática e de angiotensina II circulante retornam a valores normais. Entretanto, a pressão arterial continua elevada e, mesmo durante

a manutenção desse estágio, a angiotensina II intrarenal elevada continua a exercer efeitos na função do rim não clipado — o que mantém a pressão arterial elevada.

O nível elevado de angiotensina II intrarenal no rim não clipado mostra que há um acúmulo de angiotensina II circulante no rim e/ou mecanismos de produção de angiotensina II alternativos e que não dependem de renina, como por exemplo, as quimases, catepsina A, G e D e tonina (Navar et al., 1998).

Portanto, a hipertensão renovascular 2R1C é sustentada por valores elevados de angiotensina II, não a circulante, mas sim a angiotensina II intrarenal no rim não clipado. E, como consequência funcional, é a angiotensina II intrarenal elevada que vai ser a responsável por alterar a reabsorção tubular, que apresenta-se aumentada, e a função hemodinâmica, nesse modelo experimental, sustentando assim a hipertensão arterial (Navar et al., 1998). Além disso, não podemos esquecer dos sistemas renina-angiotensina locais, os quais atuam diretamente no sistema cardiovascular como coração e vasos sanguíneos (Volpe et al., 2003), aumentando ainda mais os efeitos da angiotensina II.

1.5. Camundongos Apolipoproteína E Deficientes (*ApoE Knockout*)

A busca do conhecimento sobre como os genes controlam o desenvolvimento e a função das células dos diversos sistemas dos mamíferos teve seu início no princípio deste século. Foi a partir dos avanços nos últimos anos, com técnicas de biologia molecular, que o camundongo tornou-se um poderoso instrumento de investigação. Embora os genes também possam ser manipulados em ratos, as particularidades metodológicas que permitem interferir nas células embrionárias pluripotentes (*embryonic stem cells*), conferem ao

camundongo propriedades únicas. Estas células são provenientes da massa celular interna do blastocisto do camundongo, contribuindo para a formação do embrião quando injetadas em mórulas e, assim, permitindo a formação de embriões contendo o transgene desejado. Entretanto, se o objetivo for a obtenção de um alelo nulo (*knockout*), o gene endógeno de interesse será trocado por uma construção contendo uma mutação específica que interrompa a expressão do gene. Isto pode ser feito com técnicas de recombinação homóloga, a qual tem maior frequência nas células embrionárias pluripotentes, visto que estas são células ainda totalmente indiferenciadas (Piedrahita et al., 1992; Zhang et al., 1992).

Essas técnicas de biologia molecular permitiram a criação de um modelo murino para a deficiência da apolipoproteína E (ApoE) por Piedrahita et al (1992) e Zhang et al (1992), visando um melhor entendimento da hipercolesterolemia e da aterosclerose humana. O camundongo ApoE *knockout* já nasce hipercolesterolêmico, apresentando níveis de colesterol plasmático total 5-6 vezes maior que os camundongos isogênicos controles C57BL/6, mesmo sob uma dieta normal (Piedrahita et al., 1992; Plump et al., 1992; Seo et al., 1997; Shi et al., 1997; Hofker et al., 1998). Esses camundongos ApoE-deficientes têm um dramático aumento das lipoproteínas plasmáticas VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*), IDL (*Intermediate Density Lipoproteins*) e LDL e uma redução de HDL (*High Density Lipoproteins*) (Plump et al., 1992; Breslow, 1993). Além disto, os camundongos ApoE *knockout* desenvolvem um tipo de aterosclerose genética muito semelhante à hiperlipidemia tipo III que ocorre em humanos, tornando esse modelo experimental o mais utilizado atualmente nos estudos da evolução do

processo aterosclerótico, assim como, na aterosclerose estabelecida (Plump et al., 1992).

Estudos histopatológicos nesses animais revelam lesões em todas as fases da aterosclerose e em toda a extensão da árvore aórtica, principalmente na curvatura inferior do arco aórtico, local em que encontram-se as terminações barorreceptoras (figura 1). As primeiras lesões com estrias gordurosas e células espumosas se desenvolvem a partir de 8 semanas de idade e progridem para lesões avançadas depois de 20 semanas. Os principais locais das lesões incluem a raiz aórtica, a curvatura inferior do arco aórtico, as ramificações aórticas como a artéria carótida, a artéria mesentérica superior, a artéria renal, a bifurcação aórtica e a artéria pulmonar (Nakashima et al., 1994).

A ApoE, uma glicoproteína rica em arginina de 34-kD e com três isoformas nos humanos (E₂, E₃ e E₄), é a maior componente da superfície das lipoproteínas plasmáticas, que serve como ligante para receptores que medeiam a depuração de muitas classes de lipoproteínas plasmáticas, incluindo os quilomícrons, HDL e VLDL (Mahley, 1988) e que, além disso, tem efeitos pleiotrópicos biológicos. Foi primeiramente encontrada sendo sintetizada por uma variedade de células periféricas como, por exemplo, macrófagos e astrócitos. Mais recentemente, novas propriedades fisiológicas foram então identificadas (Mahley, 1998 e Mazzone, 1996). Somado a isto, a ApoE pode também ter papel na modulação imune, afetando a secreção de várias citocinas (Kelly et al., 1994). Também inibe a agregação plaquetária (Riddell et al., 1997), exerce efeitos antiproliferativos (Kelly et al., 1994), contribui para o efluxo de colesterol das células nas lesões ateroscleróticas (Von Eckardstein., 1996) e possui capacidades antioxidantes (Miyata & Smith, 1996). A maior fonte de ApoE é encontrada no fígado. A segunda

maior fonte de ApoE está nos rins, sendo produzida pelas células mesangiais, mais na região cortical do que na medular (Chen et al., 2001). Nos rins, a ApoE tem um papel protetor, prevenindo a proliferação das células mesangiais, evitando o acúmulo das mesmas, acúmulo esse que é uma das principais características das doenças renais (Chen et al., 2001).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o mecanismo neural de controle da pressão arterial em camundongos hipercolesterolêmicos (ApoE *knockout*), associados ou não, com a hipertensão arterial renovascular 2R1C.

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer a técnica de produção do modelo de hipertensão experimental renovascular 2R1C em camundongos C57BL/6 (controles) e ApoE *knockout*.
- Observar se a condição de hipertensão associada com hipercolesterolemia estaria acelerando o processo aterosclerótico nos camundongos ApoE 2R1C.
- Avaliar a sensibilidade do controle barorreflexo da pressão arterial em camundongos ApoE *knockout* acordados, em presença ou não de hipertensão renovascular 2R1C.
- Investigar possíveis alterações dos parâmetros corporais e cardiovasculares tais como: peso corporal, presença de hipertrofia ventricular, hipertrofia e atrofia renais em camundongos hipercolesterolêmicos com hipertensão renovascular 2R1C.
- Avaliar a expressão dos receptores AT₁ da angiotensina II no arco aórtico, ventrículos e rins dos animais com hipercolesterolemia e hipertensão renovascular 2R1C.

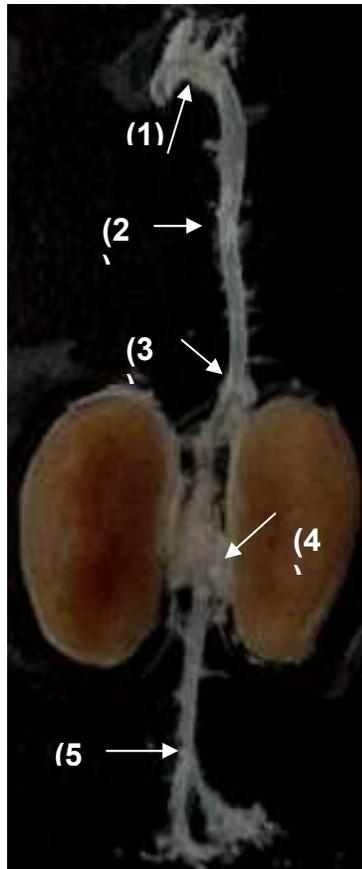


Figura 1: Fotografia da aorta de um camundongo ApoE^{-/-} com 16 semanas de idade. As setas apontam para os pontos esbranquiçados, indicativos de presença das lesões ateroscleróticas: (1) curvatura inferior do arco aórtico, (2) aorta torácica, (3) aorta abdominal, (4) ramificação da artéria renal esquerda e (5) bifurcação ilíaca.

Embora o camundongo ApoE-deficiente seja um modelo adequado para o estudo da correção gênica na dislipoproteinemia genética (Rouis et al., 1999), ainda faltam estudos que demonstrem os efeitos da hipercolesterolemia e da aterosclerose sobre os mecanismos de regulação cardiovascular, como, por

exemplo, o barorreflexo e, sobretudo, quando associados com a hipertensão renovascular 2R1C.

Portanto, o principal questionamento do presente estudo é:

Como estariam funcionando os barorreceptores e, conseqüentemente, o controle barorreflexo da pressão arterial quando há uma combinação de duas fisiopatologias tais como a aterosclerose e a hipertensão arterial?

3. Metodologia

3.1. Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos da raça C57BL/6 (controles) e ApoE *knockout* (hipercolesterolêmicos), machos, pesando em média 23g e idade de aproximadamente 8 semanas. Os animais eram provenientes de uma colônia de reprodução de responsabilidade do nossa própria instituição, sendo criados e mantidos no Biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro Biomédico da UFES. Têm a garantia de serem isogênicos. Isto é: todos filhos de casais irmãos e, portanto, com o mínimo de variabilidade genética. Os mesmos recebiam água e ração à vontade e tinham controlados o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como a temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e a umidade do local onde eram mantidos (70%). A criação e o manuseio experimental dos exemplares foi realizada de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) e American Physiological Society (APS), respectivamente.

3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em dois grandes grupos experimentais:

- C57BL/6 - controles
- ApoE *knockout* (ApoE^{-/-}) - hipercolesterolêmicos

Esses grupos, por sua vez, foram ainda subdivididos em:

- Normotensos - controles *sham*
- Hipertensos - 2R1C

3.3. Produção Experimental da Hipertensão Renovascular 2 Rins-1Clipe (2R1C)

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (91 mg/kg) e xilazina (9,1 mg/kg *i.p.*), colocados em posição decúbito lateral e, com o auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto eletrônica S/A Sn-2002, São Carlos, SP), o rim esquerdo foi exposto, por meio de uma pequena incisão lateral. Após um completo isolamento da artéria renal esquerda, um clipe de aço inox de dimensões 3x2x1mm (Exidel SA, Suíça - ver maiores detalhes na figura 2), desenvolvido especificamente para a utilização em camundongos, com uma abertura de 0,12 mm foi, então, colocado na artéria renal esquerda, próximo à aorta abdominal, determinando uma estenose renal semelhante à estenose renal humana. Em seguida, o rim foi acomodado cuidadosamente na cavidade retroperitoneal, as incisões peritoneal e abdominal foram suturadas e, após receberem uma dose de antibiótico (penicilina – 100UI, Eurofarma LTDA, São Paulo, SP), recuperaram-se da anestesia. Para os normotensos, foram realizados os mesmos procedimentos cirúrgicos acima, exceto pela não colocação do clipe na artéria renal, o que denominamos de cirurgia fictícia (*sham*). Durante toda a cirurgia, a temperatura corporal era controlada por uma manta térmica regulada para manter a temperatura em torno de 37°C.

Os camundongos foram mantidos durante 28 dias em gaiolas individuais, com livre acesso a água e ração. O ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como, a temperatura e a umidade do local onde permaneciam, eram controlados em $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 70%, respectivamente.

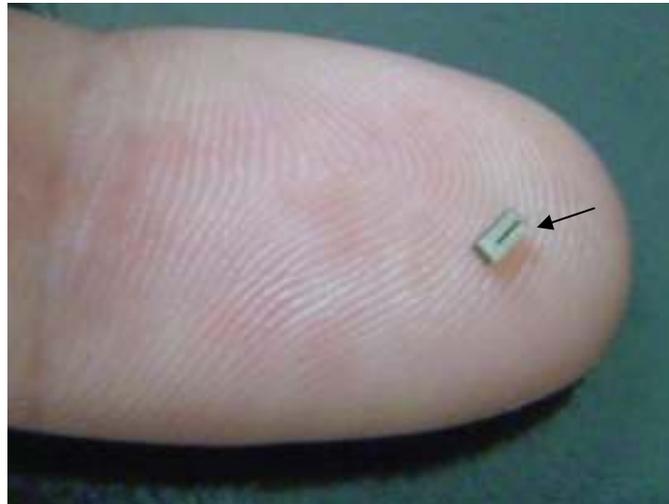


Figura 2: Fotografia de um clipe de aço inox (0,12mm) utilizado na cirurgia para a produção da hipertensão experimental renovascular 2R1C em camundongos.

3.4. Instrumentação para Medidas Hemodinâmicas

Após 28 dias de estenose da artéria renal, os animais foram anestesiados e cateteres de 4cm de comprimento (Micro-Renathane, Braintree Science Inc, USA) e .040mm de diâmetro externo x .025mm de diâmetro interno, submetidos à redução do diâmetro para aproximadamente 0,22 a 0,25mm por meio de aquecimento, foram inseridos na artéria carótida direita para registros de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), bem como de frequência

cardíaca (FC), e também na veia jugular esquerda, para a administração de drogas. Previamente aos implantes dos cateteres, esses foram preenchidos com uma solução de NaCl a 0,9% heparinizada (50UI) e obstruídos com pinos de metal. Os cateteres foram exteriorizados na nuca dos animais com auxílio de um *trocater* (figura 3). Posteriormente, as incisões foram suturadas e administrado antibiótico penicilina na mesma dose descrita no item 3.3. O cateter arterial foi acoplado a um transdutor de pressão, o qual, por sua vez, foi conectado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA, USA) para aferição de PAP (mmHg), PAM (mmHg) e FC (bpm). O cateter da veia jugular foi conectado a uma cânula extensora para facilitar a administração das drogas sem manipular o animal.

Os animais foram utilizados para os experimentos somente após um período mínimo de 24-48 horas, para que pudessem recuperar da cirurgia. Todos os procedimentos cirúrgicos foram desenvolvidos com o auxílio de uma lupa cirúrgica e de uma manta térmica, tendo a cirurgia durado aproximadamente 1 hora, sendo sempre realizada no mesmo horário para todos eles.

(A)



(B)



Figura 3: Fotografia de um camundongo C57BL/6 com os cateteres arterial e venoso exteriorizados na nuca (A), vista lateral e (B) vista frontal.

3.5. Protocolos Experimentais

3.5.1. Drogas Utilizadas no Protocolo Experimental do Barorreflexo

Arterial

- Fenilefrina: droga vasoconstritora (simpatomimética) seletiva para receptores α_1 encontrados nos vasos sanguíneos;
- Nitroprussiato de sódio: droga vasodilatadora.

As drogas utilizados no estudo do barorreflexo foram obtidas da Sigma-Aldrich Chemicals Co (St Louis, MO, USA), e diluídas em solução de NaCl a 0,9%.

Estudo 1: Avaliação do Controle Barorreflexo

Este estudo foi idealizado visando responder ao seguinte questionamento:

Como estaria funcionando o barorreflexo arterial em camundongos ateroscleróticos associado ou não com hipertensão renovascular 2R1C (dependente de angiotensina II)?

Buscando respostas para esses questionamentos, após 24–48 horas da implantação dos cateteres, a atividade dos barorreceptores arteriais foi verificada nos camundongos acordados. Após um período de estabilização da pressão

arterial e da frequência cardíaca de aproximadamente 20 minutos, os experimentos foram iniciados.

O barorreflexo foi avaliado pela resposta cronotrópica reflexa frente aos aumentos ou diminuições da pressão arterial por meio de uma única injeção *in bolus* e randomizada dos agentes fenilefrina (48,0µg/kg, em um volume de 5µl) e nitroprussiato de sódio (24,0µg/kg, em um volume de 5µl), respectivamente. Para empurrar o volume após a administração de cada uma das drogas, foi injetado 35µl de salina 0,9% por meio de uma seringa *Hamilton*. Portanto, após os testes do barorreflexo, o volume de líquido total injetado no animal foi de no máximo 80µl. As doses das drogas utilizadas foram escolhidas por promoverem alterações na PAM de até 50mmHg. Entre a injeção de uma droga e a outra, foi respeitado um intervalo mínimo de 30 minutos para que a pressão arterial e a FC retornassem aos valores basais iniciais.

Para a obtenção dos dados, a atividade dos barorreceptores arteriais foi verificada por meio de três análises diferentes válidas na literatura da área:

1. Análise Ponto a Ponto

A análise do barorreflexo ponto a ponto consistiu na análise das variações absolutas (bpm) ou relativas (%) da FC em cinco pontos consecutivos de variação pressora ou depressora da pressão arterial média (5, 10, 15, 20 e 25mmHg, para a fenilefrina e -5, -10,-15,-20 e -25mmHg para o nitroprussiato de sódio).

A sensibilidade ou ganho do barorreflexo foi calculada por meio de uma média da relação variação de FC/variação de PAM para cada ponto (intervalo de 5mmHg), a qual foi expressa em bpm/mmHg e chamada de média dos ganhos.

A análise ponto a ponto permitiu verificarmos as variações cronotrópicas reflexas e a sensibilidade ou ganho do reflexo em cada um dos pontos, separadamente, para a fenilefrina (resposta bradicárdica) e para o nitroprussiato de sódio (resposta taquicárdica). Este método já foi utilizado recentemente em outro estudo como o de De Angelis et al. (2004).

2. Análise por Regressão Linear

Trata-se de uma representação muito comum do barorreflexo arterial em que, assim como a análise ponto a ponto, também se analisam as respostas cronotrópicas reflexas bradicárdicas e taquicárdicas separadamente. Neste método, já utilizado em outro estudo em nosso laboratório (Gava et al., 2004), a regressão linear é calculada por meio da equação da reta ($y=ax+b$), aplicada para as variações de FC em resposta a fenilefrina ou ao nitroprussiato de sódio em cada intervalo de 5mmHg de PAM. Esta fórmula permitiu obter o valor de r que representa o coeficiente de correlação.

Optamos por fazer a regressão linear por ser mais uma representação do barorreflexo que permite quantificar separadamente o papel preponderante do componente parassimpático e simpático frente às variações bruscas de PAM

3. Análise pelo Método das Barocurvas

Um método também muito utilizado para a análise do barorreflexo é **aquele** em que todos os componentes do barorreflexo são analisados juntos por meio de uma sigmóide ajustada por um programa de computador. Este tipo de representação do barorreflexo foi escolhido para analisarmos o conjunto de

respostas do reflexo, como platô de bradicardia, platô de taquicardia, faixa de atuação e sensibilidade do barorreflexo.

Cálculo para a Obtenção da Barocurva:

Para a análise da barocurva, foram considerados a sensibilidade (ou ganho) do reflexo, os platôs de taquicardia e bradicardia reflexas máximas e a faixa de atuação do reflexo. Valores de pico de PAM e FC, em resposta à fenilefrina e ao nitroprussiato de sódio, foram ajustados a uma equação logística sigmoidal através de programa pessoal e baseado no algoritmo de Marquardt (1963). O método de curvas segue a seguinte equação:

$$FC = P_1 / \{1 + \exp[P_2(PAM - P_3)]\} + P_4$$

Onde P_1 é a faixa de FC (diferença entre o platô de bradicardia e o platô de taquicardia); P_2 é o coeficiente de inclinação (que independe da faixa de FC); P_3 é a PAM no ponto médio da faixa de FC (PA_{50}); e P_4 é o platô de bradicardia. Os ganhos instantâneos (G) para a inteira curva do barorreflexo foi determinado pela primeira derivada da função logística, conforme equação a seguir:

$$G_{PAM} = P_1 P_2 \exp P_2(PAM - P_3) / [1 + \exp P_2(PAM - P_3)]^2$$

A sensibilidade do barorreflexo, derivada do ganho máximo ($-P_1 \times P_2/4$), foi calculada como o ganho no ponto em que a PAM coincide com o centro da porção reta da função logística da curva sigmóide.

Este procedimento de análise da função barorreflexa, através de sigmóides ajustadas por computador, tem sido extensivamente utilizado e validado em trabalhos prévios de nosso laboratório e de outros (Meyrelles et al., 1996 e 1998; Moysés et al., 1994; Vasquez et al., 1994; Vasquez et al., 1997; Michelini 2003)

Após o estudo do barorreflexo, alguns camundongos de todos os grupos experimentais foram sacrificados com uma superdosagem de pentobarbital sódico, para que pudéssemos fazer a quantificação dos parâmetros ponderais, como peso corporal, peso ventricular e renal e presença de hipertrofia ventricular, bem como a análise imunohistoquímica para receptores AT₁ da angiotensina no arco aórtico, ventrículos e rins.

Estudo 2: Parâmetros Ponderais

Este estudo foi idealizado para tentar responder ao seguinte questionamento:

Quais seriam os efeitos da hipertensão renovascular 2R1C (dependente de angiotensina II), no coração e rins de camundongos ateroscleróticos?

Para tanto, o coração e os rins dos camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-}, *sham* e 2R1C foram separados para a quantificação do peso seco. Os átrios foram descartados, permanecendo somente os ventrículos. Os índices em valores absolutos foram calculados por meio da relação peso ventricular/peso corporal (mg/g).

Para os rins, os índices absolutos foram calculados por meio da relação peso do órgão/peso corporal (mg/g).

Estudo 3: Histologia

Este estudo foi realizado visando responder ao seguinte questionamento:

Será que a hipertensão associada a aterosclerose poderia agravar a hipertrofia ventricular e renal?

Alguns dos animais sacrificados no item 3.5.2. foram separados para a documentação de hipertrofia ventricular e morfologia dos rins. Para isto, o tórax foi aberto e a aorta perfundida por meio do ventrículo esquerdo com 20ml de salina tampão fosfato (PBS 0,1M), pH 7,4 sob uma pressão de 100mmHg para os animais normotensos (C57BL/6 e ApoE^{-/-} sham) e de 125mmHg para os animais hipertensos (C57BL/6 e ApoE^{-/-} 2R1C), até ser totalmente exangüinada através de uma incisão no átrio direito e continuada com paraformaldeído tamponado a 4%. A pressão de perfusão foi controlada para ser semelhante à pressão arterial média dos animais, permitindo a integridade das artérias e evitando, assim, as possíveis rupturas e degradação das placas ateromatosas. Os rins e o coração (ventrículos) foram removidos e montados em gelatina a 25% (Dr. Oetker, Brasil) e imediatamente congelados à -16°C. Após 24 horas, as amostras foram seccionadas a 8µm (ventrículos) e 20µm (rins) de espessura em micrótomo criostato a -20°C (ANCAP, Campinas, SP). Posteriormente, os cortes foram coloridos com hematoxilina (Sigma-Aldrich) e analisados com o uso de um microscópio óptico (Olympus AX70) acoplado a uma câmera digital (Leica, Scam pro, Adobe Photoshop). As amostras foram fotografadas e analisadas por um programa de captura de imagem (Leica EWS 2100).

Estudo 4: Imunohistoquímica

Este estudo foi realizado para responder o questionamento abaixo:

- a) *Qual seria o papel da angiotensina II no arco aórtico, coração e rins de camundongos hipercolesterolêmicos/ateroscleróticos com hipertensão 2R1C?*
- b) *Existiria upregulation ou downregulation dos receptores AT₁ da angiotensina II nos sítios da inervação barorreceptora?*

Para obtermos respostas destes questionamentos, foi realizada a imunohistoquímica para os receptores AT₁ da angiotensina II para o arco aórtico, ventrículos e rins. Para tanto, utilizou-se um *kit* (Large Volume Dako LSAB[®] e Peroxidase, Dako corporation Carpinteria, CA, USA).

Seguindo o mesmo procedimento do item 3.5.4., os cortes obtidos do arco aórtico (8µm), ventrículos (10µm) e rins (15µm) após 24 horas foram lavados com salina tampão fosfato (PBS) 1X com pH 7,4 e tratados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em PBS durante 5 minutos, para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS 1X e incubados por 30 minutos a 25°C com um anticorpo policlonal primário de camundongo contra os receptores AT₁ da angiotensina II (anti-AT₁, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; 200µg/ml) diluído (1:200) em PBS 1X. Depois da lavagem em PBS 1X, os cortes foram tratados por 15 minutos com um anticorpo secundário biotilado anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra, para evitar ligações inespecíficas. Vencida esta etapa, os cortes foram lavados com PBS 1X e tratados com estreptavidina,

um conjugado de peroxidase por 15 minutos. Passando pela estreptavidina peroxidase, as amostras foram lavadas em PBS 1X e incubadas com uma solução cromogênica por 5 minutos para os cortes de rim e 10 minutos para os de arco aórtico e ventrículos. Todas as soluções utilizadas no protocolo de imunohistoquímica faziam parte do *kit*, exceto o anticorpo.

Concluído esse protocolo, foi realizada a contra-coloração com hematoxilina (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) para detalhamento celular.

Estudo 5: Dosagem de Colesterol Plasmático

Este estudo foi idealizado visando responder o seguinte questionamento:

A hipertensão renovascular 2R1C poderia alterar os níveis de colesterol plasmático de camundongos ApoE^{-/-} ?

Com este objetivo, foi coletado sangue de alguns animais de todos os grupos experimentais para a realização da dosagem de colesterol. Ao final dos experimentos, foi retirada uma amostra de sangue arterial (400µl) proveniente da artéria carótida. Imediatamente após a coleta, a amostra era centrifugada em 1.600 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos para a separação do plasma (40µl) que era coletado e congelado por até 90 dias. Quando reuníamos um número de amostras adequado, era realizada a dosagem do colesterol plasmático utilizando um *kit* colorimétrico (Bioclin, Belo Horizonte, MG) com leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 500nm.

Normalmente, para este tipo de procedimento, utiliza-se uma amostra de sangue venoso. Foram feitas várias tentativas na veia caudal, plexo venoso orbital e na veia jugular, todas sem êxito porque obtínhamos apenas algumas gotas de sangue e o volume de plasma que o nosso *kit* exigia era alto, em torno de 1ml. Por uma facilidade metodológica, esse volume só era obtido por meio da artéria carótida, que já estava cateterizada. Apesar disto, os valores de colesterol encontrados no sangue arterial foram semelhantes aos achados em trabalhos que coletavam sangue venoso, validando assim, a nossa metodologia.

3.6. Análise Estatística

Os resultados foram expressos com valores de média \pm erro padrão da mesma. As médias dos valores foram expressadas estatisticamente, utilizando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, completamente randomizada, se o objetivo era comparar os parâmetros ponderais, seguida do teste *post hoc* de Fisher, ou então, ANOVA de duas vias, para medidas repetidas, se o objetivo era comparar as variações de FC durante a avaliação do barorreflexo, seguida do mesmo teste *post hoc*. O teste *t* de Student foi utilizado quando a comparação desejada foi entre duas amostras pareadas (teste *t* pareado) como os resultados de colesterol plasmático. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Valores Basais de Pressão Arterial Média e de Frequência Cardíaca

em Camundongos com Hipertensão Experimental Renovascular 2R1C

A figura 4 mostra que a técnica para a produção da hipertensão renovascular 2R1C em camundongos causou, conforme o esperado, um aumento significativo da pressão arterial média basal, tanto nos animais C57BL/6 2R1C ($128 \pm 2,6$ mmHg) quanto nos hipercolesterolêmicos ApoE^{-/-} 2R1C ($126 \pm 2,6$ mmHg), quando comparados com os valores encontrados nos seus respectivos grupos controles *sham* ($103 \pm 2,1$ e $104 \pm 2,1$ mmHg). Não observamos diferenças significativas da PAM basal quando comparamos os grupos C57BL/6 e ApoE^{-/-}, demonstrando que a hipercolesterolemia não agrava a hipertensão renovascular 2R1C, pelo menos em camundongos ApoE^{-/-} com 12 semanas de idade.

Entretanto, quando verificamos os valores basais de frequência cardíaca, observamos que a hipertensão renovascular 2R1C causa taquicardia tanto no grupo C57BL/6 2R1C (633 ± 26 bpm) quanto no grupo ApoE^{-/-} 2R1C (576 ± 27 bpm) quando comparado com os respectivos animais *sham* (C57BL/6: 498 ± 19 bpm; ApoE^{-/-}: 500 ± 22 bpm), sem diferenças entre os grupos C57BL/6 e ApoE^{-/-}.

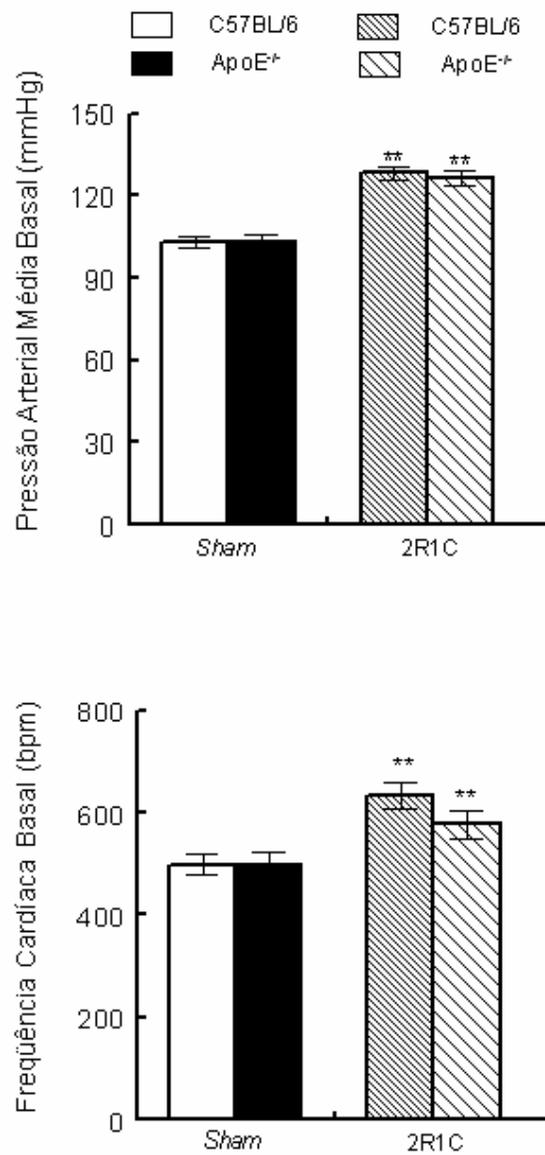


Figura 4: Valores basais de PAM (mmHg) e FC (bpm) de camundongos C57BL/6 (n=9) ApoE^{-/-} (n=10) normotensos (*sham*) e hipertensos (2R1C) após 28 dias de estenose da artéria renal. Os valores indicam média ± erro padrão da média. ** p<0,01, vs controles *sham*.

4.2. Parâmetros Ponderais de Camundongos com Hipertensão

Renovascular 2R1C

Na figura 5, verificamos os valores médios do peso corporal dos animais antes e depois da estenose da artéria renal. Conforme o esperado, nem a hipertensão renovascular 2R1C e a hipercolesterolemia alteraram o peso corporal dos animais C57BL/6 e ApoE^{-/-} (25,2±0,4 e 24,2±0,4g, respectivamente) após 28 dias de estenose quando comparado com os animais *sham* (26,2±0,4 e 25,5±0,7g, respectivamente). Os animais de todos os grupos ganharam, em média, 2g, o que foi considerado um ganho de peso normal do crescimento do animal nesta idade.

Na figura 6, observamos os dados de hipertrofia ventricular, calculada por meio da relação peso ventricular/peso corporal. Verificamos um aumento do peso ventricular e, conseqüentemente, da relação peso ventricular/peso corporal nos animais C57BL/6 2R1C (27,5±0,6mg e 1,10±0,04mg/g) e ApoE^{-/-} 2R1C (28,3±1,0mg e 1,17±0,03mg/g), quando comparado com os respectivos animais *sham* (C57BL/6: 26,0±0,6mg e 0,99±0,02mg/g; ApoE^{-/-}: 26,4±0,8 e 1,04±0,03mg/g). O grupo ApoE^{-/-} 2R1C apresenta valores de hipertrofia ventricular, evidenciada pela relação peso ventricular/peso corporal, maior do que o grupo C57BL/6 2R1C, sugerindo que a hipercolesterolemia aliada a hipertensão 2R1C nesses animais seriam as responsáveis por este resultado.

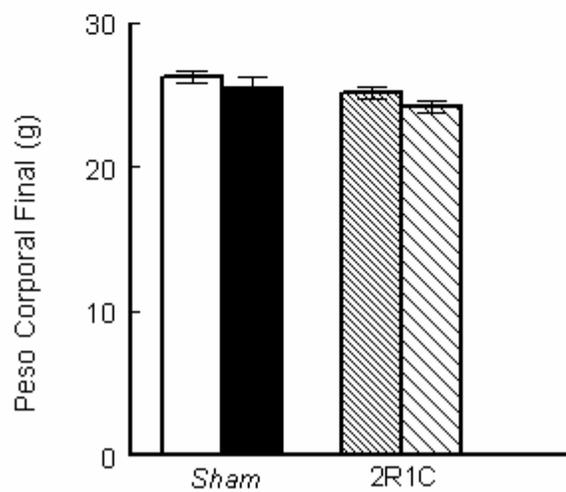
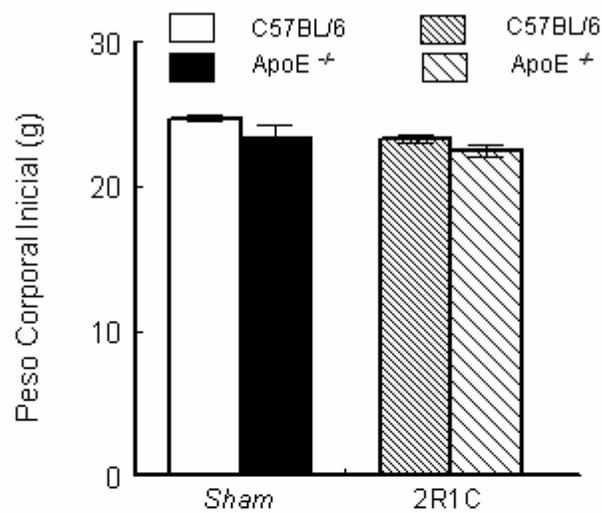


Figura 5: Valores de peso corporal inicial e final (g) de camundongos C57BL/6 (n=9) e ApoE^{-/-} (n=10) normotensos (*sham*) e hipertensos (2R1C) após 28 dias de estenose da artéria renal. Os valores indicam média \pm erro padrão da média.

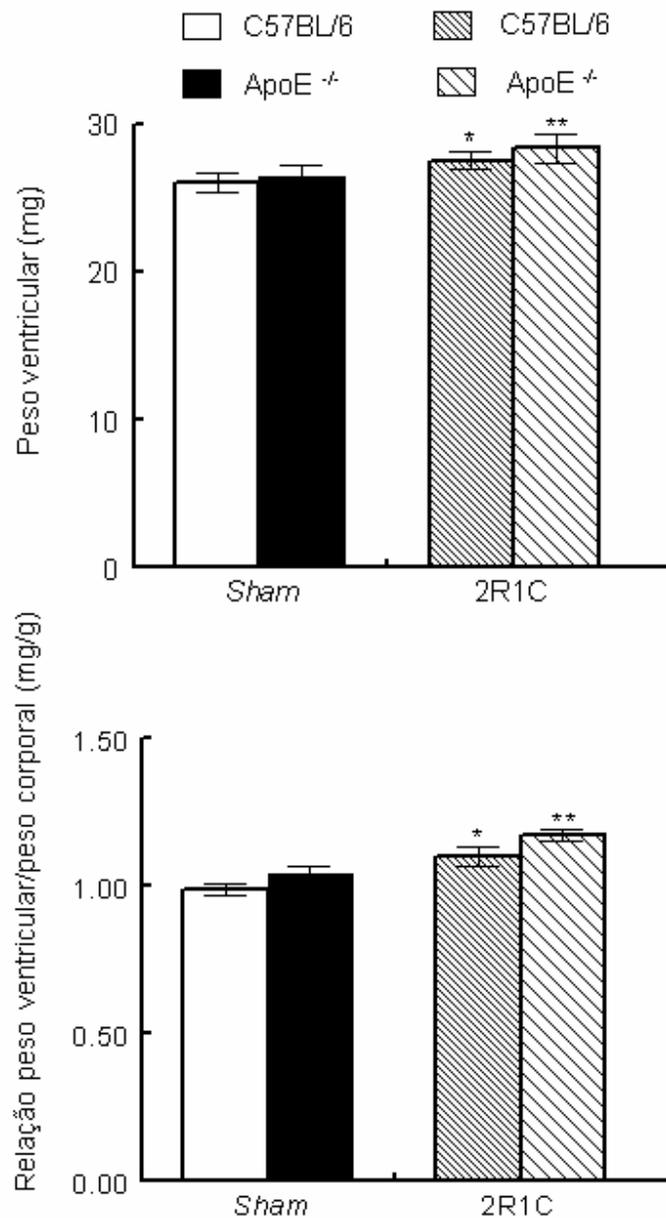


Figura 6: Peso ventricular (mg) e relação peso ventricular/peso corporal (mg/g) de camundongos C57BL/6 (n=9) e ApoE^{-/-} (n=10) normotensos (*sham*) e hipertensos (2R1C) após 28 dias de estenose da artéria renal. Os valores indicam média \pm erro padrão da média. * p<0,05 e ** p<0,01, vs controles *sham*.

Um resultado esperado, visto na figura 7, foi que, nos animais hipertensos, tanto os C57BL/6 quanto os ApoE^{-/-} mostraram uma atrofia do rim clipado e uma hipertrofia do rim contralateral, quando comparado com os animais *sham*. Isto reflete-se quando fazemos a relação peso do rim clipado/peso do rim contralateral (mg) e também na relação peso renal/peso corporal (mg/g) como pode ser visto nas figuras 8 e 9.

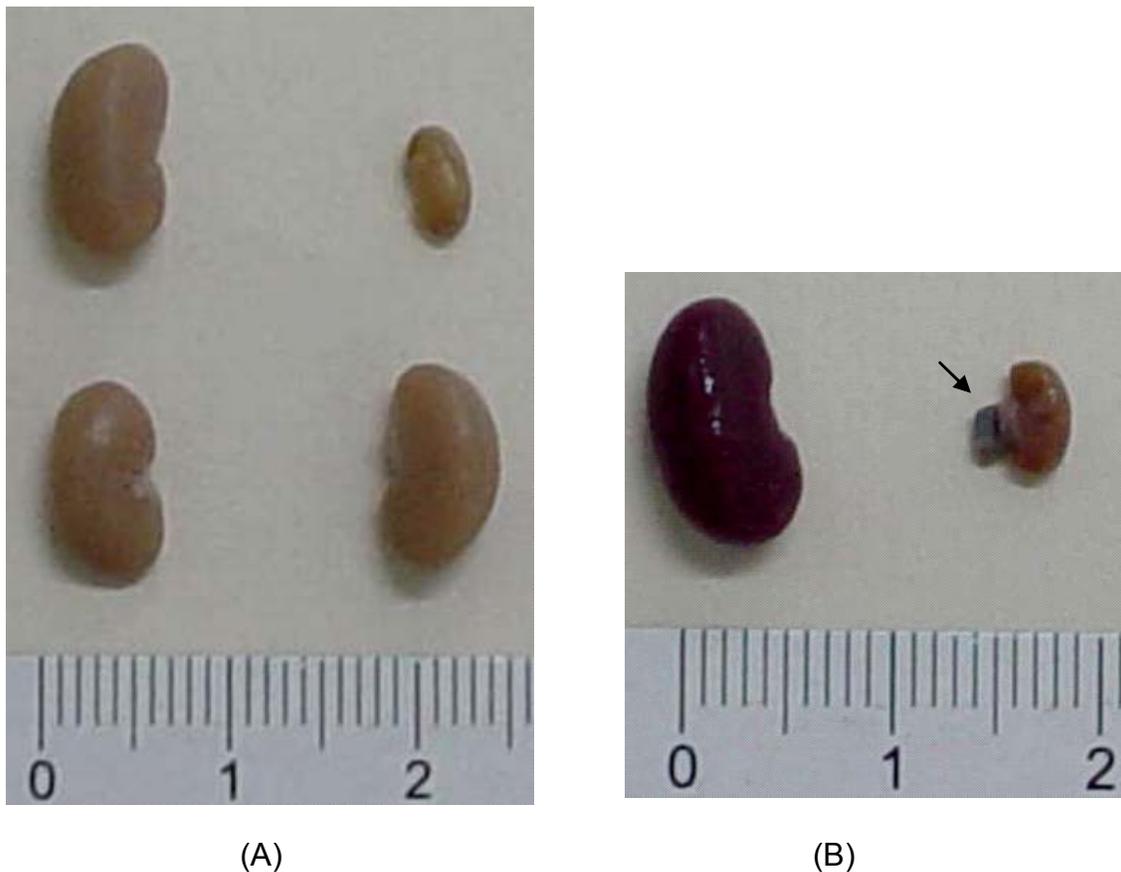


Figura 7: (A), fotografia do rim contralateral e clipado de um animal C57BL/6 *sham* e um animal C57BL/6 2R1C após 28 dias de estenose da artéria renal. (B), fotografia do rim contralateral e clipado de um animal ApoE^{-/-} 2R1C após 28 dias de estenose da artéria renal. A seta aponta para o clipe na artéria renal esquerda.

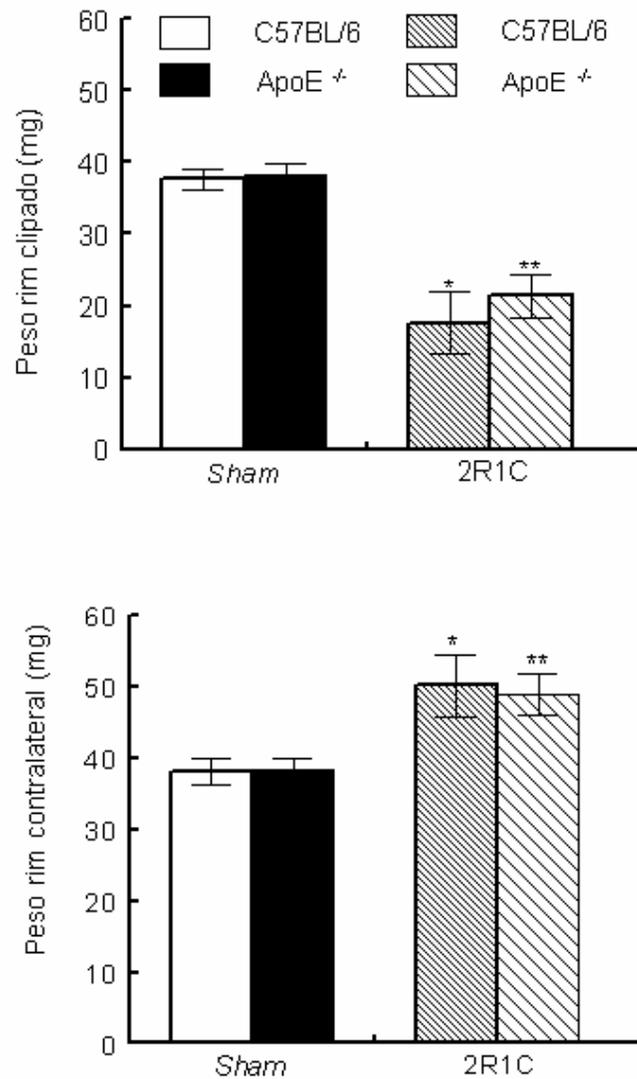


Figura 8: Peso do rim clipado (mg) e peso do rim contralateral (mg) de camundongos C57BL/6 (n=9) e ApoE^{-/-} (n=10) normotensos (*sham*) e hipertensos (2R1C) após 28 dias de estenose da artéria renal. Os valores indicam média \pm erro padrão da média. * p<0,05 e ** p<0,01, vs controles *sham*.

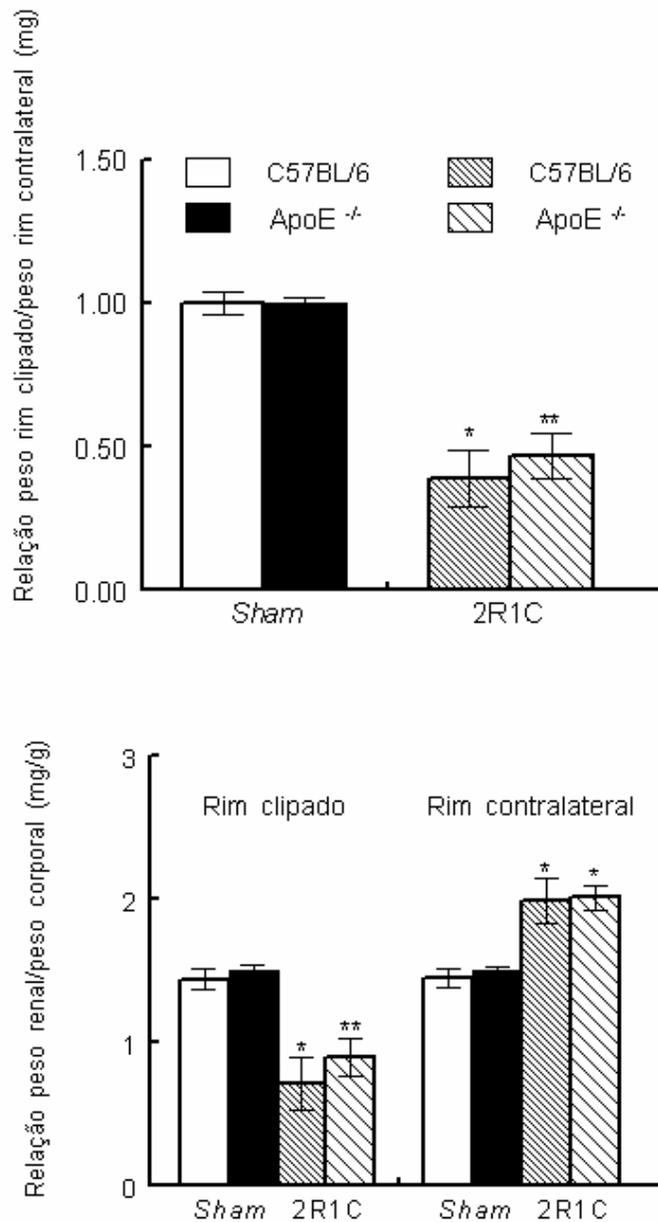


Figura 9: Relação peso do rim clipado/peso rim contralateral (mg) e relação peso renal/peso corporal (mg/g) de camundongos C57BL/6 (n=9) e ApoE^{-/-} (n=10) normotensos (*sham*) e hipertensos (2R1C) após 28 dias de estenose da artéria renal. Os valores indicam média \pm erro padrão da média. * p<0,05 e ** p<0,01, vs controles *sham*.

4.3. Avaliação do Barorreflexo

Na figura 10 A, estão ilustrados os registros típicos de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) dos animais C57BL/6 e ApoE^{-/-} *sham*, após a administração de fenilefrina. A figura 10 B mostra os registros típicos de PAP, PAM e FC dos animais C57BL/6 e ApoE^{-/-} 2R1C após a administração de fenilefrina. Como podemos observar não houve diferença entre os grupos C57BL/6 e ApoE^{-/-} nem na figura 10 A e nem na 10 B. Entretanto, quando comparamos a figura 10 A com a 10 B verificamos que tanto o animal C57BL/6 2R1C quanto o ApoE^{-/-} 2R1C respondem com uma bradicardia exagerada frente aos aumentos de pressão após a injeção de fenilefrina quando comparados com os respectivos animais controles *sham* (figura 10 A).

A figura 11 A mostra os registros típicos de PAP, PAM e FC dos animais C57BL/6 e ApoE^{-/-} *sham* após a administração de nitroprussiato de sódio. Conforme observamos não há diferença entre os grupos C57BL/6 e ApoE^{-/-}. Já a figura 11 B ilustra os registros típicos de PAP, PAM e FC dos animais C57BL/6 e ApoE^{-/-} 2R1C após a administração de nitroprussiato de sódio. Quando analisamos as respostas frente às diminuições da pressão arterial determinada após a injeção de nitroprussiato de sódio, o animal C57BL/6 2R1C e o ApoE^{-/-} 2R1C apresentam uma resposta atenuada quando comparada com os animais controles *sham* (figura 11 A), sem diferenças entre o animal C57BL/6 2R1C e ApoE^{-/-} 2R1C. Na mesma figura, observamos que o animal ApoE *sham* tem uma resposta taquicárdica maior do que o animal C57BL/6 *sham*.

Fenilefrina – Animais *sham*

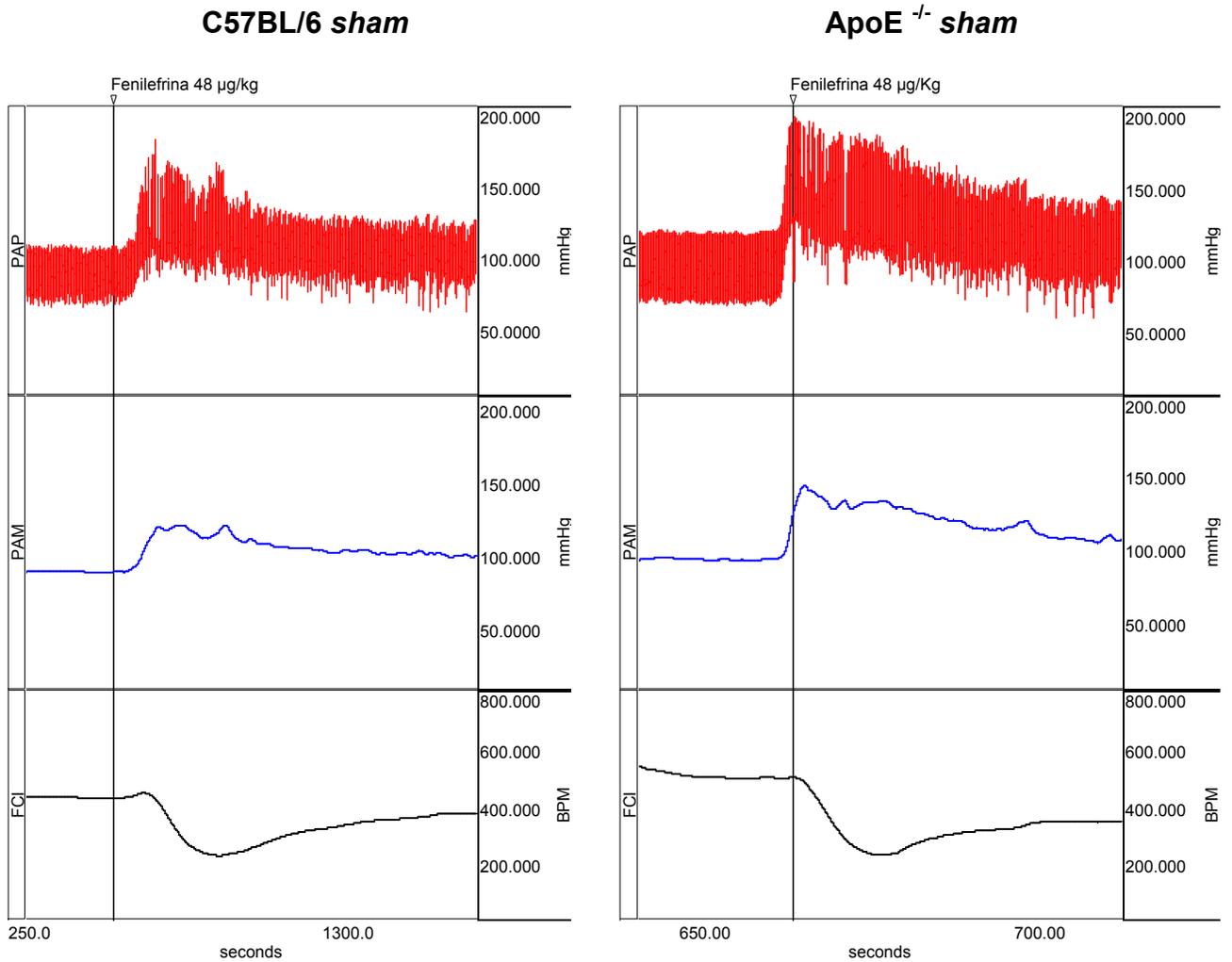


Figura 10 A: Registros típicos de pressão arterial pulsátil (PAP), média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) durante a avaliação do barorreflexo após a injeção de fenilefrina (48 µg/kg, i.v.) em camundongos C57BL/6 *sham* e ApoE^{-/-} *sham* após 28 dias de estenose da artéria renal.

Fenilefrina – Animais 2R1C

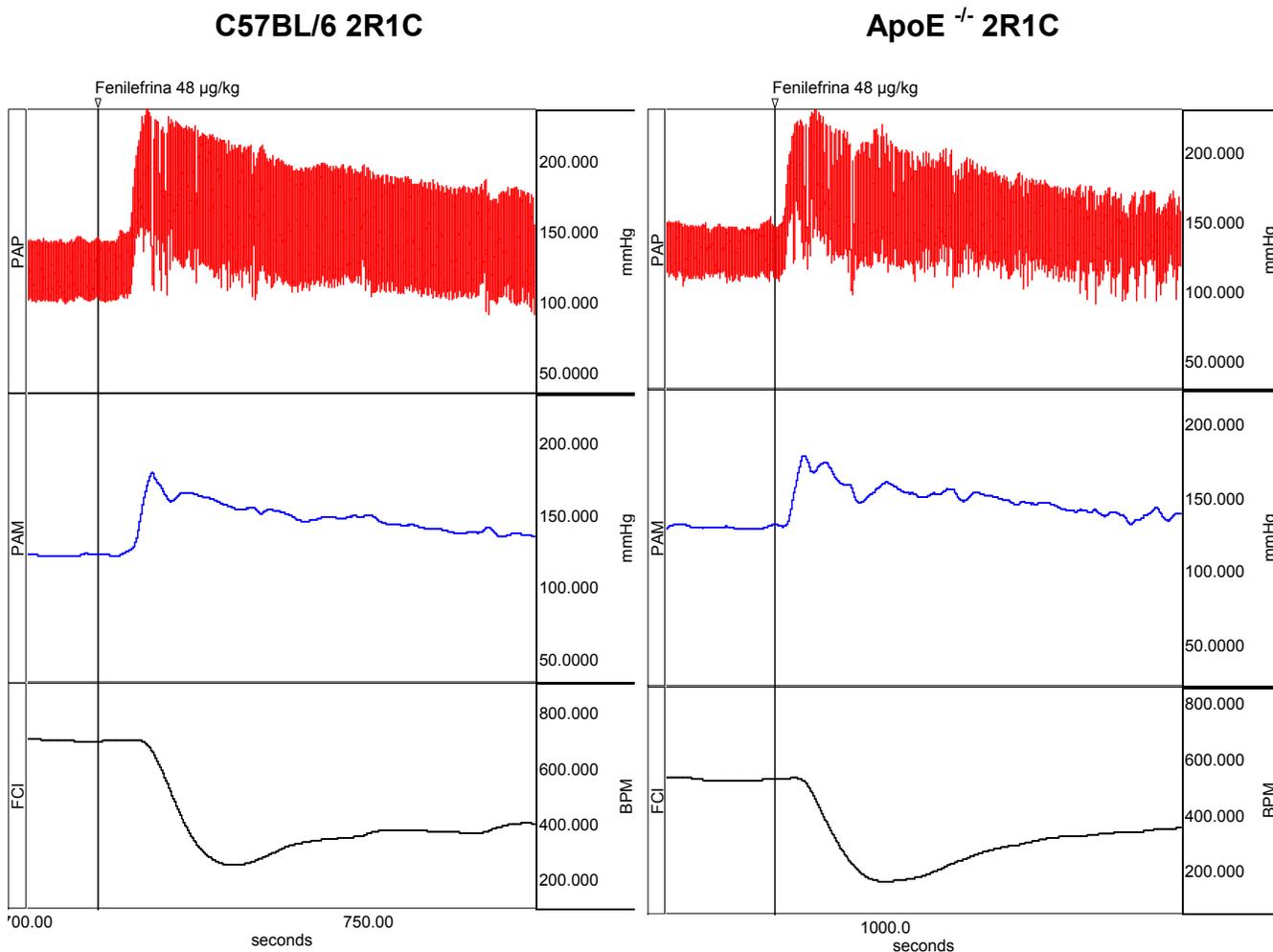


Figura 10 B: Registros típicos de pressão arterial pulsátil (PAP), média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) durante a avaliação do barorreflexo após a injeção de fenilefrina (48 µg/kg, i.v.) em camundongos C57BL/6 2R1C e ApoE^{-/-} 2R1C após 28 dias de estenose da artéria renal.

Nitroprussiato de Sódio – Animais *sham*

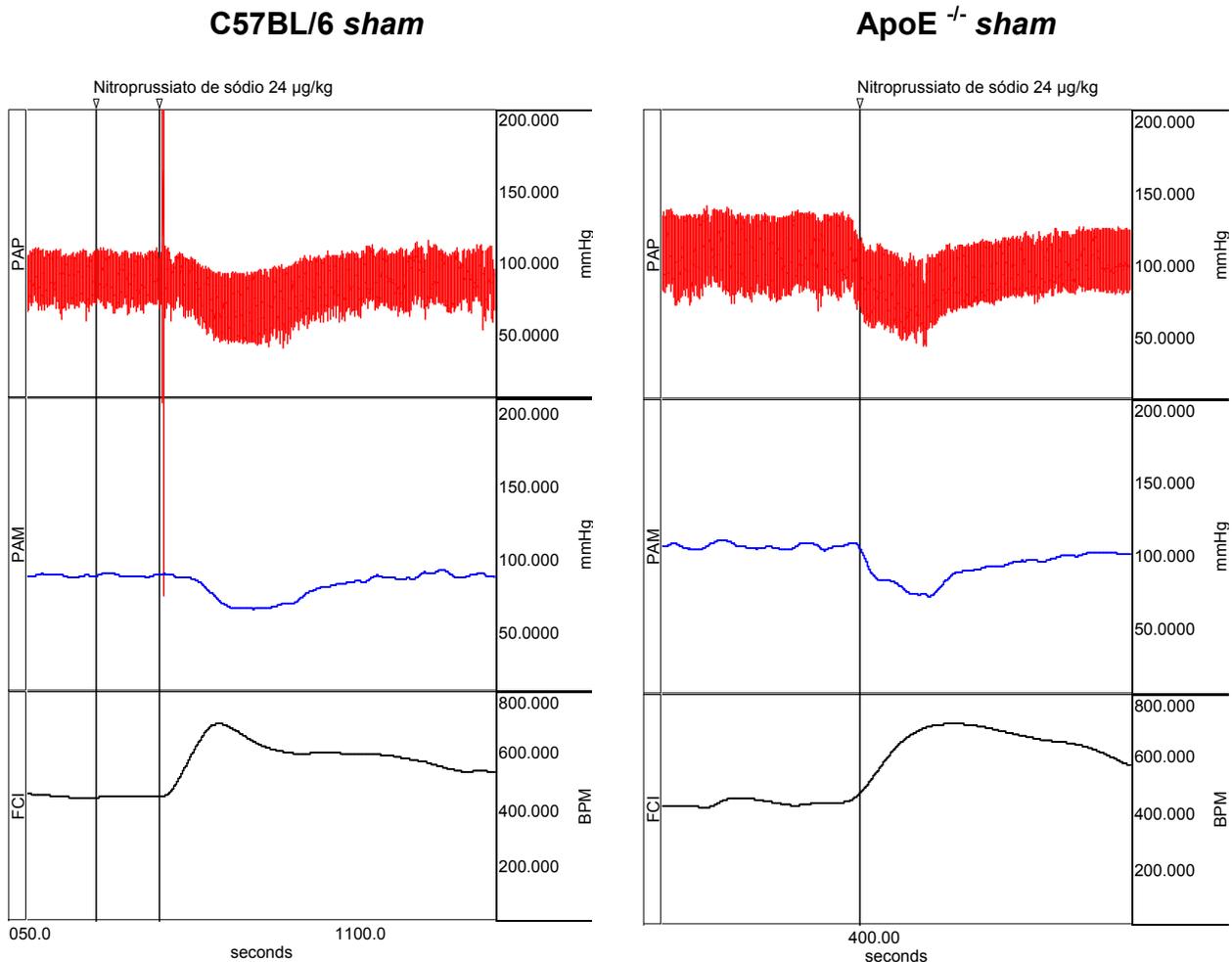


Figura 11 A: Registros típicos de pressão arterial pulsátil (PAP), média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) durante a avaliação do barorreflexo após a injeção de nitroprussiato de sódio (24 µg/kg, i.v.) em camundongos C57BL/6 *sham* e ApoE^{-/-} *sham* após 28 dias de estenose da artéria renal.

Nitroprussiato de Sódio – Animais 2R1C

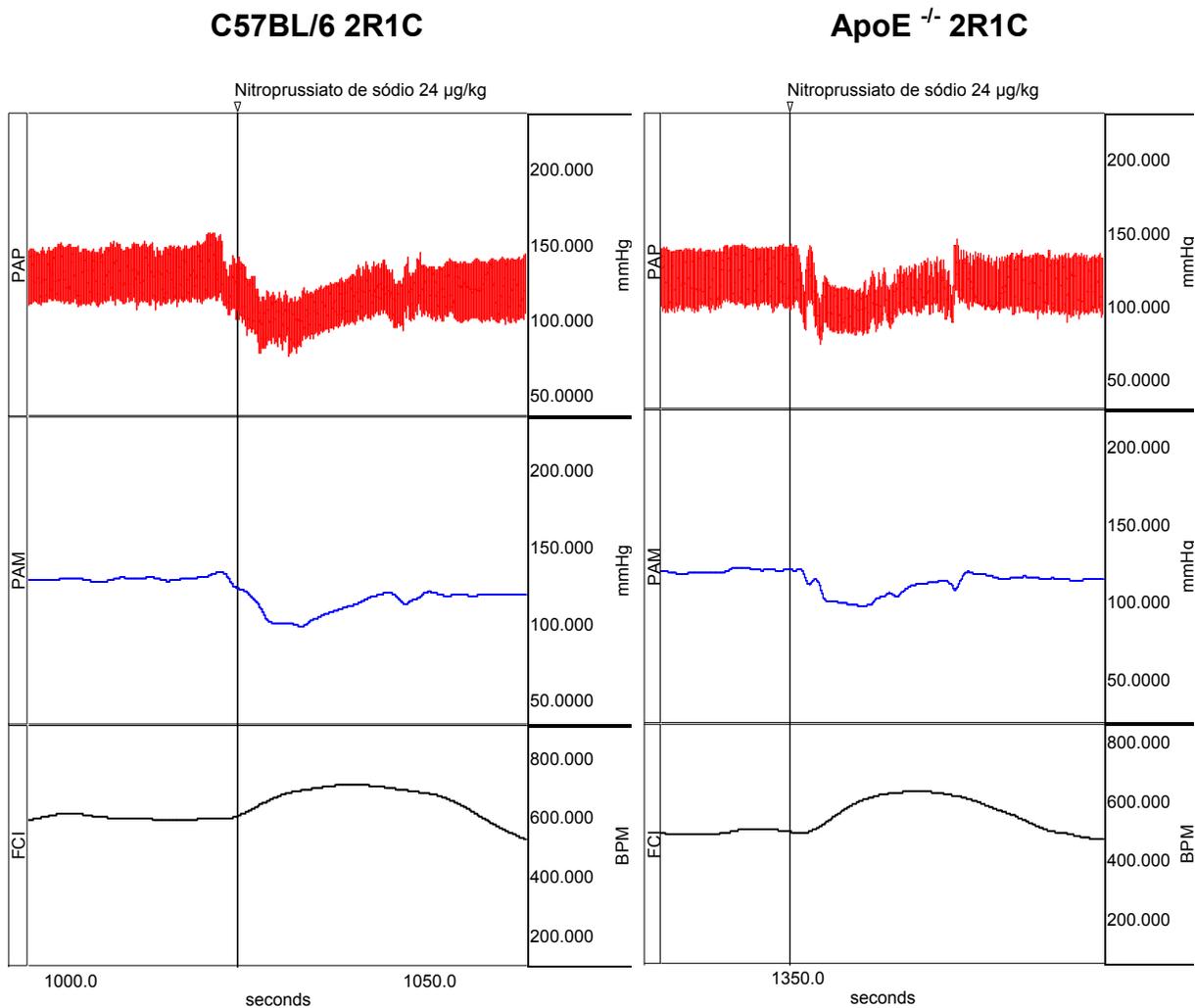


Figura 11 B: Registros típicos de pressão arterial pulsátil (PAP), média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) durante a avaliação do barorreflexo após a injeção de nitroprussiato de sódio (24 µg/kg, i.v.) em camundongos C57BL/6 2R1C e ApoE^{-/-} 2R1C após 28 dias de estenose da artéria renal.

4.3.1. Análise do Barorreflexo por Variações da Frequência Cardíaca

Ponto a Ponto

Estudo 1: Após a Injeção de Fenilefrina

A figura 12 ilustra o resultado do barorreflexo ponto a ponto em valores absolutos (bpm) e relativos (%) após a injeção de fenilefrina. Observamos que os animais hipertensos renovasculares C57BL/6 e ApoE^{-/-} responderam com uma bradicardia reflexa significativamente maior ($p < 0,05$; ANOVA) do que os respectivos controles *sham*. Sem diferenças entre os grupos C57BL/6 e ApoE^{-/-}.

Na figura 13, avaliamos a sensibilidade do barorreflexo para aumentos de pressão (fenilefrina) evidenciada pelo ganho médio. Verificamos que o ganho médio, ou seja, a sensibilidade do reflexo, está aumentada ($p < 0,05$; ANOVA ou teste t de Student) nos animais renovasculares C57BL/6 e ApoE^{-/-} após a administração de fenilefrina quando comparados com os animais controles *sham*.

Ponto a Ponto - Fenilefrina

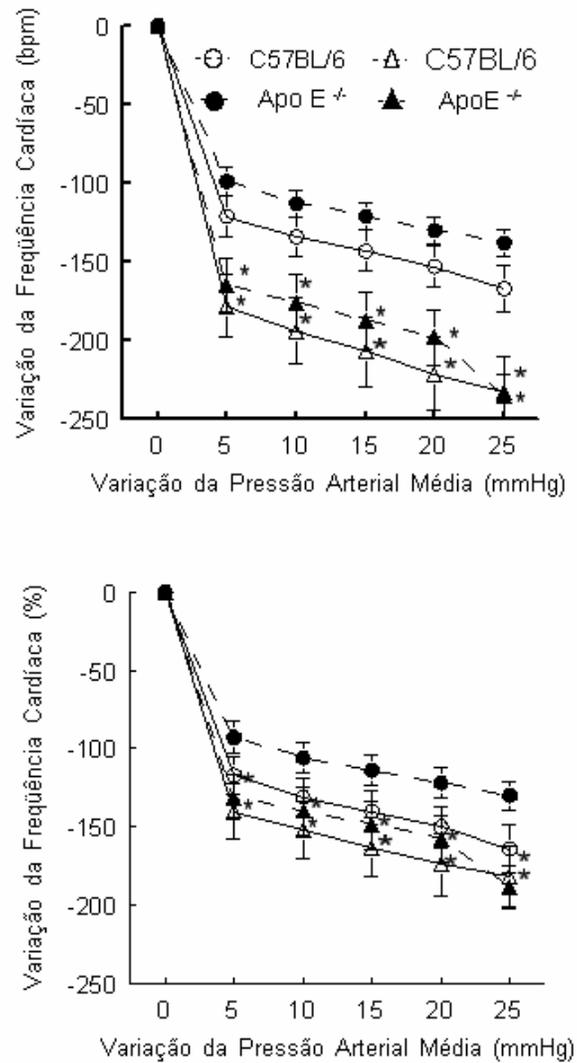


Figura 12: Variação de frequência cardíaca em valores absolutos (bpm) e relativos (%) durante a avaliação do barorreflexo obtido após injeção de fenilefrina (48µg/kg, i.v.), em camundongos C57BL/6 *sham* (n=7), ApoE^{-/-} *sham* (n=8), C57BL/6 2R1C (n=7) e ApoE^{-/-} 2R1C (n=8). Os valores indicam média ± erro padrão da média. * p<0,05, vs controles *sham*.

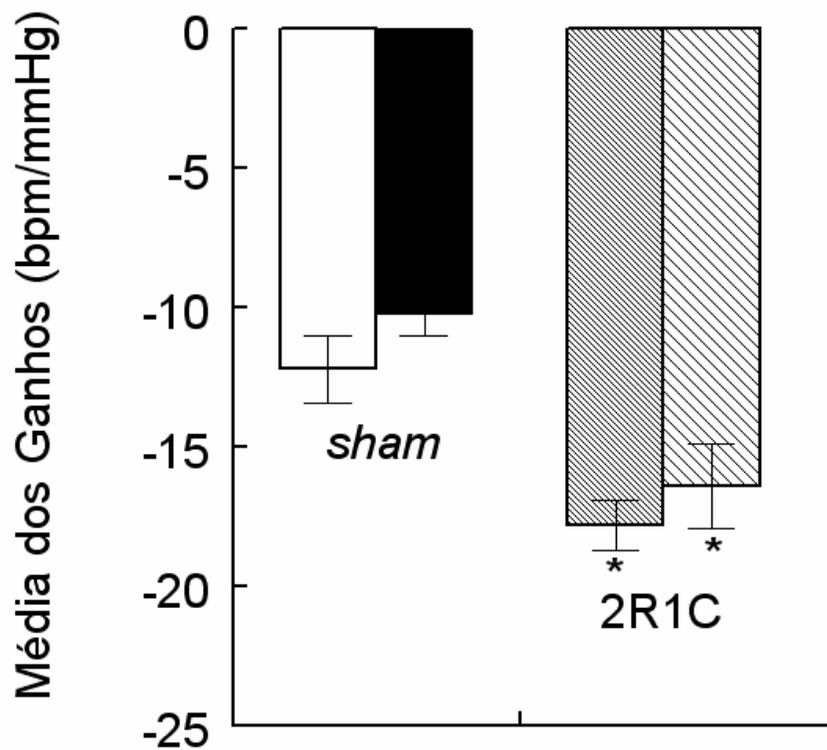


Figura 13: Avaliação da sensibilidade (ganho médio) do barorreflexo obtido após injeção de fenilefrina (48µg/kg, i.v.), em camundongos C57BL/6 *sham* (n=7), ApoE^{-/-} *sham* (n=8), C57BL/6 2R1C (n=7) e ApoE^{-/-} 2R1C (n=8). Os valores indicam média ± erro padrão da média. * p<0,05, vs controles *sham*.

Estudo 2: Após a Injeção de Nitroprussiato de Sódio

A figura 14 ilustra o resultado do barorreflexo ponto a ponto em valores absolutos (bpm) e relativos (%) após a injeção de nitroprussiato de sódio. Observamos que os animais hipertensos renovasculares C57BL/6 e ApoE^{-/-}, responderam com uma taquicardia significativamente menor ($p < 0,05$; ANOVA) do que os respectivos controles *sham*. Sem diferenças entre animais C57BL/6 e ApoE^{-/-} 2R1C. Entretanto, observamos que os animais ApoE^{-/-} *sham* respondem com uma taquicardia exagerada quando comparados com os animais C57BL/6 *sham*.

Na figura 15, avaliamos a sensibilidade do barorreflexo para diminuições de pressão (nitroprussiato de sódio) evidenciada pelo ganho médio. Verificamos que o ganho médio, ou seja, a sensibilidade do reflexo, está diminuída ($p < 0,05$; ANOVA ou teste t de Student) nos animais renovasculares C57BL/6 e ApoE^{-/-} após a administração de nitroprussiato de sódio quando comparados com os animais controles *sham*. E que o exagero da resposta taquicárdica dos animais ApoE^{-/-} *sham*, visto na figura 13, conseqüentemente reflete-se na sensibilidade do reflexo, evidenciada pelo ganho médio aumentado ($18,0 \pm 1,4$ bpm/mmHg) destes animais quando comparamos com os animais C57BL/6 *sham* ($8,7 \pm 0,8$ bpm/mmHg).

Ponto a Ponto - Nitroprussiato de Sódio

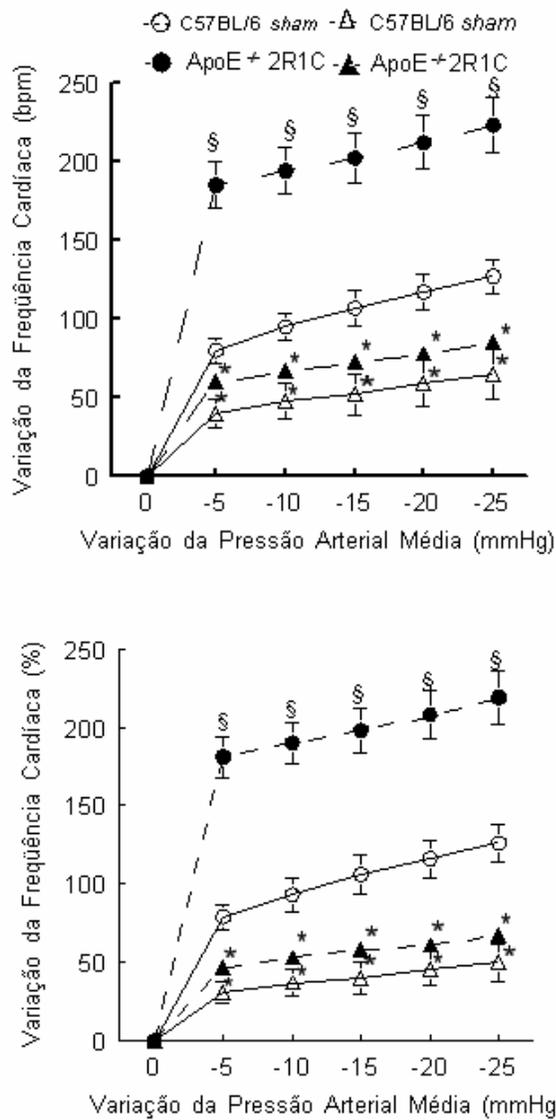


Figura 14: Variação de frequência cardíaca em valores absolutos (bpm) e relativos (%) durante a avaliação do barorreflexo obtido após injeção de nitroprussiato de sódio (24µg/kg, i.v.), em camundongos C57BL/6 *sham* (n=7), ApoE^{-/-} *sham* (n=8), C57BL/6 2R1C (n=7) e ApoE^{-/-} 2R1C (n=8). Os valores

indicam média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$, vs controles *sham* e §, vs controles C57BL/6 *sham*.

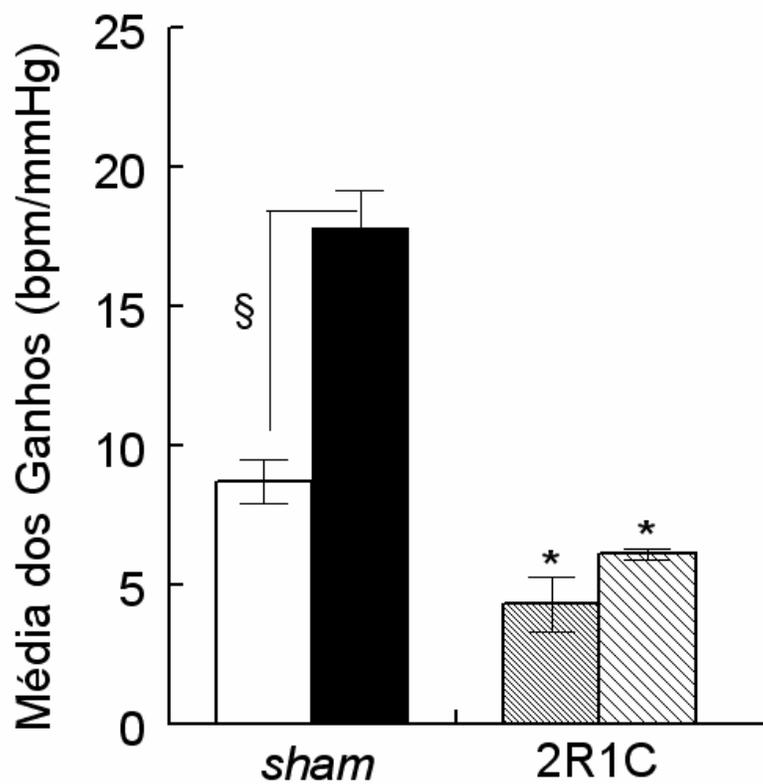


Figura 15: Avaliação da sensibilidade (ganho médio) do barorreflexo obtido após injeção de nitroprussiato de sódio (24 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.), em camundongos C57BL/6 *sham* (n=7), ApoE^{-/-} *sham* (n=8), C57BL/6 2R1C (n=7) e ApoE^{-/-} 2R1C (n=8). Os

valores indicam média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs controles *sham* e § $p < 0,01$, vs C57BL/6 *sham*.

4.3.2. Análise do Barorreflexo por Regressão Linear

Estudo 1: Após a Injeção de Fenilefrina

Quando analisamos os resultados da figura 16, que expressa os dados de todos animais individualmente, bem como da média dos grupos C57BL/6 e ApoE^{-/-} *sham* e 2R1C após a injeção de fenilefrina, verificamos que os animais renovasculares respondem mais do que os animais controles *sham*, sem diferenças entre os grupos C57BL/6 e ApoE^{-/-}.

Regressão Linear - Fenilefrina

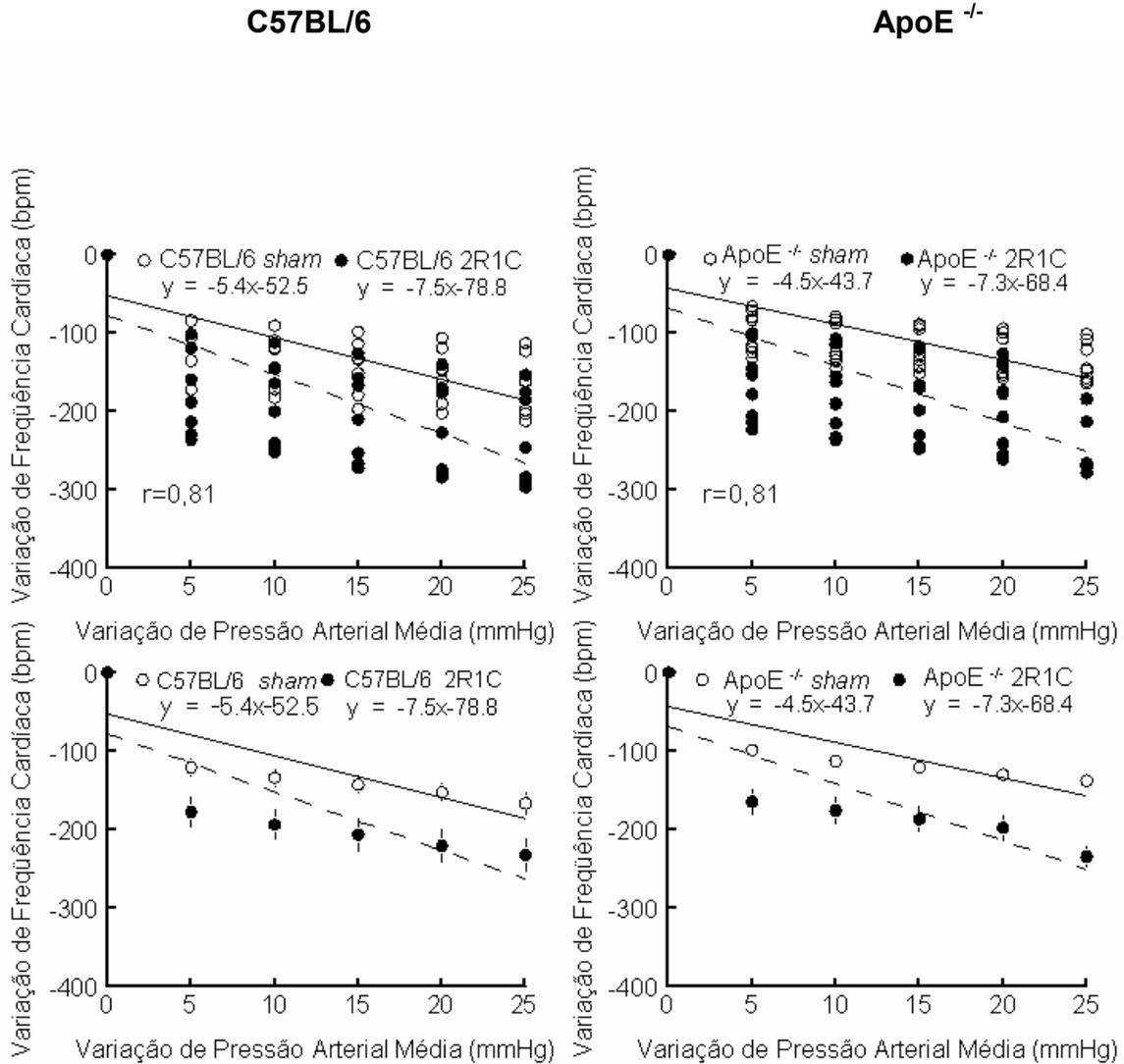


Figura 16: Regressão linear individual dos animais (superior) e da média dos grupos (inferior) durante a avaliação do barorreflexo obtido após injeção de fenilefrina (48µg/kg, i.v.), em camundongos C57BL/6 *sham* (n=7), ApoE^{-/-} *sham* (n=8), C57BL/6 2R1C (n=7) e ApoE^{-/-} 2R1C (n=8). Os valores no gráfico inferior indicam média \pm erro padrão da média.

Estudo 2: Após a Injeção de Nitroprussiato de Sódio

Quando analisamos os resultados da figura 17, que expressa os dados de todos animais individualmente, bem como, da média dos grupos C57BL/6 e ApoE^{-/-},*sham* e 2R1C após a injeção de nitroprussiato de sódio, verificamos que os animais hipertensos renovasculares respondem menos ($p < 0,05$; ANOVA) do que os animais controles *sham*, com diferenças entre os grupos C57BL/6 *sham* e ApoE^{-/-} *sham*, em que este último apresenta uma resposta taquicárdica exagerada.

Regressão Linear - Nitroprussiato de Sódio

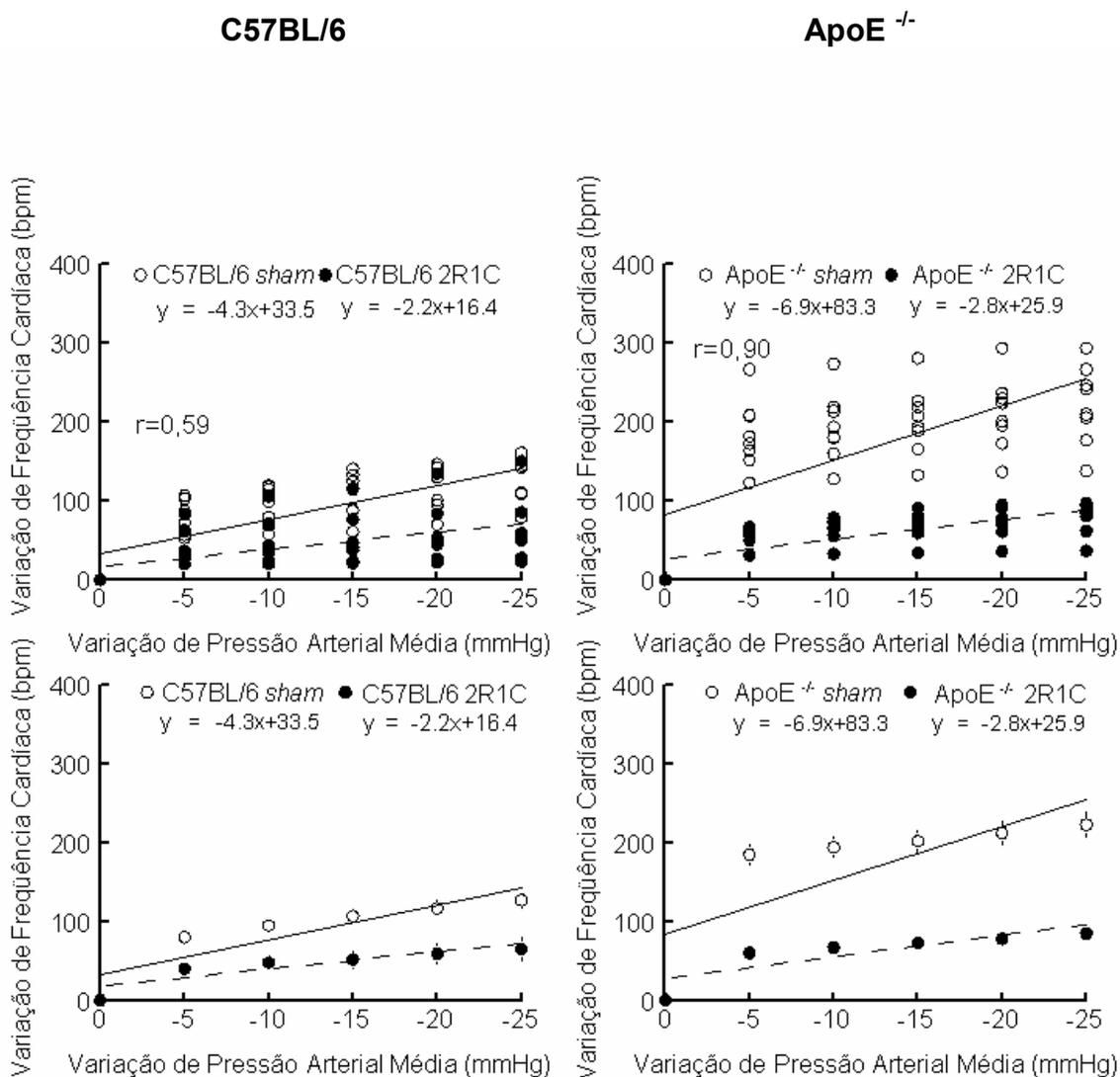


Figura 17: Regressão linear individual dos animais (superior) e da média dos grupos (inferior), durante a avaliação do barorreflexo obtido após injeção de nitroprussiato de sódio (24 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.), em camundongos C57BL/6 *sham* (n=7), ApoE^{-/-} *sham* (n=8), C57BL/6 2R1C (n=7) e ApoE^{-/-} 2R1C (n=8). Os valores no gráfico inferior indicam média \pm erro padrão da média.

4.3.3. Análise do Barorreflexo por Barocurvas Ajustadas

A figura 18 ilustra a representação do barorreflexo por meio de uma análise sigmóide, chamada de barocurva ajustada. Como podemos verificar, observamos todos os integrantes do barorreflexo como os platôs de bradicardia e taquicardia, a faixa de atuação do reflexo e a sensibilidade (ganho) dado pela inclinação da porção reta do gráfico. Os dados mostram um deslocamento da curva dos animais renovasculares C57BL/6 e ApoE^{-/-} para a direita, evidenciando a presença de hipertensão, entretanto, sem alteração na sensibilidade (ganho) do reflexo quando comparamos animais renovasculares e *sham*. Não há diferença significativa entre os platôs de bradicardia e taquicardia, faixa de variação e ganho do barorreflexo, nos animais renovasculares quando comparados com os controles e nem mesmo entre os grupos C57BL/6 e ApoE^{-/-} (tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros da Barocurva

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	C57BL/6 <i>sham</i>	C57BL/6 2R1C	ApoE <i>sham</i>	ApoE 2R1C
	n=7	n=7	n=8	n=8
Platô de bradicardia (bpm)	339,67±26,85	371,86±30,67	329±12,66	348,5±46,06
Platô de taquicardia (bpm)	595,17±22,69	629,14±33,57	642,67±36,63	675,33±27,72
Faixa de variação (bpm)	255,33±20,35	257,0±31,68	313,33±30,78	326,0±37,69
PAM ₅₀ (mmHg)	102,0±3,52	126,86±2,43*	102,5±4,86	129,83±3,52*
Ganho (bpm/mmHg)	- 5,98±0,46	- 6,5±0,52	- 7,13±0,67	- 6,43±0,58

Valores de média±erro padrão da média. *p<0,05 vs C57BL/6 e ApoE^{-/-} *sham*.

Barocurva - Fenilefrina e Nitroprussiato de Sódio

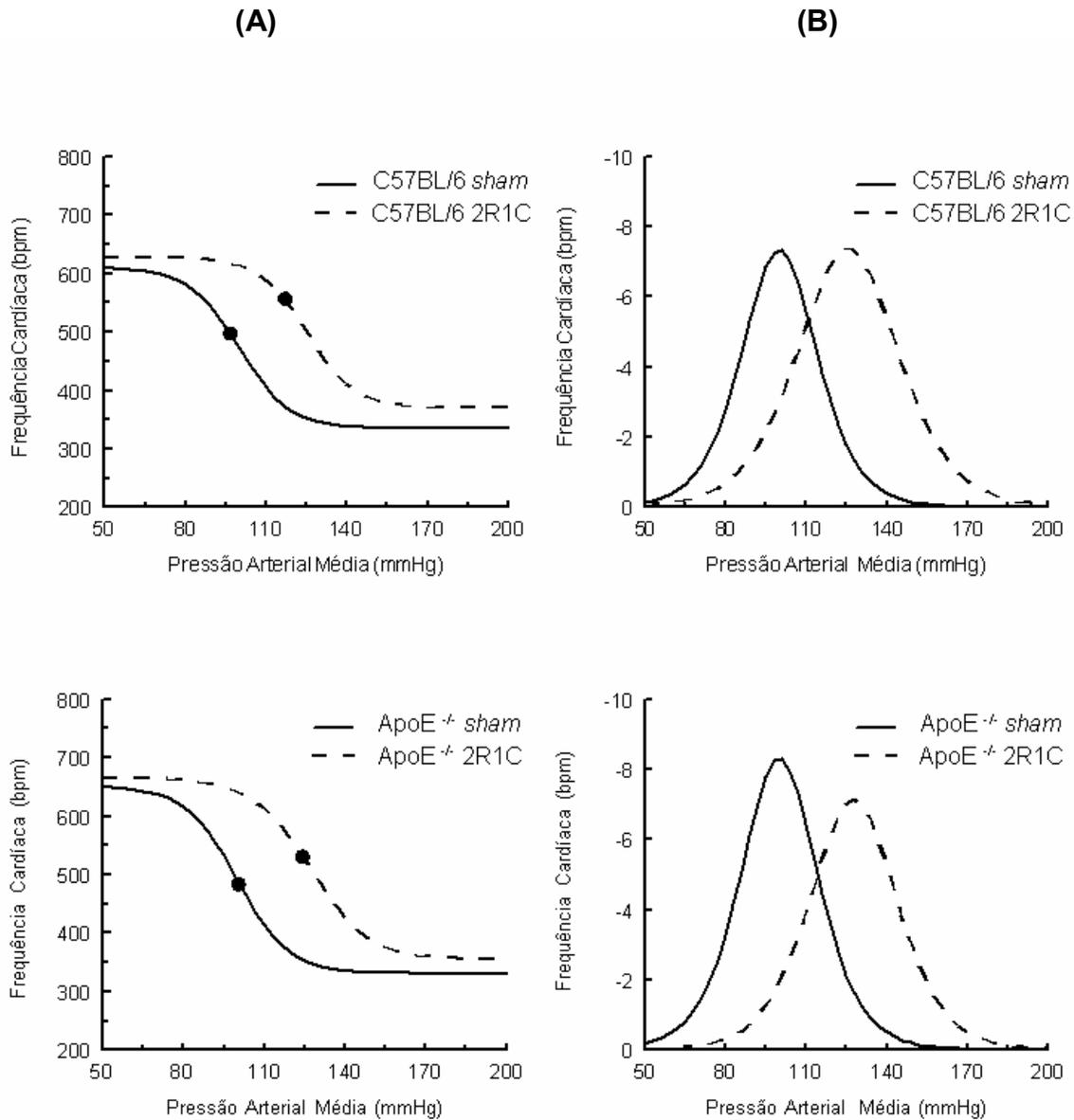


Figura 18: (A) análise sigmoidal do barorreflexo por barocurva e (B) avaliação da sensibilidade (ganho) do barorreflexo, obtido após injeção de fenilefrina (48 μ g/kg, i.v.) e nitroprussiato de sódio (24 μ g/kg,i.v.) em camundongos C57BL/6 *sham* (n=7), ApoE^{-/-} *sham* (n=8), C57BL/6 2R1C (n=7) e ApoE^{-/-} 2R1C (n=8). Os valores indicam média \pm erro padrão da média.

4.4. Dosagem de Colesterol Plasmático

Com o intuito de garantir a fidelidade dos nossos resultados, realizamos os testes de dosagem de colesterol plasmático em alguns animais dos diferentes grupos experimentais, para certificarmos de que os animais ApoE^{-/-} eram hipercolesterolêmicos e para saber se havia alguma alteração quando esses eram submetidos ao modelo experimental de hipertensão renovascular 2R1C.

Conforme previsto, na figura 19 verificamos que os valores encontrados de colesterol plasmático dos animais ApoE^{-/-} *sham* e 2R1C foram significativamente maiores (613±94 e 448±36mg/dL, respectivamente) do que os dos animais C57BL6 *sham* e 2R1C (139±13 e 108±13mg/dL, respectivamente). Curiosamente, os animais ApoE^{-/-} *sham* apresentaram valores de colesterol plasmático significativamente mais elevados do que os animais ApoE^{-/-} 2R1C.

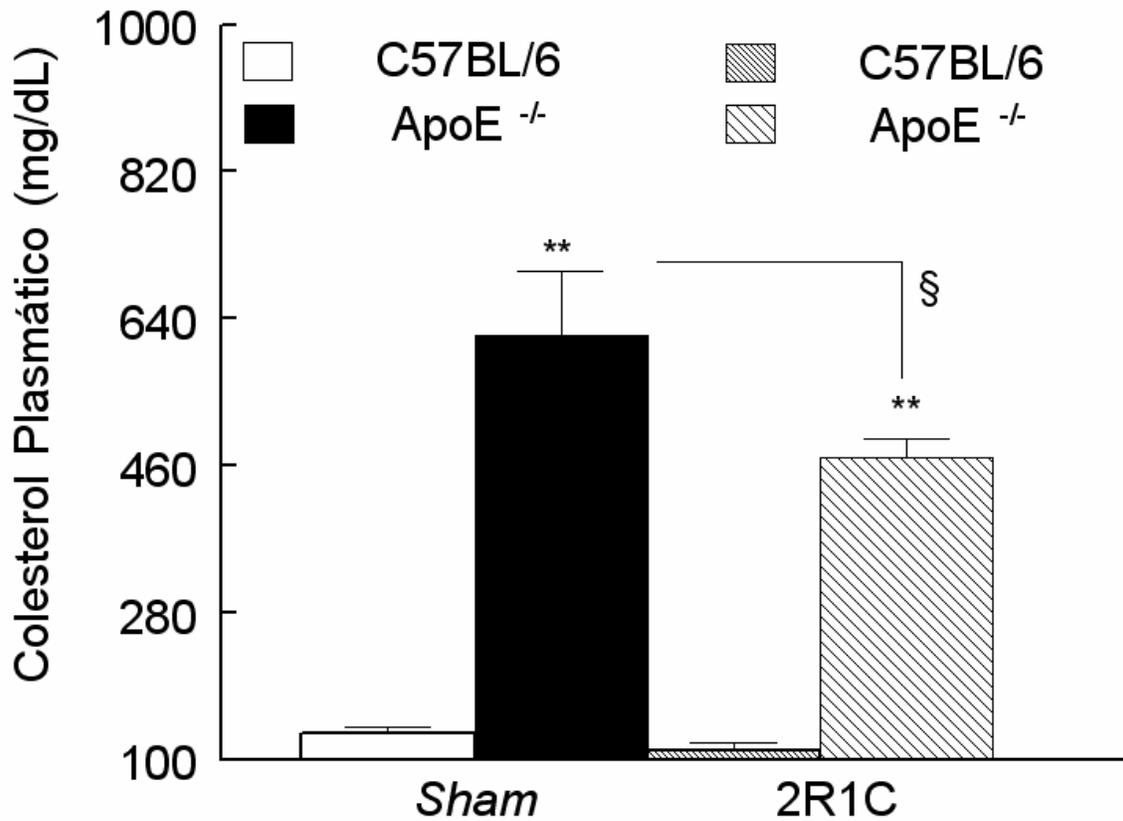


Figura 19: Gráfico mostrando os valores de colesterol plasmático (mg/dL) dos animais C57BL/6 sham n=5, ApoE^{-/-} sham n=5, C57BL/6 2R1C n=6, ApoE^{-/-} 2R1C n=6, após 28 dias de estenose da artéria renal. Valores de média \pm erro padrão da média. ** p<0,01 vs C57BL/6 sham e C57BL/6 2R1C. § p<0,05 vs ApoE^{-/-} sham.

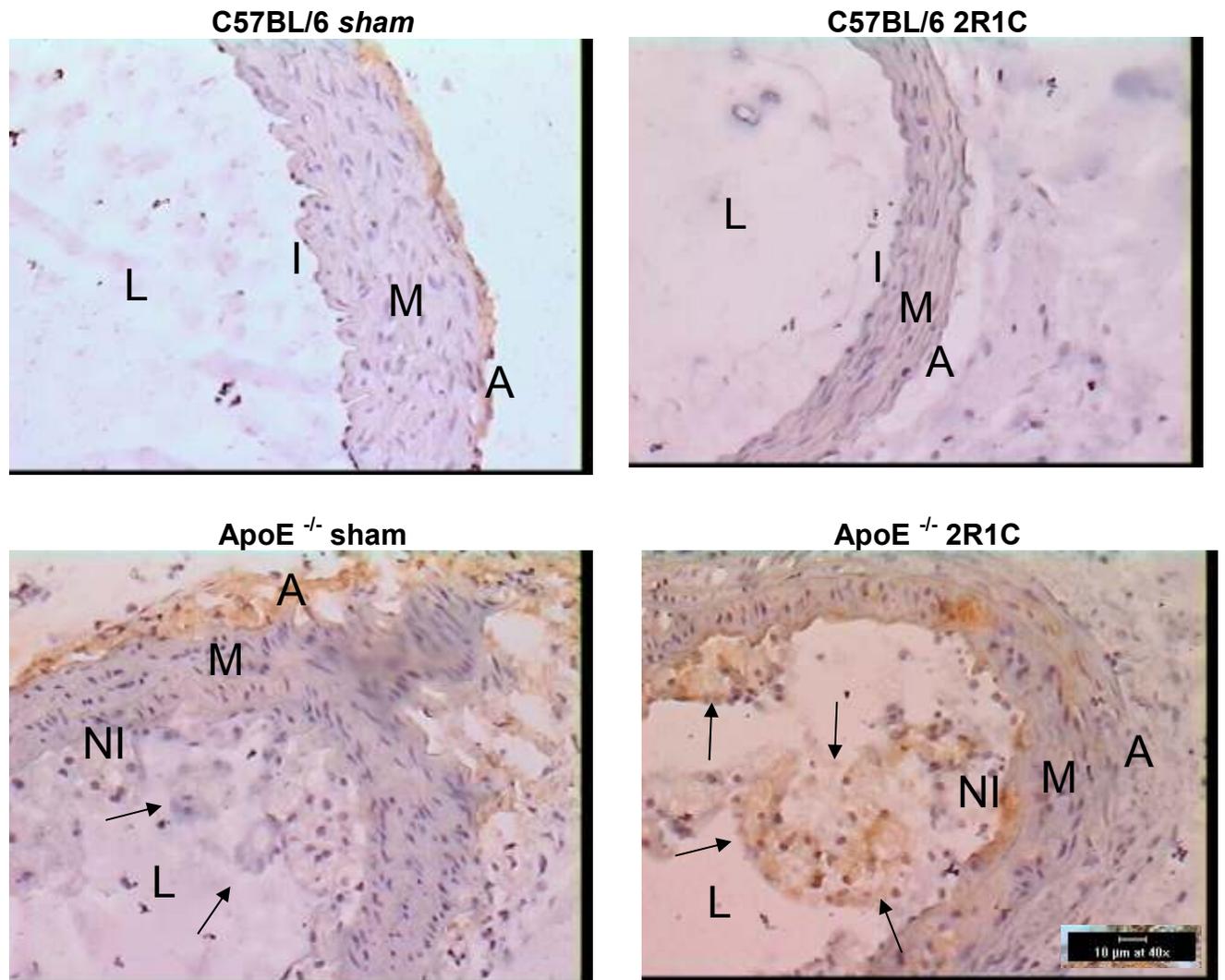
4.5. Imunohistoquímica

4.5.1. Arco Aórtico

A imunohistoquímica para a expressão dos receptores AT₁ da angiotensina II nos sítios das terminações barorreceptoras, localizadas na camada adventícia do arco aórtico, pode ser vista na figura 20. Podemos observar, por meio da coloração marrom (cromogênio), que, no animal C57BL/6 *sham*, a expressão dos receptores AT₁ está presente na camada adventícia do vaso, onde localizam-se os fibroblastos. Entretanto, quando verificamos o animal C57BL/6 2R1C, não há a presença da coloração marrom, que indica a expressão dos receptores AT₁. Portanto, a imunohistoquímica revelou que, no modelo experimental de hipertensão renovascular 2R1C (renina-angiotensina dependente) em camundongos, há um *dowregulation* dos receptores AT₁.

Na mesma figura também está representado a imunohistoquímica do arco aórtico de um animal ApoE^{-/-} *sham*. Há presença de lesões ateromatosas (indicada pelas setas) na camada íntima do vaso formando o que conhecemos como camada neoíntima. Além disso, observamos que a camada adventícia no vaso desses animais, além de estar mais espessa do que a dos animais C57BL/6 *sham* (sem lesões ateromatosas), também apresenta uma marcação maior para os receptores AT₁, evidenciada pela coloração marrom, demonstrando que há um *upregulation* desses receptores no camundongo ApoE^{-/-} (com lesões ateromatosas). Entretanto, quando analisamos a imagem do corte do arco aórtico de um animal ApoE^{-/-} 2R1C na mesma figura, observamos que a marcação para os receptores AT₁ está mais acentuada nos locais de presença das placas (indicado pelas setas), na camada neoíntima e também na muscular, sem evidências de expressão na camada adventícia. Embora a camada adventícia

não tenha apresentado expressão para os receptores AT₁, há um nítido espessamento dessa camada envolvendo modificações na estrutura da matriz extracelular.



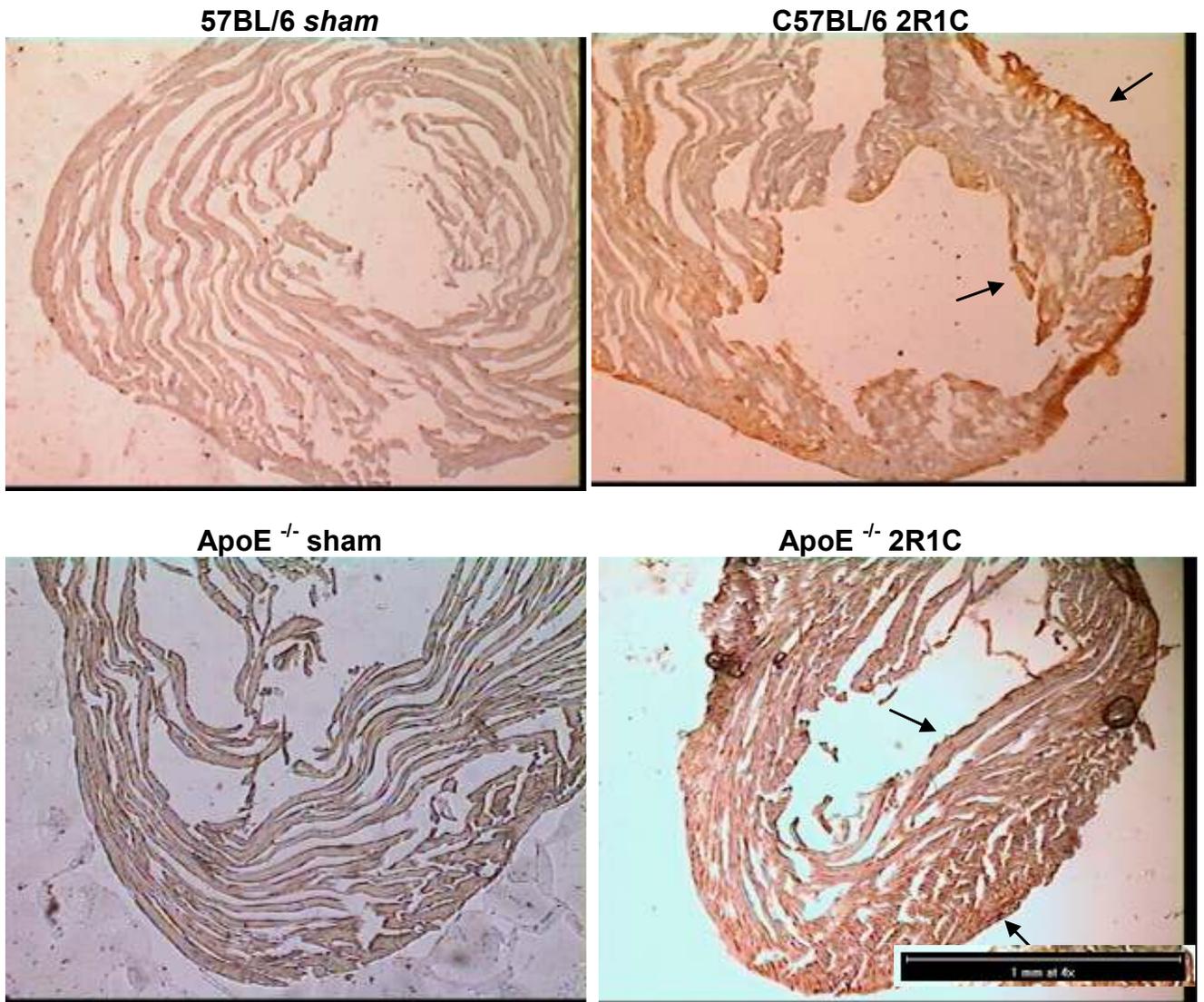
400X

Figura 20: Imunohistoquímica do arco aórtico de uma animal C57BL/6 e ApoE^{-/-} 2R1C, após 28 dias de estenose da artéria renal esquerda, comparados com os respectivos animais *sham*. As setas apontam os locais de placas ateromatosas e a coloração marrom indica a expressão de receptores AT₁. L: lúmen; I: íntima; M:

média; A: adventícia e NI: neo-íntima. Os cortes foram contracoloridos com hematoxilina. Esses dados foram reprodutivos em 2 animais de cada grupo.

4.5.2. Ventrículos

A figura 21 ilustra os resultados da imunohistoquímica ventricular para a expressão dos receptores AT₁ da angiotensina II. Podemos observar que houve uma maior expressão dos receptores AT₁ nos animais renovasculares quando comparado com os respectivos controles. A expressão parece estar localizada nos tecidos conjuntivos (pericárdio e endocárdio), sem evidências no tecido muscular (miocárdio) do animal C57BL/6 *sham*. Entretanto, em relação ao animal ApoE^{-/-} com hipertensão 2R1C, parece que a expressão não está restrita somente ao tecido conjuntivo e sim generalizada por todo o ventrículo, embora mais acentuada no pericárdio e endocárdio.



40X

Figura 21: Imunohistoquímica para os receptores AT₁ cardíacos. Cortes dos ventrículos de uma animal C57BL/6 e ApoE^{-/-} 2R1C, após 28 dias de estenose da artéria renal esquerda, comparados com os respectivos animais *sham*. As setas apontam os locais de maior expressão dos receptores AT₁. Esses dados foram reprodutivos em 2 animais de cada grupo.

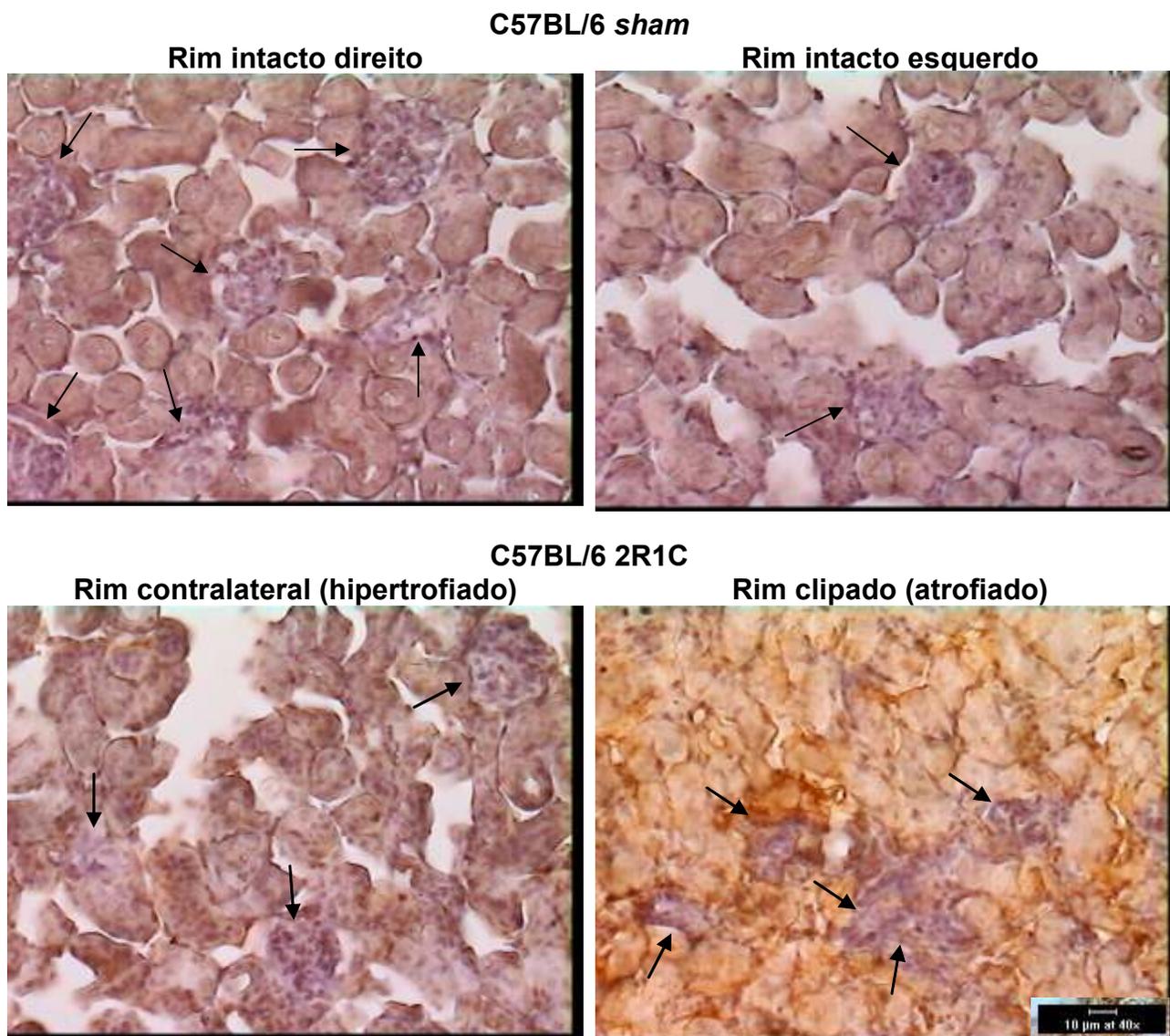
4.5.3. Rins

Na figura 22, verificamos os resultados da imunohistoquímica para os receptores AT₁ da angiotensina II nos rins dos animais C57BL/6 *sham* e 2R1C. O rim contralateral (hipertrofiado) do animal C57BL/6 2R1C apresentou uma coloração marrom indicando um aumento da expressão dos receptores AT₁. Quando comparamos esse resultado com o rim correspondente no animal C57BL/6 *sham*, não observamos a mesma intensidade da coloração marrom. Portanto, podemos sugerir que no rim contralateral do animal 2R1C há um *upregulation* dos receptores AT₁.

Em relação ao corte histológico do rim clipado (atrofiado) do animal C57BL/6 2R1C, observamos uma intensa marcação para os receptores AT₁ quando comparado com o animal C57BL/6 *sham*, evidenciando o papel da angiotensina II na atividade inflamatória nesse rim, que apresenta regiões isquêmicas e necróticas.

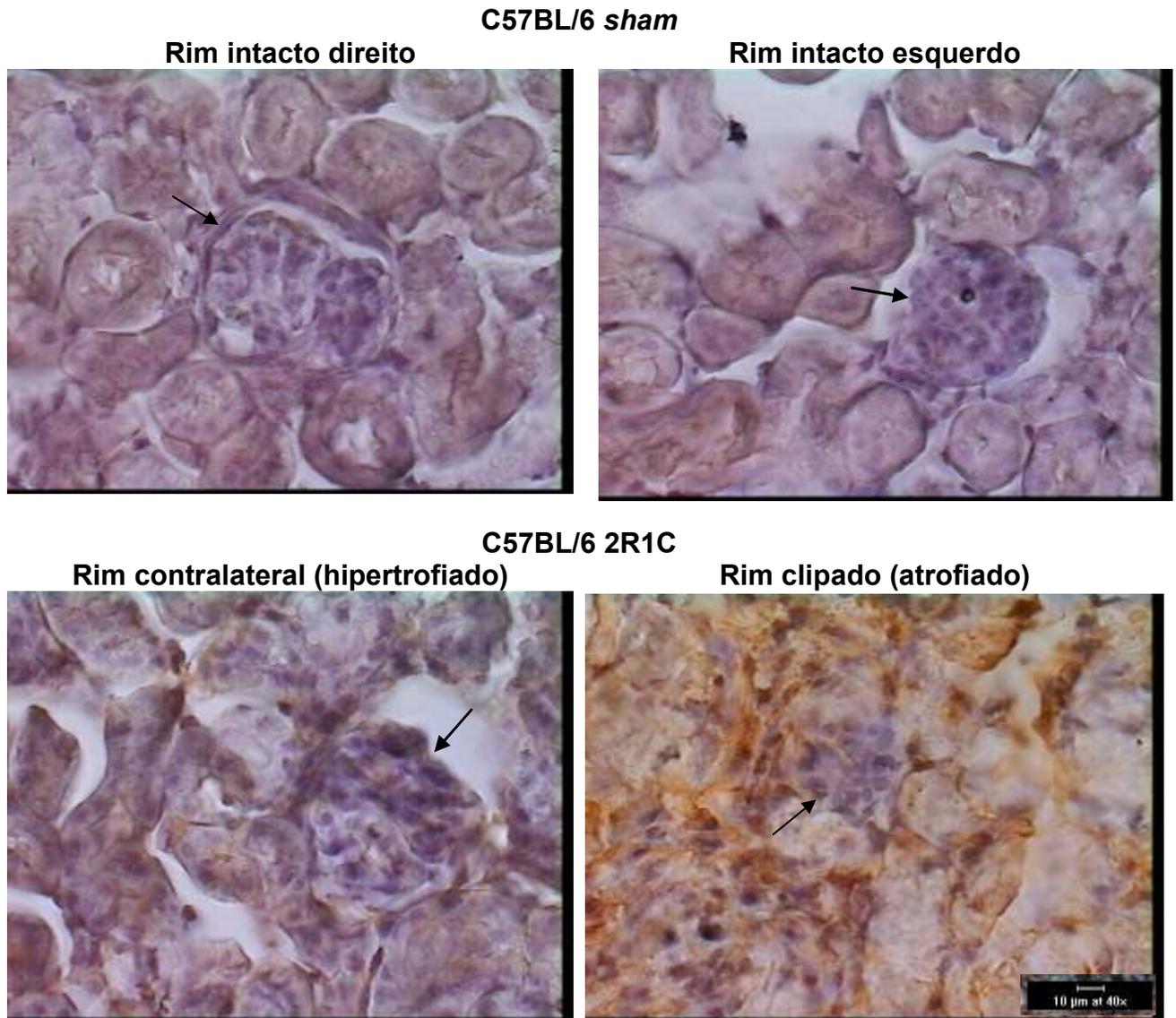
Na figura 23, podemos observar que as células dos túbulos contorcidos distais e proximais do rim hipertrofiado do animal 2R1C estão coloridas de marrom indicando a expressão dos receptores AT₁, o que não foi verificado no rim correspondente do animal *sham*.

Um outro resultado que merece atenção, tanto na figura 22 quanto na 23, é a morfologia dos glomérulos do rim clipado (atrofiado), que apresentam-se alterados e provavelmente reduz a capacidade funcional normal desse rim, se comparado com o rim contralateral, e até mesmo do animal *sham* em que a morfologia dos glomérulos está inalterada. Não há diferenças em relação à morfologia (figura 23) e nem mesmo ao número dos glomérulos (figura 22) quando comparamos o rim hipertrofiado do animal 2R1C com o rim correspondente do animal *sham*.



200X

Figura 22: Imunohistoquímica para os receptores AT₁ renais. Cortes dos rins (região medular) de uma animal C57BL/6 2R1C, após 28 dias de estenose da artéria renal esquerda, comparado com o animal controle (*sham*). As setas apontam os glomérulos e a coloração marrom indica os pontos de maior expressão dos receptores AT₁. Os cortes foram contracoloridos com hematoxilina. Os dados foram reprodutivos em 2 animais de cada grupo.



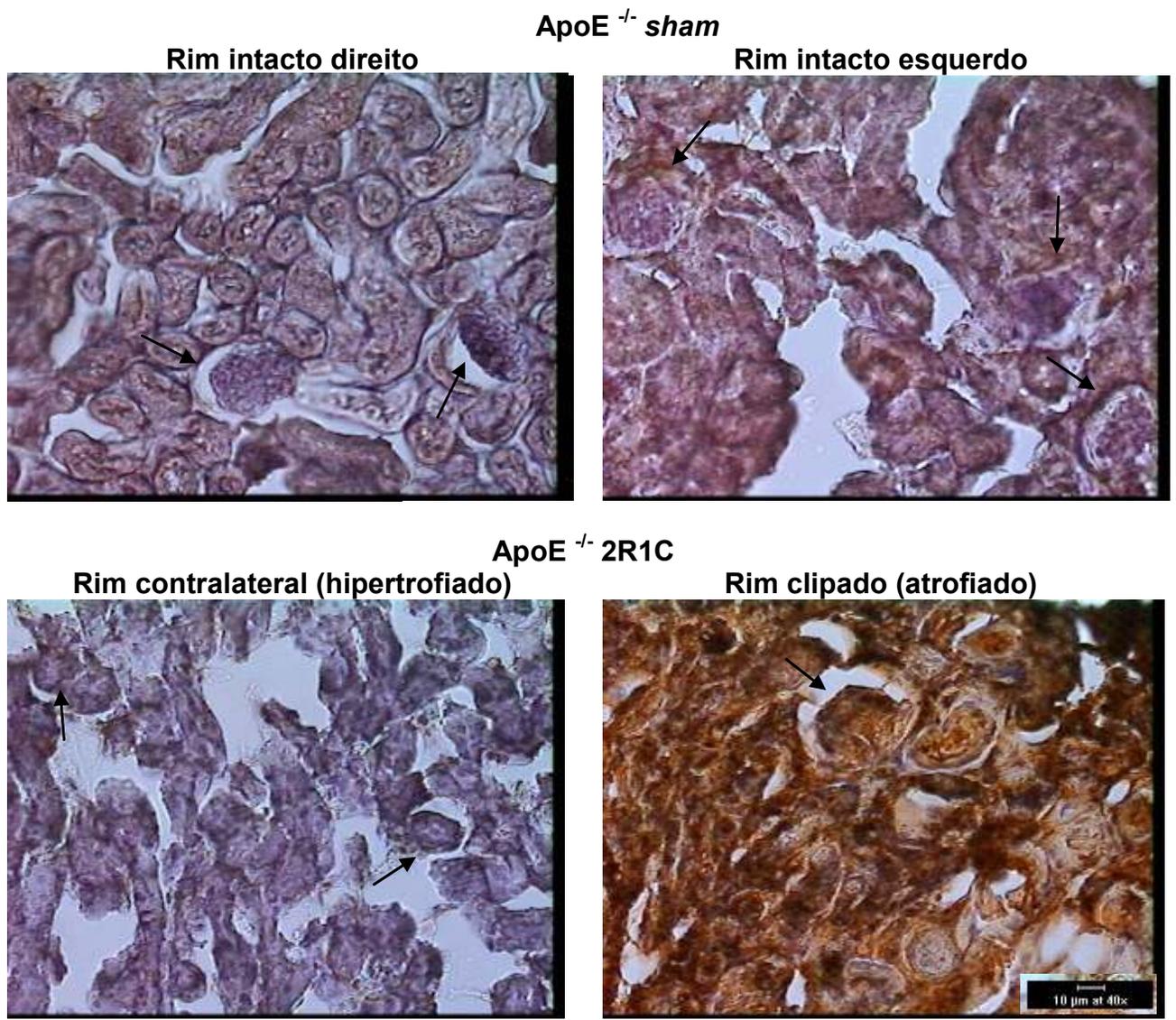
400X

Figura 23: Imunohistoquímica para os receptores AT₁ renais. Cortes dos rins (região medular) de uma animal C57BL/6 2R1C, após 28 dias de estenose da artéria renal esquerda, comparado com o animal controle (*sham*). As setas apontam os glomérulos e a coloração marrom indica os pontos de maior expressão dos receptores AT₁. Os cortes foram contracoloridos com hematoxilina. Os dados foram reprodutivos em 2 animais de cada grupo.

Na figura 24, observamos os resultados da imunohistoquímica para os receptores AT₁ no rim de um animal ApoE^{-/-} *sham* e de um animal ApoE^{-/-} 2R1C.

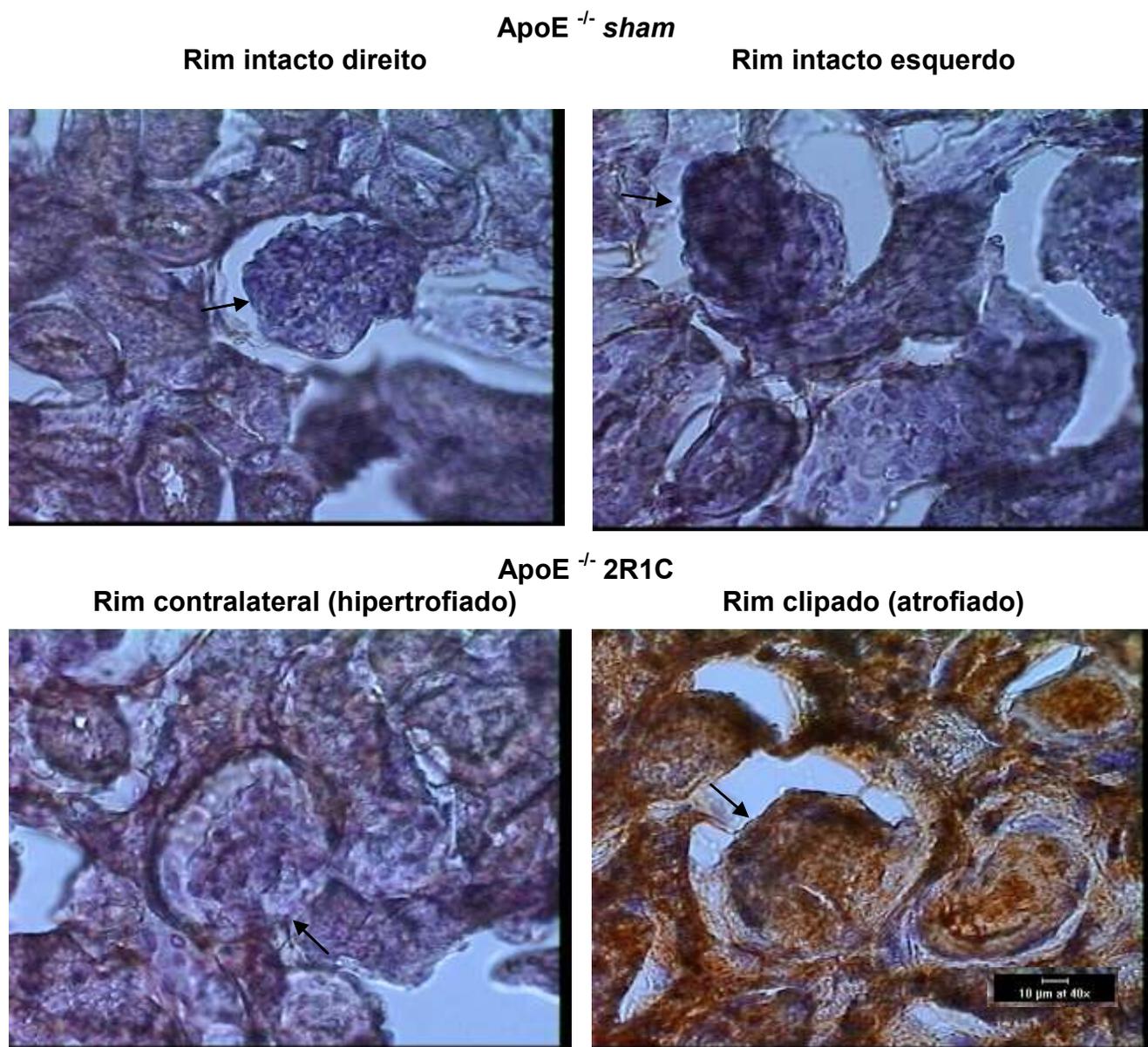
Como verificamos, não há marcação de cromogênio, evidenciada pela coloração marrom, no rim intacto direito e nem no esquerdo do animal ApoE^{-/-} sham. Entretanto, quando verificamos o corte histológico dos rins do animal ApoE^{-/-} 2R1C, observamos que há uma grande expressão dos receptores AT₁ no rim clipado (atrofiado), evidenciada pela coloração marrom, quando comparado com o animal sham, e até mesmo com o rim contralateral (hipertrofiado) do mesmo animal ApoE^{-/-} 2R1C, que, apesar de estar expressando mais AT₁ quando comparado com o correspondente do animal sham, ainda assim não está tão acentuada como a observada no rim clipado. Nos animais ApoE^{-/-} 2R1C, parece que há uma maior expressão de receptores AT₁ no rim atrofiado (figura 25) do que nos animais C57BL/6 2R1C (figura 23), sugerindo uma interferência da hipercolesterolemia na expressão do receptor AT₁ no rim estenosado dos animais ApoE^{-/-} 2R1C.

Na figura 25, não parece haver diferenças em relação ao número de glomérulos quando comparamos os animais hipercolesterolêmicos sham com os hipercolesterolêmicos 2R1C. Nessa figura, podemos observar também, porém, detalhadamente o resultado da imunohistoquímica para os receptores AT₁ o qual foi demonstrado estar expresso no rim contralateral e essa expressão muito maior no rim clipado.



200X

Figura 24: Imunohistoquímica para os receptores AT₁ renais. Cortes dos rins (região medular) de uma animal ApoE^{-/-} 2R1C, após 28 dias de estenose da artéria renal esquerda, comparado com o animal controle (*sham*). As setas apontam os glomérulos e a coloração marrom indica os pontos de maior expressão dos receptores AT₁. Os cortes foram contracoloridos com hematoxilina. Os dados foram reprodutivos em 2 animais de cada grupo.



400X

Figura 25: Imunohistoquímica para os receptores AT₁ renais. Cortes dos rins (região medular) de uma animal ApoE^{-/-} 2R1C, após 28 dias de estenose da artéria renal esquerda, comparado com o animal controle (*sham*). As setas apontam os glomérulos e a coloração marrom indica os pontos de maior expressão dos receptores AT₁. Os cortes foram contracoloridos com hematoxilina. Os dados foram reprodutivos em 2 animais de cada grupo.

5. Discussão

5.1. Valores Basais de Pressão Arterial Média e de Frequência Cardíaca

em Camundongos com Hipertensão Experimental Renovascular 2R1C

Atualmente, estudos vêm demonstrando que, no modelo experimental de hipertensão renovascular 2R1C, tanto em ratos quanto em camundongos, os níveis de angiotensina II plasmática estão aumentados até o 7º dia de estenose da artéria renal, e que, posteriormente, esses níveis retornam aos valores basais (Navar et al., 1998; Lazartigue et al., 2004). Ou seja: aos 28 dias de estenose, o modelo em questão é angiotensina II plasmática normal. Portanto, a hipertensão parece ser mantida por níveis elevados de angiotensina II intrarenal no lado não clipado, aumentando a reabsorção de sódio e, possivelmente, também, pelo aumento da produção de angiotensina II tecidual por meio da enzima conversora de angiotensina (ECA) tecidual ou pelas vias alternativas de produção da angiotensina II (Navar et al., 1998).

Os dados dos valores basais de pressão arterial dos camundongos com hipertensão renovascular 2R1C, no presente estudo, foram considerados modestos quando comparamos com os valores desse mesmo modelo em outras espécies. Por exemplo: no rato, a hipertensão renovascular 2R1C produz valores basais de PAM de aproximadamente 170mmHg (Moyses et al., 1994), níveis estes considerados de uma hipertensão grave. Schlager (1984), observou que as diferentes raças de camundongos isogênicos geneticamente hipertensos apresentam uma tendência a níveis de pressão arterial bem reduzidos, se comparados com ratos espontaneamente hipertensos, e isto estende-se também para outros modelos experimentais de hipertensão em camundongos, como o modelo L-NAME (Peotta et al., 2001), DOCA-sal (Johns et al., 1996), renovascular

1 rim-1clipe (Wiesel et al., 1997), e até mesmo o próprio modelo em questão, o 2R1C (Johns et al., 1996; Wiesel et al., 1997; Madeddu et al., 1998; Murat et al., 2000; Cervenka et al., 2002 e 2003).

O modelo de hipertensão experimental renovascular 2R1C em camundongos assemelha-se muito ao observado em coelhos, os quais também desenvolvem uma hipertensão arterial considerada moderada, com acréscimo de apenas 20mmHg (Head & Burke, 2001). Uma explicação para os níveis modestos de hipertensão no modelo 2R1C em camundongos talvez seja a ativação exagerada do sistema vasodilatador do óxido nítrico (NO) e/ou do sistema das cininas como a bradicinina, contrabalanceando os níveis elevados de hipertensão, uma vez que o próprio NO faz a mediação dos efeitos vasculares da bradicinina. Essa explicação é confirmada pelo estudo de Madeddu et al. (1998), em que observaram que camundongos *knockout* para o receptor B₂ da bradicinina com hipertensão 2R1C apresentavam um aumento significativo de pressão arterial de 32 e 38mmHg após 14 e 28 semanas, respectivamente, de estenose da artéria renal.

O papel do NO contrapondo a exacerbação dos efeitos vasoconstritores da angiotensina II no modelo renovascular 2R1C em camundongos também foi demonstrado por Cervenka et al. (2002). Neste estudo, foi administrado um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS) agudamente em camundongos *knockout* para o receptor AT_{1A} da angiotensina com hipertensão 2R1C e observou-se um aumento exagerado da hipertensão. O aumento da atividade da NOS no modelo 2R1C em camundongos pode ser atribuído aos níveis elevados de pressão, mesmo sendo caracterizado como uma hipertensão moderada, exacerbando o *shear stress* endotelial, o que é um potente estímulo

para a liberação de NO, ou mesmo por ações diretas da angiotensina II estimulando a produção de NO via ativação de receptores AT_{1A} como indicado por Pueyo et al (1998).

Um outro dado que pode explicar o fato do camundongo não atingir níveis elevados de pressão arterial como os ratos foi observado por Cassis et al (2004) em que, nos camundongos, os níveis basais de angiotensina II circulante apresentam-se elevados quando comparado com os ratos e, portanto, haveria um *downregulation* dos receptores AT₁. Os mesmos autores demonstraram que este fato é verdadeiro para camundongos C57BL/6 após infusão de angiotensina II se comparado com ratos Sprague-Dawley.

Contrastando os nossos dados, Mazzolai et al. (2004) e Lazartigues et al. (2004), encontraram valores de pressão arterial média de 140 e 160mmHg, respectivamente, no mesmo modelo utilizado neste presente estudo. Entretanto, o primeiro utilizou camundongos ApoE^{-/-} considerados jovens com 5 semanas de idade, o que poderia ter determinado níveis mais elevados de pressão, e o segundo utilizou o método de registro para pressão arterial por meio de telemetria em camundongos C57BL/6 durante os 28 dias de estenose da artéria renal. A telemetria é considerada um método eficiente para a monitorização da pressão arterial por um longo tempo, mas 28 dias talvez seja um intervalo excessivo para manter o animal com o *probe*, pois poderia estar causando desconforto e, com isso, contribuindo para atingir o valor de 160mmHg de PAM.

O fato da maioria dos registros hemodinâmicos no presente estudo terem sido realizados apenas 24 horas após a cirurgia de implantação dos cateteres poderia ter contribuído para os valores encontrados de PAM e de FC. Entretanto, foi realizada a medida dos registros hemodinâmicos (dados não mostrados) em

alguns animais com 24 e 48 horas após a cirurgia e verificamos que não há alteração dos valores encontrados para PAM e FC.

Os níveis de pressão arterial observados nos nossos animais com 12 semanas de idade não foram agravados pela presença de hipercolesterolemia/aterosclerose. Corroborando os nossos dados, Yang et al. (1999) demonstraram que camundongos ApoE^{-/-} só desenvolvem hipertensão espontânea quando há a presença de lesões graves com capa fibrótica causando uma disfunção endotelial e, conseqüentemente, uma hipertensão de até 16mmHg, o que ocorre somente em animais com idade a partir de 30 semanas. Neste mesmo estudo, foi comprovado que camundongos ApoE^{-/-} com 8 semanas de idade apresentam apenas hipercolesterolemia sem disfunção endotelial e sem hipertensão arterial. Como os nossos animais têm em média 12 semanas de vida, pode-se dizer que nesta idade as lesões são formadas por células espumosas e estrias gordurosas. Portanto, ainda não desenvolveram lesões graves o suficiente para causar hipertensão nos animais ApoE^{-/-} sham e nem mesmo agravar a hipertensão nos animais ApoE^{-/-} 2R1C.

Em nosso estudo, tanto os C57BL/6 quanto os ApoE^{-/-} apresentaram-se taquicárdicos após 28 dias de estenose da artéria renal. O mesmo resultado também foi demonstrado em camundongos C57BL/6 com hipertensão 2R1C após 14 dias (Wiesel et al., 1997), após 28 dias (Wiesel et al., 1997; Madeddu et al., 1998) e também em um outro estudo em nosso laboratório (dados não publicados) após 14 dias de estenose da artéria renal. Este resultado é uma característica do modelo 2R1C em camundongos, uma vez que em ratos só observa-se uma taquicardia transitória com 7 dias de estenose e depois de 28 dias a mesma desaparece (Moyses et al., 1994). A fisiologia do camundongo talvez

possa explicar este fato, porque, nesses animais, devido ao pequeno porte, a FC basal já é maior que a do rato, pois o coração precisa manter o débito cardíaco e em função do seu tamanho e, para exercer adequadamente esta função, precisa aumentar o cronotropismo. Somado a isto, esses animais têm uma predominância do tônus simpático basal (Jumrussirikul et al., 1998; Wickman et al., 1998; Janssen et al., 2000; Gehrmann et al., 2000; Just et al., 2000) e quando são submetidos a uma hipertensão 2R1C que é dependente de angiotensina II e sabendo-se que a angiotensina II aumenta a atividade simpática (Kobayashi et al., 1978), possivelmente, seja este o motivo pelo qual os camundongos com hipertensão renovascular 2R1C apresentam-se taquicárdicos.

Recentemente, Mazzolai et al. (2004) e Lazartigues et al. (2004) realizaram estudos em camundongos com hipertensão renovascular 2R1C e não observaram taquicardia. Entretanto, em relação ao primeiro autor os animais tinham idades diferentes das dos nossos animais e o segundo utilizou uma metodologia diferente para os registros hemodinâmicos a qual foi por meio de telemetria durante um longo período (28 dias). Portanto, pode existir diferenças entre cada laboratório de pesquisa em relação aos níveis basais de PAM e de FC no modelo experimental de hipertensão renovascular 2R1C em camundongos. Além disso, nos dois estudos citados os valores basais de FC dos respectivos animais controles (*sham*) eram 630 e 600 bpm, valores considerados elevados para camundongos da linhagem C57BL/6 que é de 450 a 500 bpm (Ryan et al., 2002).

5.2. Parâmetros Ponderais de Camundongos com Hipertensão

Renovascular 2R1C

O modelo de hipertensão renovascular 2R1C é conhecido por determinar hipertrofia ventricular em ratos (Cabral et al., 1998; Moyses et al., 1994; Dedeoglu & Springate, 2001), camundongos (Wiesel et al., 1997; Cervenka et al., 2002), mas não em coelhos (Wilfert et al., 2000).

Estudos anteriores em camundongos C57BL/6 (Wiesel et al., 1997; Cervenka et al., 2002; Mazzolai et al., 2004) mostram que, no modelo de hipertensão experimental 2R1C, não há perda de peso ao final dos 28 dias de estenose da artéria renal. Dados que corroboram os nossos e que nos permitem identificar a presença de hipertrofia ventricular nos nossos animais 2R1C, uma vez que esses não perderam peso e tinham os valores de peso ventricular maiores do que dos animais normotensos. A hipertrofia ventricular, muitas vezes, é estabelecida erroneamente devido a uma perda de peso dos animais ao longo do período de estenose e, como os valores da mesma são determinados por meio da relação peso ventricular/peso corporal, poderiam estar levando a um resultado falso positivo.

A hipertensão crônica resulta em modificações estruturais do sistema cardiovascular, e em particular causa hipertrofia ventricular, na qual representa uma adaptação ao aumento da sobrecarga cardíaca. Além disso, existem outros fatores hipertróficos, como a angiotensina II que, além de causar efeitos hemodinâmicos, contribui diretamente para a resposta hipertrófica via ligação aos receptores AT_{1A} , estimulando fatores de crescimento nos miócitos e fibroblastos cardíacos (Murat et al., 2000). Foi demonstrado no mesmo estudo que a hipertrofia ventricular no modelo 2R1C em camundongos ocorre às custas de

angiotensina II, estimulando a ativação de proteínas quinases mitogênicas (MAPK). A hipertrofia ventricular observada deve-se provavelmente mais aos efeitos diretos (celulares) da angiotensina II do que da própria hipertensão, uma vez que a hipertensão dos nossos animais é considerada modesta, por ser de apenas 20mmHg. Entretanto, não podemos descartar totalmente a influência do fator hemodinâmico.

Nossos resultados de hipertrofia ventricular corroboram estudos anteriores em camundongos C57BL/6 com hipertensão 2R1C (Wiesel et al., 1997; Madeddu et al., 1998; Murat et al., 2000) e contrastam os de Mazzolai et al. (2004) em camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-} com hipertensão 2R1C. Vale ressaltar que, neste último, os exemplares foram clipados com apenas 5 semanas de idade enquanto, no nosso estudo e nos demais, isto aconteceu com 8 semanas de idade.

Uma consequência no modelo experimental 2R1C é a presença de atrofia do rim clipado e de uma hipertrofia do rim contralateral, resultado considerado clássico neste modelo em outras espécies como cães e ratos (Goldblatt et al., 1934; Miksche et al., 1970), e que pode ser estendido também para os camundongos (Wiesel et al., 1997). Nossos dados também reproduziram este mesmo fato e, portanto, confirmaram o sucesso da nossa técnica.

A atrofia observada do rim clipado de alguns animais ApoE^{-/-} 2R1C foi ligeiramente mais acentuada do que nos animais C57BL/6 2R1C. Isto deve-se, possivelmente, pela presença inicial de pequenas lesões de estrias gordurosas e células espumosas evoluindo para as lesões intermediárias na artéria renal esquerda de alguns animais, já que, a partir da 12^a semana de idade, começam a aparecer lesões ateroscleróticas consideradas intermediárias nessa área (Yang et al., 1999). Portanto, alguns dos nossos animais poderiam estar em uma fase

limítrofe de evolução das estrias gordurosas para as lesões ateroscleróticas intermediárias, o que contribuiria para que a estenose fosse mais acentuada do que o calibre de 0,12mm que o clipe proporciona. De fato, alguns animais ApoE^{-/-}2R1C (dados não mostrados) no dia do experimento não apresentavam hipertensão e, quando era realizada a retirada dos rins para serem pesados, observava-se que o rim clipado apresentava-se isquêmico, fibrótico e com perda de tecido, provavelmente devido a uma estenose severa ao ponto de bloquear o fluxo sanguíneo para o mesmo.

5.3. Barorreflexo Arterial

O barorreflexo, principal mecanismo neural de ajustes rápidos da pressão arterial, e que pode estar alterado diante de algumas fisiopatologias como, por exemplo, hipertensão arterial e aterosclerose, já foi estudado em outras espécies de mamíferos como coelhos e ratos (Moysés et al., 1994; Wilfert et al., 2000; Head et al., 2001). Entretanto, quando o camundongo surgiu como a espécie favorita para os estudos da fisiologia cardiovascular, devido às inúmeras técnicas de engenharia genética que tornam possível a produção de descendentes transgênicos e *knockout*, uma nova corrida foi iniciada para reproduzir as técnicas de estudo que já eram bem estabelecidas em outras espécies. Nessa fase atual da pesquisa em fisiologia cardiovascular, constatamos que a fisiologia do camundongo é completamente diferente da de outras espécies, a começar quando observamos as tantas modificações e adaptações do controle barorreflexo nos diferentes modelos experimentais de hipertensão arterial em camundongos, e também quando estudamos esses modelos em animais *knockout*.

Os nossos dados demonstram que o barorreflexo na hipertensão renovascular 2R1C em camundongos está exagerado, frente aos aumentos de pressão, e atenuado, frente as diminuições da mesma. Esse resultado é diferente do mesmo modelo em ratos, em que há um prejuízo do barorreflexo (Moysés et al., 1994), e também em coelhos, em que a sensibilidade cardíaca dos barorreceptores mostrou-se atenuada (Head & Burke, 2001). Na tentativa de explicar este resultado, seguimos a linha de raciocínio de que o camundongo já é um animal simpatotônico, ou seja, tem uma predominância da atividade nervosa simpática para o coração e vasos periféricos (Jumrussirikul et al., 1998; Wickman et al., 1998; Janssen et al., 2000; Gehrman et al., 2000; Just et al., 2000). Portanto, quando submetido a uma hipertensão angiotensina II elevada, a qual, sabe-se, estimula a atividade do sistema nervoso simpático (Kobayashi et al., 1978), a atividade simpática torna-se ainda mais intensa. Baseado neste entendimento, e conhecendo como funciona o controle barorreflexo, quando desafiamos esse sistema com aumentos de pressão arterial, os animais renovasculares apresentam uma retirada simpática que torna-se muito mais significativa do que a dos animais que não estão sob a influência da angiotensina II. Além disso, os animais com hipertensão 2R1C apresentam-se taquicárdicos, provavelmente pela atuação da angiotensina II estimulando a atividade simpática. Por este motivo, a reserva cronotópica nesses é maior, o que contribuiria ainda mais para o exagero da resposta bradicárdica observada após a administração de fenilefrina.

Em contrapartida, seguindo o mesmo raciocínio acima, quando o sistema do barorreflexo é desafiado com diminuições de pressão arterial, a resposta cronotópica de reserva é muito reduzida, pois estão taquicárdicos e, com isso,

tentamos explicar o motivo pelo qual os animais com hipertensão 2R1C respondem pouco após a administração do nitroprussiato de sódio. Um dado que nos surpreendeu foi o da resposta reflexa taquicárdica exagerada dos animais ApoE^{-/-} *sham*, que eram hipercolesterolêmicos normotensos. Esses responderam mais ao nitroprussiato de sódio do que todos os outros grupos, inclusive o grupo dos C57BL/6 *sham*. O interessante foi que ambos partiam dos mesmos valores de FC basal.

Para tentar explicar esse resultado, sugerimos que os animais com hipercolesterolemia, tanto os normotensos (*sham*) quanto os hipertensos (2R1C), já apresentavam algumas lesões iniciais na região do arco aórtico e da bifurcação carotídea, o que estaria prejudicando a recepção do sinal pelos barorreceptores aórticos e carotídeos. Esse prejuízo na recepção do sinal poderia ser causado por modificações na organização das estruturas presentes na camada adventícia dos vasos (arco aórtico e seio carotídeo), local em que encontram-se os sítios das terminações barorreceptoras, em decorrência do processo aterosclerótico. Os barorreceptores, por serem mecanorreceptores sensíveis ao estiramento, estariam sofrendo algum tipo de prejuízo, como a perda da sensibilidade para detectar as diminuições de pressão arterial.

A especulação acima pode ser reforçada pelos estudos de Angell-James (1974) que, elegantemente, realizou os registros do nervo aórtico durante as alterações de pressão arterial em coelhos ateroscleróticos, e observou uma diminuição da frequência de disparos dos impulsos nervosos das fibras aferentes dos barorreceptores, demonstrando que há uma redução da atividade aferente barorreceptora na aterosclerose. Portanto, para o nosso entendimento, estariam trafegando menos potenciais de ação via nervo depressor aórtico e glossofaríngeo

em direção ao núcleo do trato solitário (NTS) nos animais ApoE^{-/-} do que nos animais C57BL/6. Conseqüentemente, frente as diminuições de pressão arterial pelo nitroprussiato de sódio, o NTS interpreta a informação de que é preciso aumentar a atividade simpática para o coração e vasos sanguíneos e, com isso, é desencadeada a resposta taquicárdica reflexa. Considerando que o camundongo já é um animal simpatotônico, o aumento da atividade simpática, levando à taquicardia reflexa nos animais ApoE *sham* após uma diminuição da pressão, torna-se bem mais acentuado, pois têm uma predominância da atividade simpática para o coração e vasos e, aliado a isto, apresentam lesões nos locais das terminações barorreceptoras, dificultando a recepção do sinal. Entretanto, se isso for verdadeiro, por que os animais ApoE^{-/-} 2R1C também não responderiam exageradamente ao nitroprussiato de sódio? Provavelmente, responderiam, mas vale ressaltar que já estão taquicárdicos em decorrência dos efeitos da hipertensão 2R1C (angiotensina II), e que essa taquicardia pode estar mascarando esse efeito frente as diminuições da pressão arterial.

Das diferentes análises utilizadas neste estudo para avaliar a sensibilidade do barorreflexo, a média dos ganhos e a regressão linear mostraram-se relevantes se comparada com o método da barocurva. Para avaliar a sensibilidade do barorreflexo em estados normais ou fisiopatológicos, o método escolhido para a análise deverá ser aquele que adapta-se aos objetivos do protocolo experimental. No presente estudo, para a análise da média dos ganhos e da regressão linear, foram considerados os métodos mais adequados por permitirem avaliar separadamente a sensibilidade determinada frente as respostas cronotrópicas reflexas bradicárdicas (ativação do componente parassimpático e retirada do simpático) e taquicárdicas (principalmente por ativação componente simpático),

enquanto, o método de análise por meio de barocurva analisa a sensibilidade dos componentes simpático e parassimpático juntos. Em nosso estudo, quando utilizamos a barocurva para representar o barorreflexo nos camundongos com hipertensão renovascular 2R1C, devido à resposta estar exagerada para os aumentos de pressão, e atenuada para as diminuições de pressão, o que observamos é uma anulação dessas respostas, uma vez que esse método analisa os componentes simpático e parassimpático conjuntamente. Por isto, a maioria dos estudos de barorreflexo em camundongos utiliza a regressão linear. Portanto, o método ideal para a análise do barorreflexo vai depender não só do protocolo experimental, mas também do animal experimental escolhido para o estudo.

Poderíamos ter estudado o barorreflexo por meio de análise espectral, em que verificam-se as variações espontâneas de pressão arterial e de FC. Entretanto, nosso objetivo foi desafiar o sistema para testar a sensibilidade do barorreflexo diante de duas fisiopatologias: hipertensão arterial e aterosclerose. Por este motivo, optamos por testar o sistema farmacologicamente com fenilefrina e nitroprussiato de sódio, ao invés de realizar a análise espectral.

Nossos resultados não nos permitem afirmar que o barorreflexo está prejudicado nos animais com hipertensão renovascular 2R1C, pois, na realidade, esse sistema está exagerado para os aumentos de pressão (resposta bradicárdica) e atenuado para as diminuições de pressão (resposta taquicárdica). Estudos adicionais de registro da atividade do nervo depressor aórtico e do nervo simpático renal, assim como utilização de bloqueadores do componente simpático e do parassimpático como o atenolol e a atropina, seriam necessários para sabermos qual dos componentes do barorreflexo estariam alterados na hipertensão 2R1C em camundongos.

Em nosso trabalho, poderíamos nos questionar se o camundongo seria um bom modelo experimental para os estudos do barorreflexo, uma vez que esses animais, simpatotônicos, apresentam uma fisiologia completamente diferente da de outras espécies, tais como os coelhos e ratos, vagotônicos como os humanos, e que foram extensivamente utilizados para a análise do controle neural do barorreflexo arterial. Isto, apesar de apresentar algumas desvantagens — como, por exemplo, o pequeno porte, dificultando a realização dos procedimentos cirúrgicos e o comportamento irrequieto, tornando a manipulação das manobras que envolvem o protocolo experimental do barorreflexo difíceis, a garantia de sucesso de um bom registro de pressão arterial ser extremamente difícil e a peculiaridade da fisiologia dessa espécie que está em direção oposta aos estudos baseados em ratos, coelhos e humanos. Ainda assim, é o único modelo animal experimental que oferece a ferramenta mais importante, atualmente, que é de produção dos modelos geneticamente modificados, os animais transgênicos e *knockout*, que nos auxiliam a entender cada vez melhor os processos fisiológicos, e que continua e continuará sendo a espécie escolhida para os estudos em fisiologia por um bom tempo, até que sejam vencidos os obstáculos metodológicos da produção de coelhos e ratos transgênicos e *knockout*. Atualmente, já existem ratos transgênicos. Entretanto, ainda não é possível a produção de ratos *knockout*.

Vale a pena ressaltar que o presente estudo é pioneiro em avaliar o barorreflexo no modelo experimental de hipertensão renovascular 2R1C em camundongos e também em camundongos ApoE^{-/-}.

5.4. Colesterol Plasmático

Os valores de colesterol plasmático total dos animais ApoE^{-/-} estão de acordo com os encontrados na literatura para idades próximas à das nossas cobaias (Nakashima et al., 1994; Yang et al., 1999). Entretanto, um resultado que nos surpreendeu foi de que nos ApoE^{-/-} *sham* os níveis de colesterol plasmático eram mais elevados do que nos ApoE^{-/-} 2R1C, indicando um envolvimento da angiotensina II na depuração daquela gordura. Este resultado também foi demonstrado nos estudos de Daughterty et al. (2000) em um modelo de infusão de angiotensina II sem hipertensão arterial. Uma explicação para isto seria de que nos 2R1C a hipertensão é considerada angiotensina II elevada (Navar et al., 1998), e a mesma estaria contribuindo para a captura do colesterol (LDL) da circulação e transportando-o para a parede dos vasos onde estariam sendo depositados. Esta explicação é sustentada pelo fato de outros estudos demonstrarem que a angiotensina II modifica a LDL-colesterol e aumenta a captação desta pelos macrófagos, via receptores *scavengers*. Estes são os receptores para LDL oxidada presente nos macrófagos, formando as células espumosas que acumulam-se na camada neo-íntima dos vasos (Cardona-Sanclemente et al., 1994; Keidar et al., 2001). Talvez este dado estenda-se também para o camundongo com hipertensão 2R1C, um modelo dependente de angiotensina II, pois a taxa de captura de colesterol plasmático parece estar aumentada visto que os níveis de colesterol plasmático dos animais com hipertensão 2R1C serem inferiores aos dos animais normotensos. Keidar et al. (2001), sugerem que o efeito da angiotensina II aumentando a captura de LDL pela aorta de ratos é independente da sua ação pressórica.

Embora não tenha sido estatisticamente significativa e apenas uma tendência, parece que a angiotensina II aumenta a captação de colesterol

plasmático mesmo sem a presença de hipercolesterolemia, uma vez que o grupo C57BL/6 2R1C apresentou um valor ligeiramente inferior dos níveis de colesterol plasmático quando comparado com o grupo C57BL/6 *sham*.

5.5. Histologia e Imunohistoquímica para os Receptores AT₁ da

Angiotensina II

Sabe-se que a angiotensina II, o maior efector do sistema renina-angiotensina, não está só envolvida nas doenças cardiovasculares, mas também apresenta uma participação especial no desencadeamento do processo aterosclerótico (Schmidt-Ott et al., 2000). No passado, acreditava-se que esse peptídeo afetava a aterosclerose exclusivamente devido aos seus efeitos hemodinâmicos. Nas últimas décadas, foi demonstrado que, além dos efeitos hemodinâmicos, a angiotensina II possui efeitos celulares que determinam modificações estruturais na parede dos vasos, como as observadas na doença aterosclerótica (Schmidt-Ott et al., 2000). Todos os componentes do sistema renina-angiotensina — tais como angiotensinogênio, angiotensina I, angiotensina II, enzima conversora da angiotensina e renina — apresentam RNAm nos vasos sanguíneos (Schmidt-Ott et al., 2000), o que reforça o papel crucial desse sistema na patogênese da doença aterosclerótica.

Os efeitos da angiotensina II são mediados pela proteína G acoplada aos receptores AT₁ e AT₂ e a maior parte dos efeitos celulares da angiotensina II, o que corresponde a 90%, é desencadeada pela ligação dos receptores AT₁ (Yang et al., 1998). Os mesmos autores também demonstraram que, em coelhos com aterosclerose em decorrência de hipercolesterolemia, a densidade dos receptores AT₁ na camada muscular dos vasos desses animais apresentava-se aumentada

em 5 vezes, e que há um aumento significativo da ligação do receptor AT_1 com a angiotensina II na camada neoíntima das artérias lesionadas. Portanto, a angiotensina II via seus receptores AT_1 tem um papel importante na hipertensão renovascular 2R1C e também na patogênese da aterosclerose. A partir deste conhecimento, realizamos a técnica de imunohistoquímica, um método qualitativo para analisarmos a expressão dos receptores AT_1 da angiotensina II nas terminações nervosas barorreceptoras do arco aórtico dos camundongos com hipertensão renovascular 2R1C, associada ou não com hipercolesterolemia.

A imunohistoquímica reportou que, em situações fisiológicas, a expressão dos receptores AT_1 da angiotensina II em camundongos está presente na camada íntima e adventícia do arco aórtico. O primeiro, em contato com a circulação sangüínea, e o último, local no qual encontram-se os fibroblastos, que são células residentes do tecido conjuntivo, mas que também migram para o músculo liso vascular, transformando-se em miofibroblastos, que têm como função o reparo e cicatrização do tecido. Os fibroblastos presentes na camada adventícia dos vasos já é conhecido por expressar receptores AT_1 que estão envolvidos na proliferação do músculo liso vascular e participam de todo o processo de reparo, bem como da atividade inflamatória. Por outro lado, nos camundongos com hipertensão 2R1C há um *downregulation* dos receptores AT_1 , o que seria explicado talvez pelo excesso de angiotensina II proveniente das vias alternativas de angiotensina II como a via da quimase (Arakawa e Urata, 2000).

Os dados da imunohistoquímica dos animais hipercolesterolêmicos normotensos revelaram que, além da presença de lesões formadas por células espumosas e estrias gordurosas na camada neoíntima do vaso, a presença dos receptores AT_1 está restrita apenas à camada adventícia do arco aórtico, local em

que encontram-se os fibroblastos, demonstrando que, nesses animais, as lesões ateroscleróticas iniciais ainda não estão envolvendo a migração dessas células para o músculo liso vascular. Em contraste, verificamos que, nos animais hipercolesterolêmicos hipertensos, há um *upregulation* dos receptores AT₁, observado pela maior expressão destes na camada neoíntima e média e, principalmente, nos locais em que encontram-se as lesões ateroscleróticas iniciais, sem evidências de expressão na camada adventícia. Este dado foi particularmente interessante porque a marcação dos receptores AT₁ serviu como um marcador indireto da migração dos fibroblastos da camada adventícia para a muscular, transformando-se em miofibroblastos e, assim, cumprindo o seu papel na atividade inflamatória e de reparo.

O espessamento da camada adventícia, bem como o aumento da expressão dos receptores AT₁ no arco aórtico dos animais ateroscleróticos em nosso estudo, pode ser explicado pelos dados de Arakawa e Urata (2000), sugerindo que a hipercolesterolemia ativa os mastócitos da camada adventícia a liberarem a quimase, uma enzima que participa das vias alternativas de produção de angiotensina II independentemente da enzima conversora de angiotensina. Com a liberação de quimase pelos mastócitos, há um aumento da concentração de angiotensina II e de interleucinas-1 β na camada adventícia. Essas citocinas são conhecidas por serem proaterogênicas e, provavelmente, por facilitar a deposição de lipídios na camada íntima. A própria quimase é conhecida por promover inúmeras ações proaterogênicas, como a degradação de matriz extracelular e a modificação das apolipoproteínas A1 e B, além de exercer um papel importante nas alterações estruturais características do remodelamento vascular, que já foi demonstrado nesses mesmos animais por outro estudo em

nosso laboratório (dados não publicados). A quimase também pode ser ativada por uma outra condição fisiopatológica, a hipertensão arterial. Essa informação pode explicar o fato dos animais hipercolesterolêmicos com hipertensão 2R1C, que é dependente de angiotensina II, apresentar maior espessamento do que os animais com somente hipercolesterolemia, e também a explicar o *upregulation* da expressão dos receptores AT₁ na camada muscular íntima e, principalmente, no local das lesões ateroscleróticas nesses animais.

O aumento da expressão dos receptores AT₁ nos animais hipercolesterolêmicos e hipertensos parece estar mais relacionada com o seu papel na patogênese da aterosclerose. Ou seja, muito mais no seu envolvimento na proliferação do músculo liso vascular, na captação de LDL-oxidada, no recrutamento de monócitos circulantes e na adesão de macrófagos do que seus efeitos hemodinâmicos. Esse último não pode ser totalmente descartado e parece ocorrer uma combinação dos efeitos hemodinâmicos e celulares, porém mais acentuado dos efeitos celulares.

A análise imunohistoquímica mostra que, nos ventrículos dos animais com hipertensão 2R1C, há uma maior expressão dos receptores AT₁ do que nos animais *sham*, evidenciada pela coloração marrom. Interessante é que esse aumento da expressão está localizado nos tecidos pericárdicos e endocárdicos, sem evidências no miocárdio. Ou seja, parece que a expressão está aumentada somente nos tecidos conjuntivos (pericárdio e endocárdio) e não no muscular (miocárdio). Uma hipótese para discutirmos esse dado seria de que há uma liberação de proteases, como a quimase, pelos mastócitos, células residentes do tecido conjuntivo, em decorrência de um estímulo que seria o de hipertensão arterial. O aumento da liberação de quimase estaria produzindo angiotensina II, a

qual, via seus receptores AT_1 presentes nos fibroblastos cardíacos, estaria contribuindo para a ativação de proteínas mitogênicas envolvidas na hipertrofia ventricular que, em nosso estudo, mostrou-se presente nos animais com hipertensão renovascular 2R1C.

Nos animais ateroscleróticos com hipertensão 2R1C, a expressão dos receptores AT_1 , apesar de mais acentuada no pericárdio e endocárdio, também está presente no miocárdio. Este dado é importante porque, nesses animais, além da hipertensão arterial dependente de angiotensina II (2R1C) estar aumentando a expressão desses receptores, existe a contribuição também da hipercolesterolemia que é conhecida por estar ativando a enzima quimase a produzir mais angiotensina II e, assim, mais receptores para esse peptídeo (Arakawa e Urata, 2000). Esses dados são particularmente interessantes em nosso estudo porque talvez possam nos ajudar a compreender os resultados de hipertrofia ventricular dos animais $ApoE^{-/-}$ 2R1C, que apresentaram valores ligeiramente maiores do que os animais C57BL/6 2R1C.

A imunohistoquímica renal mostrou que há uma maior marcação com cromogênio (coloração marrom) no rim contralateral (hipertrofiado) dos animais com hipertensão 2R1C quando comparado com o rim correspondente dos animais controles, evidenciando um aumento da expressão dos receptores AT_1 , principalmente nas células dos túbulos contorcidos proximais e distais. Esse resultado poderia ser explicado devido aos níveis elevados de angiotensina II intrarenal, característico da hipertensão experimental 2R1C (Navar et al., 1998). Já no rim clipado (atrofiado), o que observamos foi uma superexpressão dos receptores AT_1 em todo ele, o que talvez tenha uma relação com a atividade da angiotensina II no processo inflamatório do tecido renal, o qual apresentava

regiões de necrose. O fato de observarmos a alteração da morfologia dos glomérulos do rim clipado dos animais hipertensos já era esperado, porque esse tem um prejuízo da sua função fisiológica normal em decorrência da estenose da artéria renal.

Nos animais ApoE^{-/-} 2R1C, a imunohistoquímica renal revelou que, assim como nos animais C57BL/6 2R1C, há um aumento da expressão dos receptores AT₁ no rim contralateral e uma superexpressão no rim clipado. A superexpressão desses receptores parece maior no rim estenosado do animal ApoE^{-/-} 2R1C do que no animal C57BL/6 2R1C. Este fato possivelmente possa ser explicado pelos níveis elevados de angiotensina II aliados à presença da LDL-colesterol no rim atrofiado, agravando o processo inflamatório nesse rim.

Estudos recentes de Chen et al. (2001) e Wen et al. (2002) sobre a morfologia renal em camundongos ApoE^{-/-} demonstraram que há um prejuízo da função renal pelo depósito de lipídeos nos glomérulos, levando a uma inflamação com infiltração de macrófagos e formação de células espumosas, determinando nefropatias como a glomerulonefrite e a glomeruloesclerose. No presente estudo, não observamos a presença dessas nefropatias, o que pode ser explicado pela idade dos animais, em média de 12 semanas, e, na realidade, eram hipercolesterolêmicos em transição para aterosclerose, porém com lesões intermediárias e não suficientes para acometer os rins como as observadas nos estudos de Chen et al. (2001) e Wen et al. (2002), em que os animais tinham idade de aproximadamente 36 semanas e apresentavam lesões avançadas.

Sabe-se que o camundongo apoE^{-/-} apresenta uma redução do número de glomérulos e que a idade é um fator importante para a progressão das lesões morfológicas renais, iniciando-se a partir de 24 semanas de idade e consideradas

severas em animais com 36 semanas (Wen et al., 2000). Em nosso estudo, não observamos alteração no número de glomérulos e nem mesmo a presença de uma hipertrofia dessa estrutura em nenhum dos grupos experimentais, nem mesmo associando hipertensão arterial e aterosclerose, provavelmente devido à idade dos mesmos.

Vale ressaltar que este estudo é pioneiro em realizar a imunohistoquímica para os receptores AT₁ da angiotensina II no arco aórtico, ventrículos e rins de animais hipercolesterolêmicos com hipertensão experimental renovascular 2R1C.

O camundongo ApoE^{-/-} é um modelo experimental que oferece uma infinidade de possibilidades de estudos na fisiologia cardiovascular, renal, e neurofisiologia, dentre outras áreas afins. Os resultados deste presente estudo resultaram em muitos questionamentos que ainda precisam ser investigados. Por exemplo: como estará a função renal desses animais? Poderíamos também testar a terapia gênica de reposição do gene da ApoE e observarmos se há a melhora das inúmeras fisiopatologias que os animais ApoE^{-/-} com lesões avançadas. Assim como utilizar as técnicas de biologia molecular para localizarmos a expressão de substâncias relacionadas à ApoE ou estudar a reatividade vascular nesses animais, dentre outras idéias que vão surgindo a partir dos estudos nesse modelo de animal experimental. Entretanto, para realizarmos essas pesquisas, necessitamos entender melhor a fisiologia do camundongo, bem diferente dos modelos experimentais utilizados anteriormente nos estudos em fisiologia, como os ratos e coelhos.

6. Conclusões

- Os camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-} 2R1C apresentaram hipertensão arterial, com presença de taquicardia e hipertrofia ventricular. Considerando que a angiotensina II, elevada no modelo 2R1C, aumenta a atividade simpática, é possível que seja esta a razão pela qual os animais renovasculares apresentaram uma taquicardia significativa em relação aos seus controles.
- A presença de hipertrofia ventricular pode ter sido uma consequência das ações diretas (efeitos celulares) da angiotensina II, via receptores AT₁ no coração, causando aumento dos miócitos e fibroblastos cardíacos e também indiretas (efeitos hemodinâmicos).
- A resposta bradicárdica reflexa frente à administração de fenilefrina, está aumentada nos animais hipertensos (2R1C) quando comparada com os animais normotensos (*sham*), sem diferenças entre os grupos, sugerindo que essa alteração é devido a hipertensão 2R1C e não à aterosclerose.
- Em contraste, a resposta taquicárdica reflexa frente à administração de nitroprussiato de sódio, apresenta-se atenuada nos animais 2R1C quando comparado com os animais *sham*. Os animais apoE^{-/-} *sham* responderam mais ao nitroprussiato de sódio (resposta taquicárdica) do que os animais C57BL/6 *sham*.

- Conseqüentemente, a sensibilidade (média dos ganhos) do BR está aumentada em resposta à fenilefrina e prejudicada em resposta ao nitroprussiato de sódio nos camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-} com hipertensão 2R1C, quando comparados com os animais *sham*.
- Das diferentes análises utilizadas neste estudo para avaliar a sensibilidade do barorreflexo, a média dos ganhos e a regressão linear mostraram-se relevantes se comparadas com o método da barocurva.
- A hipertensão 2R1C não acelera a progressão da aterosclerose, visto pela presença de apenas estrias gordurosas e de pequenas lesões ateroscleróticas semelhantes no arco aórtico dos animais ApoE^{-/-} *sham* e 2R1C.
- A hipertensão renovascular 2R1C causou um aumento no diâmetro do arco aórtico dos animais hipertensos, tanto nos C57BL/6 quanto nos animais ApoE^{-/-}, sendo mais significante nos ApoE^{-/-} 2R1C.
- A imunohistoquímica do arco aórtico revelou que há um *downregulation* dos receptores AT₁ da angiotensina II nos camundongos C57BL/6 com hipertensão renovascular 2R1C e um *upregulation* desses receptores nos camundongos ApoE^{-/-} com hipertensão 2R1C quando comparado com os controles.

- A análise imunohistoquímica do arco aórtico além de ter identificado os locais de expressão dos receptores AT₁ também evidenciou que a camada adventícia nos animais ateroscleróticos *sham* e, principalmente nos animais ateroscleróticos com hipertensão 2R1C, apresentavam-se espessas e bem desenvolvidas quando comparado com os animais controles.
- A expressão dos receptores AT₁ mostrou-se aumentada nos ventrículos dos camundongos com hipertensão renovascular 2R1C, no pericárdio e endocárdio dos animais C57BL/6 e nos animais ApoE^{-/-}, além destas regiões, também no miocárdio.
- A imunohistoquímica renal demonstrou um *upregulation* dos receptores AT₁ no rim contralateral (hipertrofiado) dos camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-} 2R1C se comparado com os respectivos animais controles.

7. Referências Bibliográficas:

Alexander N, Decuir M (1963). Role of aortic and vagus nerves in arterial baroreflex bradycardia in rabbits. *American Journal of Physiology*, 205:775-780.

Alexander RW (1995). Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response. *Hypertension*, 25: 155-161.

Angell-James JE (1974). Arterial baroreceptor activity in rabbits with experimental atherosclerosis. *Circulation Research*, 34:27-39.

Arakawa K, Urata H (2000). Hypothesis regarding the pathophysiological Role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. *Hypertension*, 36:638-641.

Breslow JL (1993). Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90:8314-8318.

Cabral AM, Moysés MR, Vasquez EC (1988). Left ventricular hypertrophy differences between male and female renovascular hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21:633-635.

Cardona –Sanclemente LE, Medina R, Born GVR (1994). Effect of increasing doses of angiotensin II infused into normal and hypertensive Wistar rats on low density lipoprotein and fibrinogen uptake by aortic walls. *Pharmacology*, 91:3285-3288.

Cassis LA, Huang J, Gong MC, Daugherty A (2004). Role of metabolism and receptor responsiveness in the attenuated responses to Angiotensin II in mice compared to rats. *Regulatory Peptides*, 117(2):107-116.

Cervenka L, Horáček V, Vanecková I, Hubáček JA, Oliverio MI, Coffman TM, Navar LG (2002). Essential role of AT_{1A} receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension*, 40:735-741.

Cervenka L, Vanecková I, Malý J, Horáček V, El-Dahr SS (2003). Genetic inactivation of the B₂ receptor in mice worsens two-kidney, one-clip hypertension: role of NO and the AT₂ receptor. *Journal of Hypertension*, 21:1531-1538.

Chalmers J, Pilowsky P (1991). Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. *Journal of Hypertension*, 9:675-694.

Chapleau MW (1999). Arterial baroreflexes. In Izzo JL and Black HR (editors), *Hypertension Primer*, 2nd edition, American Heart Association, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore: 83-86.

Chen G, Paka L, Kako Y, Singhal P, Duan W (2001). A protective role for kidney apolipoprotein E. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(52):49142-49147.

Chonobian AV, Lichtenstein AH, Nilakhe V, Haudenschild CC, Drago R, Nickerson C (1989). Influence of hypertension on aortic atherosclerosis in the Watanabe rabbit. *Hypertension*, 14:203-209.

Dart AM, Lacombe F, Yeoh JK, Cameron JD, Jennings GL, Laufer E, Esmore DS (1991). Aortic distensibility in patients with isolated hypercholesterolaemia, coronary heart disease or cardiac transplant. *Lancet*, 338:270-273.

Daugherty A, Manning MW, Cassis LA (2000). Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 105:1605-1612.

De Angelis K, Wichi RB, Moreira ED, Morris M, Krieger EM, Irygoyen MC (2004). Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice, *Journal of Applied Physiology*, 96(6):2174-2178.

Dedeoglu IO, Springate JE (2001). Effect of nitric oxid inhibition on kidney function in experimental renovascular hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, 23(3):267-275.

Dias da Silva VJ, Vargas da Silva S, Salgado MCO, Salgado HC (1994). Chronic converting enzyme inhibition facilitates baroreceptor resetting to hypertensive levels. *Hypertension* , 23(suppl I):I-68 - I-72.

Doyle AE (1992). Hypertension and vascular disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 19(suppl 5): S7-S10.

Franchini KG, Krieger EM (1992). Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic denervated rats. *American Journal of Physiology*, 262: R677-R683.

Gava AL, Peotta VA, Cabral AM, Meyrelles SS, Vasquez EC (2004). Decreased baroreflex sensitivity in isoproterenol-treated mice with cardiac hypertrophy. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 114:47-54.

Gehrmann J, Hammer PE, Maguire CT, Wakimoto H, Triedman JK, Berul CI (2000). Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *American Journal of Physiology, Heart Circulation Physiology*, 279:H733-H740.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal, R (1934). Studies on experimental hypertension: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *Journal of Experimental Medicine*, 59:347-378.

Head GA, Adams MA (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. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 15:289-292.

Head GA, Burke SL (2001). Renal and cardiac sympathetic baroreflexes in hypertensive rabbits. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 28:972-975.

Hof RP, Hof A (1988). Vasoconstrictor and vasodilator effects in normal and atherosclerotic conscious rabbits. *British Journal of Pharmacology*, 95:1075-1080.

Hofker MH, van Vlijmen BJM, Havekes LM (1998). Transgenic mouse models to study the role of apoE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 137: 1-11.

Irigoyen MC, Krieger EM (1998). Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(9):1213-1220.

Janssen BJA, Leenders PJA, Smits JFM (2000). Short-term and long-term blood pressure and heart rate variability in the mouse. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 278:R215-R225.

John S, Delles C, Klingbeil AU, Jacobi J, Schlaich MP, Schmieder RE (1999). Low-density lipoprotein-cholesterol determines vascular responsiveness to angiotensin II in normocholesterolaemic humans. *Journal of Hypertension*, 17(12 Pt 2): 1933-1939.

Johns C, Gavras I, Handy DE, Salomao A, Gavras H (1996). Models of experimental hypertension. *Hypertension*, 28:1064-1069.

Jumrussirikul P, Dinerman J, Dawson TM, Dawson VL, Ekelund U, Georgakopoulos D, Schramm LP, Calkins H, Snyder SH, Hare JM, Berger RD (1998). Interaction between neuronal nitric oxide synthase and inhibitory G protein activity in heart rate regulation in conscious mice. *Journal of Clinical Investigation*, 102:1279-1285.

Just A, Faulhaber J, Ehmke H (2000). Autonomic cardiovascular control in conscious mice. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279:R2214-R2221.

Kannel WB and Wilson PWF (1999). Cardiovascular risk factors and hypertension. In Izzo JL and Black HR (editors), Hypertension Primer, 2nd edition, American Heart Association, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore: 199-202.

Keidar S (1998). Angiotensin, LDL peroxidation and atherosclerosis. *Life Science*, 63(1):1-11.

Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, Hayek T, Aviram M (2001). Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized LDL a possible role for interleukin-6. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 21:1464-1469.

Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li HM (1999). Apolipoprotein inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunology*, 159:124-139.

Kobayashi M, Furukawa Y, Chiba S (1978). Positive chronotropic and inotropic effects of angiotensin II in the dog heart. *European Journal of Pharmacology*, 50:17-25.

Korner PI (1989). Baroreceptor resetting and other determinants of baroreflex properties in hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 15:45-64.

Krieger EM (1964). Neurogenic hypertension in the rat. *Circulation Research*, 15: 511-521.

Krieger EM (1970). Time course of baroreceptor resetting in acute hypertension. *American Journal of Physiology*, (213)1:139-142.

Krieger EM, Salgado HC, Michelini LC (1982). Resetting of the baroreceptors. In: Guyton AC, Hall JE (eds). *Cardiovascular Physiology IV. International Review of Physiology*, 26:119-146.

Lazartigues E, Lawrence AJ, Lamb FS, Davisson RL (2004). Renovascular hypertension in mice with brain-selective overexpression of AT_{1a} receptors is buffered by increased nitric oxide production in the periphery. *Circulation Research*, 95:523-531.

Luz PL, Coimbra SR (2004). Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37:1275-1295.

Mahley RW (1998). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240:622-630.

Madeddu P, Milia AF, Salis MB, Gaspa L, Gross W, Lippoldt A, Emanuelli C (1998). Renovascular hypertension in bradykinin B₂-receptor knockout mice. *Hypertension*, 32:503-509.

Marquardt DW (1963). Na algorithm for least-squares estimation of non-linear parameters. *Journal of the Society of Industry and Applied Mathematics*, 21: 203-213.

Mazzone T (1996). Apolipoprotein E secretion by macrophages: its potential physiological functions. *Current Opinion Lipidology*, 7:303-307.

Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, Bouzourene K, Aubert JF, Hao H, Vallet V, Brunner H-R, Nussberger J, Gabbiani, Hayoz D (2004). Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice. *Hypertension*, 44:277-282.

Meyrelles SS, Mill JG, Cabral AM, Vasquez EC (1996). Cardiac baroreflex properties in myocardial infarcted rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 60:163-186.

Meyrelles SS, Mauad H, Mathias SCB, Cabral AM, Vasquez EC (1998). Effects of myocardial hypertrophy on neural reflexes controlling cardiovascular function. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 73: 135-142.

Meyrelles SS, Chapleau MW (1999). Carotid baroreflex control of arterial pressure studied by sequential carotid occlusion in mice (abstract). *FASEB Journal*, 13(5):A775-A775.

Meyrelles SS, Chapleau MW (2000). Impaired carotid occlusion reflex in apo-E deficient mice and its reversal by gene transfer to carotid sinus (abstract). *Journal of Hypertension*, 18 (supp 4):S202-S207.

Michelini LC, Marcelo MC, Amico J, Morris M (2003). Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: studies in oxytocin-deficient mice. *American Journal of Physiology, Heart Circulation Physiology*, 284:H2269-H2276.

Miksche LW, Miksche U, Gross F (1970). Effect of sodium restriction on renal hypertension and on renin activity in the rat. *Circulation Research*, 27:973-984.

Mitchell KD, Navar LG (1995). Intrarenal actions of angiotensin II in the pathogenesis of experimental hypertension. In Larah JH and Brenner BM (editors):

Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management, New York, NY: Raven, 1437-1450.

Miyata M, Smith JD (1996). Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and β -amyloid peptides. *Nature Genetics*, 14:55-61.

Mohanty PK (1999). Cardiopulmonary baroreflexes. In Izzo JL and Black HR (editors), *Hypertension Primer*, 2nd edition, American Heart Association, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore: 87-88.

Moreira EM, Ida F, Oliveira VL, Krieger EM (1990). Rapid resetting of the baroreceptors in renal hypertensive rats. *Hypertension*, 15(suppl. 2):I40-I44.

Moyses MR, Cabral AM, Bissoli N, Vasquez EC (1994). Time course of changes in sigmoidal-fitting baroreceptor curves in one-kidney, one-clip hypertensive rats. *Hypertension*, 23(suppl I):87-92.

Murat A, Pellieux C, Brunner HR, Pedrazzini T (2000). Calcineurin blockade prevents cardiac mitogen-activated protein kinase activation and hypertrophy in renovascular hypertension. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(52):40867-40873.

Naito HK (1996). Coronary artery disease and disorders of lipid metabolism. In: Kaplan LA and Pesce AJ (editors), *Clinical Chemistry: theory, analysis and correlation*, 3rd ed., Mosby, New York, pp 642-681.

Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 14:133-140.

Navar LG, Zou L, von Thun A, Wang CT, Imig JD, Mitchell D (1998). Unraveling the mystery of Goldblatt hypertension. *News in Physiological Science*, 13:170-176.

Ollin JW (1999). Evaluation of the peripheral circulation. In Izzo JL and Black HR (editors), *Hypertension Primer*, 2nd edition, American Heart Association, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, p323-326.

O'Rourke MF (1999). Arterial stiffness and hypertension. In Izzo JL and Black HR (editors), *Hypertension Primer*, 2nd ed, American Heart Association, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp 160-162.

Peotta VA, Vasquez EC, Meyrelles SS (2001). Cardiovascular neural reflex in L-NAME-induced hypertension in mice. *Hypertension*, 38(2Pt3):555-559.

Piedrahita JA, Zhang SH, Hageman JR, Oliver PM, Maeda N (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene mediated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:4471-4475.

Plath DW (1983). Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney one-clip renal vascular hypertension. *American Journal of Physiology*, 245:F131-F141.

Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyf JG, Rubin EM, Breslow JL (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71:343-453.

Potter DD, Sobey CG, Tompkins PK, Rossen JD, Heistad DD (1998). Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II. *Circulation*, 98: 800-807.

Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel JB, 1998. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrate in endothelial cells. *American Journal of Physiology*, 274:C214-C220.

Pulicino P (1999). Pathogenesis of stroke. In Izzo JL and Black HR (editors), *Hypertension Primer*, 2nd ed, American Heart Association, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp 183-185.

Ryan MJ, Sean PD, Davis DR, Faraci FM, Sigmund CD (2002). Endothelial dysfunction and blood pressure variability in selected inbred mouse strains. *Arteriosclerosis and Thrombosis Vascular Biology*, 22:42-48.

Reis DJ (1999). Functional neuroanatomy of central vasomotor control centers. In Izzo JL and Black HR (editors), *Hypertension Primer*, 2nd edition, American Heart Association, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp 80-82.

Ross R (1999). Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, 340(2):115-126.

Riddell DR, Graham A, Owen JS. Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine: nitric oxide pathway – Implications for vascular disease. *Journal of Biology and Chemistry*, 272:89-95.

Rouis M, Adamy C, Duverger N, Lesnik P, Horellou P, Moreau M, Emmanuel F, Caillaud JM, Laplaud PM, Dachet C, Chapman MJ (1999). Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 100:533-540.

Schlanger G (1984). *Genetic hypertension in different strains of mice*. In: Jong W (editor). *Handbook of Hypertension: Experimental and Genetic Models of Hypertension*. 1st edition, New York, NY, Elsevier Science Publishers, (4): 193-99.

Schmidt-Ott KM, Kagiya S, Phillips IM (2000). The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regulatory Peptides*, 93:65-77.

Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, Powell-Braxton L, Bunting S, Schwartz SM, Rosenfeld ME (1997). Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient

mice: potential roles of lipid deposition, medial atrophy, and adventitial inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 17: 3593-3601.

Simon A, Megnien J-L, Gariépy J, Levenson J (1998). Early atherosclerosis in human hypertension. *American Journal of Hypertension*, 11:882-883.

Shi C, Lee W-S, Russell ME, Zhang D, Fletcher DL, Newel JB, Haber E (1997). Hypercholesterolemia exacerbates transplant arteriosclerosis via increased neointimal smooth muscle cell accumulation: studies in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation*, 96: 2722-2728.

Stec DE, Davisson RL, Sigmund D (1998). Tools for studying genetic determinants of hypertension. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 8:256-264.

Sugiyama F, Haraoka S, Watanabe T, Shiota N, Taniguchi K, Ueno Y, Tanimoto K, Murakami K, Fukamizu A, Yagami K-I (1997). Acceleration of atherosclerotic lesions in transgenic mice with hypertension by the activated renin-angiotensin system. *Laboratory Investigation*, 76(6): 835-842.

Vasquez EC (1994). The contribution of the cardiopulmonary reflex to the cardiovascular regulation in normal and pathophysiological states. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27(4):1049-1064.

Vasquez EC, Cunha RS, Cabral AM (1994). Baroreceptor reflex function in rats submitted to chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 767-774.

Vasquez EC, Meyrelles SS, Mauad H, Cabral AM (1997). Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30:521-532.

Vasquez EC, Johnson RF, Beltz TG, Haskell RE, Davidson BL, Johnson AK (1998). Replication-deficient adenovirus vector transfer of gfp reporter gene into supraoptic nucleus and subfornical organ neurons. *Experimental Neurology*, 154(2): 353-365.

Vasquez EC, Beltz TG, Meyrelles SS, Johnson AK (1999). Adenovirus-mediated gene delivery to hypothalamic magnocellular neurons in mice. *Hypertension*, 34 (part II): 756-761.

von Eckardstein A (1996). Cholesterol efflux from macrophages and other cells. *Current Opinion Lipidology*, 7:308-319.

von Thun AM, El-Dahr SS, Vari RC, Navar LG (1994). Modulation of renin-angiotensin and kallikrein gene expression in experimental hypertension. *Hypertension*, 23, Suppl. I:I-131-I-136.

Volpe M, Musumeci B, Paolis P, Savoia C, Morganti A (2003). Angiotensin II AT₂ receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? *Journal of Hypertension* 21:1429-1443.

Wen M, Segerer S, Dantas M, Brown PA, Hudkins KL, Goodpaster T, Kirk E, LeBoeuf RC, Alpers CE (2002). Renal injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Laboratory Investigation*, 82:980;999-1006.

Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T (1997). Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertension*, 29:1025-1030.

Wickman K, Nemeč J, Gendler SJ, Clapham DE (1998). Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron*, 20:103-114.

Wilfert K, Drischel K, Unbehau A, Guski H, Persson PB, Stauss HM (2000). Vascular response to angiotensin II in atherosclerosis: Role of baroreflex. *Hypertension*, 35:685-690.

Xie P, McDowell TS, Hajduczuk G, Chapleau MW, Abboud FM (1988). Contribution of cyclooxygenase metabolites to baroreceptor activation in hypercholesteremic (HC) rabbits (Abstract). *Circulation*, 78(suppl II):II-177.

Yang BC, Phillips MI, Mohuczy D, Meng H, Shen L, Mehta P, Mehta JL (1998). Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 18: 1433-1439.

Yang R, Powell-Braxton, Ogaoawara AK, Dybdal N, Bunting S, Ohneda O, Jin H (1999). Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice. *Arteriosclerosis and Thrombosis Vascular Biology*, 19:2762-2768.

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258: 468-471.