



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

JESSICA LUMI BOTÊLHO MIURA

**EFEITO DA INJEÇÃO DO COMPOSTO 21 NO BULBO
ROSTROVENTROLATERAL DE RATOS COM HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR 2-RINS-1-CLIFE**

Araraquara, SP
2021

JESSICA LUMI BOTÊLHO MIURA

**EFEITO DA INJEÇÃO DO COMPOSTO 21 NO BULBO
ROSTROVENTROLATERAL DE RATOS COM HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR 2-RINS-1-CLIFE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica Bioquímica.

Orientador(a): Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari

Coorientador.(a): Ms. Jéssica Matheus de Sá

**Araraquara, SP
2021**

M685e

Miura, Jessica Lumi Botelho.

Efeito da injeção do composto 21 no bulbo rostrventrolateral de ratos com hipertensão renovascular 2-Rins-1-Clipe / Jessica Lumi Botelho Miura. – Araraquara: [S.n.], 2021.
49 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Débora Simões de Almeida Colombari.
Coorientadora: Jéssica Matheus de Sá.

1. Receptor AT1. 2. Receptor AT2. 3. Hipertensão renovascular. 4. Bulbo rostrventrolateral. 5. Composto 21. I. Colombari, Débora Simões de Almeida, orient. II. Sá, Jéssica Matheus de, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

“Aos meus pais e meus irmãos que com carinho e apoio não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida e mesmo distante não deixaram de me incentivar em todos os momentos delicados desta jornada.

Ao meu namorado, pelo seu amor incondicional, compreensão e paciência demonstrada em todos os momentos ao longo destes anos juntos.

Às minhas amigas, Aline, Ana Carolina, Dayane e Jéssica de Sá pelo companheirismo e lealdade ao longo do curso.

À Profa. Dra. Débora, pela orientação e suporte impecável durante todos os anos de iniciação científica, além da grande contribuição para o meu desenvolvimento durante o processo de formação profissional.

À todas as pessoas do Laboratório de Fisiologia, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

E ao Cnpq/PIBIC pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.”

RESUMO

O bulbo rostroventrolateral (RVL) é uma região importante na regulação da atividade nervosa simpática e da pressão arterial em ratos com hipertensão renovascular. Estudos anteriores demonstram que a infusão intracerebroventricular do agonista seletivo não-peptídico de receptores de angiotensina II do subtipo 2 (AT₂), Composto 21 (C21), reduz a pressão arterial média (PAM) em ratos normotensos. Sabe-se, que o bloqueio dos receptores de angiotensina II do subtipo 1 (AT₁) no RVL de ratos com hipertensão renovascular (2-rins-1-clipe; 2R1C) promove redução da pressão arterial média de aproximadamente 20 mmHg. Nesse trabalho investigamos se a microinjeção bilateral de C21 no bulbo RVL pode promover alterações cardiovasculares em ratos 2R1C, assim como os efeitos da microinjeção bilateral de losartan associado ao C21 no bulbo RVL em ratos com hipertensão 2R1C. Foram utilizados ratos Holtzman (peso inicial: 150-180 g) com clipe de prata ao redor da artéria renal esquerda para induzir a hipertensão 2R1C e ratos sham (normotensos), os quais foram submetidos ao mesmo procedimento, porém não foi inserido o clipe de prata ao redor da artéria renal. No primeiro protocolo, seis semanas depois da inserção do clipe de prata renal, foram implantadas cânulas de aço inoxidável bilateralmente no RVL, e após 7 dias, foram realizadas microinjeções bilaterais de C21 (100 µmol/200 nL) no RVL para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) durante 30 minutos com os animais em livre movimentação. No segundo protocolo, seis semanas após a inserção do clipe de prata renal, os animais foram anestesiados para inserção de cateter na veia e artéria femoral. Após 24 horas, os animais foram anestesiados com uretana (1,4 g/kg de peso corporal, intravenoso) para a microinjeção bilateral de losartan (1 nmol/200 nl) e após 15 min, de C21 (100 µmol/200 nl), no RVL. A PAP, a PAM e a FC foram

registradas antes e até 45 min após as injeções das drogas no RVL. A PAM dos animais com hipertensão 2R1C foi diminuída após a microinjeção bilateral do C21 no RVL em aproximadamente 20 mmHg (antes-C21: 169 ± 9 , vs. depois-C21: 152 ± 8 mmHg vs. basal; $p < 0,05$) enquanto a PAM nos ratos sham não foi alterada (antes-C21: 104 ± 3 , vs. depois-C21: 104 ± 3 mmHg). Em ratos 2R1C anestesiados (PAM: 200 ± 12 mmHg), losartan associado ao C21 promoveu redução total de 63 mmHg da PAM no final do registro. Em ratos normotensos, losartan ou C21 microinjetados no RVL não alteraram significativamente a PAM (PAM: 125 ± 5 mmHg). Em conclusão, nossos dados demonstram que a ativação dos receptores AT2 pelo agonista seletivo C21, microinjetado bilateralmente no RVL, é eficaz para reduzir a pressão arterial apenas em ratos com hipertensão 2R1C e o bloqueio de receptores AT1 pelo antagonista losartan associado a ativação dos receptores AT2 pelo agonista seletivo C21, produz efeitos maiores que o bloqueio de receptores AT1 ou a ativação de receptores AT2 isoladamente.

Palavras-chave: Receptor AT1, Receptor AT2, hipertensão renovascular, bulbo rostroventrolateral, Composto 21.

ABSTRACT

The rostral ventrolateral medulla (RVLM) is an important region in the regulation of sympathetic nerve activity and blood pressure regulation in rats with renovascular hypertension. Previous studies have demonstrated that intracerebroventricular infusion of angiotensin II type 2 (AT₂) receptor non-peptide selective agonist, Coumpound 21 (C21), reduces mean arterial pressure (MAP) in the normotensive rats. It is known that blockade of subtype 1 angiotensin II (AT₁) receptors in the RVLM of rats with renovascular hypertension (2-kidney-1-clip; 2K1C) promotes a decrease in mean arterial pressure of approximately 20 mmHg. In this study, we investigated whether the bilateral microinjection of C21 in the RVLM could promote cardiovascular changes in 2K1C rats and also the effects of bilateral microinjection of losartan associated with C21 in the RVLM in rats with 2K1C hypertension. Holtzman rats (initial weight: 150-180 g) with a silver clip around the left renal artery were used to induce 2K1C hypertension and sham rats (normotensive), which underwent the same procedure, but the silver clip was not inserted around the renal artery. In the first protocol, six weeks after insertion of the renal silver clip, stainless steel cannulas were implanted bilaterally in the RVLM and after 7 days, bilateral microinjections of C21 (100 µmol/200 nL) were performed in the RVLM to record the pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) for 30 minutes with the animals in free movement. In the second protocol, six weeks after insertion of the renal silver clip, the animals were anesthetized for catheter insertion in the femoral vein and artery. After 24 hours, the animals were anesthetized with urethane (1.4 g/kg of body weight, intravenous) for bilateral microinjection of losartan (1 nmol/200 nL) and after 15 min, C21 (100 µmol/200 nL) in the RVLM. PAP, MAP and HR were recorded before and up to 45 min after drug injections in the RVLM. The MAP of animals with 2K1C

hypertension decreased after bilateral microinjection of C21 in the RVLM by approximately 20 mmHg (before-C21: 169 ± 9 , vs. after-C21: 152 ± 8 mmHg vs. baseline; $p < 0.05$) while MAP in sham rats was not altered (before-C21: 104 ± 3 , vs. after-C21: 104 ± 3 mmHg). In anesthetized 2K1C rats (MAP: 200 ± 12 mmHg), losartan associated with C21 promoted a total reduction of 63 mmHg in MAP at the end of the record. In normotensive rats, losartan or C21 microinjected into the RVLM did not significantly alter MAP (MAP: 125 ± 5 mmHg). In conclusion our data show that the activation of AT2 receptors by the selective C21 agonist, microinjected bilaterally in the RVLM, is effective in reducing blood pressure only in rats with 2K1C hypertension and the blocking of AT1 receptors by the antagonist losartan associated with the activation of AT2 receptors by the selective agonist C21, produces effects greater than blocking AT1 receptors or activating AT2 receptors alone.

Keywords: AT1 receptor, AT2 receptor, renovascular hypertension, rostroventrolateral medulla, Compound 21.

LISTA DE FIGURAS E LEGENDAS

- Figura 1.** Ilustração dos principais componentes do Sistema Renina Angiotensina. (Adaptado de IWAI; HORIUCHI, 2009).
- Figura 2.** Alteração na pressão arterial média (PAM) após a microinjeção de C21 (C21; 100 µmol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos sham (n = 5). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Anova de uma via para medidas repetidas.
- Figura 3.** Alteração na pressão arterial média (PAM) após a microinjeção de C21 (C21; 100 µmol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos 2R1C (n = 5). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Anova de uma via para medidas repetidas. *diferente do tempo 0.
- Figura 4.** Alteração na frequência cardíaca (FC) após a microinjeção de C21 (C21; 100 µmol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos sham (n = 5). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Anova de uma via para medidas repetidas; p < 0,05 *diferente do tempo 0.
- Figura 5.** Alteração na frequência cardíaca (FC) após a microinjeção de C21 (C21; 100 µmol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos 2R1C (n = 5). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Anova de uma via para medidas repetidas.
- Figura 6.** Alteração na pressão arterial média (PAM) após a microinjeção de Los (1 nmol/200nL) e C21 (100 µmol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos sham (n = 7). Os resultados foram expressos como média ± EPM; análise de variância de uma via para medidas repetidas; p < 0,05; n = número de animais.
- Figura 7.** Alteração na pressão arterial média (PAM) após a microinjeção de Los (1 nmol/200nL) e C21 (C21; 100 µmol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos 2R1C (n = 6). Os resultados foram expressos como média ± EPM; análise de variância de uma via para medidas repetidas; p < 0,05; *diferente de basal (tempo 0); # diferente de losartan (tempo 15). n = número de animais.
- Figura 8.** Alteração na frequência cardíaca (FC) após a microinjeção de Los (1 nmol/200nL) e C21 (100 µmol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos sham (n = 7). Os resultados foram expressos como média ± EPM; análise de variância de uma via para medidas repetidas; p < 0,05; n = número de animais.
- Figura 9.** Alteração na frequência cardíaca (FC) após a microinjeção de Los (1 nmol/200 nL) e C21 (C21; 100 µmol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos 2R1C (n = 6). Os resultados foram expressos como média ± EPM; análise de variância de uma via para medidas repetidas; p < 0,05; *diferente de basal (tempo 0). n = número de animais.
- Figura 10.** Fotomicrografia representativa do grupo mostrando a microinjeção no RVL no painel à direita e o esquema retirado do Atlas de Paxinos e Watson (1986) à esquerda mostrando a localização anatômica do RVL. RVL = bulbo rostroventrolateral; NA = núcleo ambíguo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pressão arterial média (PAM) basal, frequência cardíaca (FC) basal e peso dos rins de ratos 2R1C e sham.

Tabela 2. Peso dos rins de ratos 2R1C e sham.

Tabela 3. Pressão arterial média (PAM) basal e frequência cardíaca (FC) basal antes e após anestesia em ratos 2R1C e sham.

LISTA DE ABREVIATURAS

2R1C	2-rins 1-clipe
ANG I	angiotensina I
ANG II	angiotensina II
ARAT1	antagonista de receptor de angiotensina II do subtipo 1
AT1	receptor de angiotensina II do subtipo 1
AT2	receptor de angiotensina II do subtipo 2
bpm	batimentos por minuto
C21	Composto 21
ECA	enzima conversora de angiotensina
FC	frequência cardíaca
Glu	glutamato
IC	insuficiência cardíaca
IECA	inibidores da enzima conversora de angiotensina
Los	losartan
mmHg	milímetros de mercúrio
PAM	pressão arterial média
PAP	pressão arterial pulsátil
RVL	bulbo rostroventrolateral
SNC	sistema nervoso central
SRA	sistema renina-angiotensina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 <i>Hipertensão</i>	11
1.2 <i>Hipertensão e sistema renina-angiotensina</i>	12
1.3 <i>Controle central da pressão arterial</i>	14
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 <i>Animais</i>	18
3.2 <i>Cirurgia para desenvolvimento da hipertensão 2R1C.....</i>	18
3.3 <i>Registro da pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda</i>	19
3.4 <i>Procedimento experimental em animais não anestesiados</i>	19
3.5 <i>Procedimento experimental para animais anestesiados.....</i>	20
3.6 <i>Drogas</i>	22
3.7 <i>Eutanásia e Análise histológica.....</i>	22
3.8 <i>Apresentação dos resultados e análise estatística</i>	23
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	23
4.1 <i>Ratos não anestesiados.....</i>	23

4.2 Ratos anestesiados.....	23
5. RESULTADOS.....	25
5.1 Ratos não anestesiados	25
5.1.1 Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) e relação rim esquerdo/rim direito em ratos com hipertensão renovascular e sham	25
5.1.2 Efeitos do C21 injetado bilateralmente no RVL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos sham - normotensos.....	26
5.1.3 Efeitos do C21 injetado bilateralmente no RVL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos 2R1C.	28
5.2 Ratos anestesiados.....	30
5.2.1 Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) e relação rim esquerdo/rim direito em ratos com hipertensão renovascular e sham.	30
5.2.2 Efeitos do losartan associado ao C21 injetado bilateralmente no RVL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos sham – normotensos anestesiados.	32
5.2.3 Efeitos do C21 associado ao Losartan injetado bilateralmente no RVL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos 2R1C.....	35
5.3 Análise histológica da região RVL	38
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão

A hipertensão ou pressão arterial alta é uma condição em que as paredes dos vasos sanguíneos sofrem uma pressão com força excessiva persistentemente (WHO, 2019). É apontada como principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças coronarianas, aumenta o risco de infarto e de insuficiência cardíaca congestiva, as quais podem causar sérios danos à saúde do indivíduo. Dados do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), mostrou que a prevalência da hipertensão arterial passou de 22,6% em 2006 para 24,3% em 2019 (SAÚDE, 2019).

A hipertensão é definida como o aumento crônico nos valores da pressão arterial média, quando bem estabelecida o valor da pressão arterial sistólica é maior ou igual a 140 mmHg e o valor da pressão arterial diastólica é maior ou igual a 90 mmHg (WHO, 2019). Os possíveis mecanismos para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão são discutidos por duas linhas científicas diferentes. Em primeiro lugar, há a clássica linha “Guytoniana”, a qual acredita que alterações na função renal aciona o gatilho para a hipertensão. A segunda linha sustenta que alterações na função de áreas do sistema nervoso central (SNC) levam a uma disfunção da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) resultando na hipertensão “neurogênica”. Do ponto de vista epidemiológico, a maioria dos indivíduos com hipertensão têm hipertensão essencial ou primária (90% dos casos), que se acredita resultar de uma predisposição genética associado aos efeitos cumulativos de vários fatores associados ao estilo de vida ao longo dos anos e sem uma única causa subjacente identificada (PADMANABHAN et al., 2015). A hipertensão secundária (10% dos casos) inclui formas monogênicas de hipertensão, tais como aldosteronismo

primário, feocitocroma e esteanose renal e doenças que podem levar a hipertensão, tais como a obesidade e doença renal crônica (PADMANABHAN et al., 2015).

1.2 Hipertensão e sistema renina-angiotensina

A hipertensão renovascular é um tipo de hipertensão secundária, e que experimentalmente foi desenvolvido por Goldblatt em 1934 (GOLDBLATT et al., 1934). Este modelo consiste na oclusão parcial de uma das artérias renais por um clipe de prata enquanto o outro rim permanece intacto, sendo denominada de hipertensão renovascular é o chamado 2-rins 1-clipe (2R1C) (GOLDBLATT et al., 1934). A constrição parcial da artéria renal leva à uma menor perfusão sanguínea para o rim, e conseqüentemente aumento da renina circulante provocando assim a exacerbação da atividade do sistema renina-angiotensina (SRA) periférico e no sistema nervoso central (SNC), aumento da atividade simpática e uma redução do barorreflexo (BARBOSA et al., 2017; BERENQUER et al., 1991; BLANCH et al., 2014; LEENEN; DE, 1975; LINCEVICIUS et al., 2015; OLIVEIRA-SALES et al., 2016). A hipertensão 2R1C é um dos modelos experimentais mais estudados, pois possibilita a investigação dos mecanismos que envolvem a gênese e a manutenção da hipertensão uma vez que apresenta similaridades com a hipertensão renovascular em humanos que corresponde a aproximadamente 5-6% das hipertensões em idosos (HANSEN et al., 2002). Diante disso, entender os mecanismos fundamentais que provocam alterações na atividade simpática e no barorreflexo é de grande relevância, uma vez que colabora para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que reduzem a pressão arterial em modelos animais com hipertensão neurogênica e também em indivíduos hipertensos.

Nesse sentido, o SRA tem sido muito estudado há algumas décadas, sua existência e relevância funcional é reconhecido por desempenhar um papel fundamental no sistema cardiovascular e por isso é alvo significativo de drogas para terapia anti-hipertensiva. A cascata de eventos do SRA começa com o aumento da secreção de renina pelo rim, uma enzima que age sobre a proteína plasmática angiotensinogênio produzida pelo fígado, levando a formação do decapeptídeo angiotensina I (ANG I) que após alguns segundos de sua formação sofrerá ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), situada no endotélio vascular pulmonar, para a produção do octapeptídeo angiotensina II (ANG II) (UNGER, 2002). O principal peptídeo formado nesta via, a ANG II pode ativar dois receptores principais, o receptor de ANG II do subtipo 1 (AT1) e também o receptor de ANG II do subtipo 2 (AT2) (DE GASPARO et al., 2000).

O receptor AT1 é o mais amplamente estudado e confere ações predominantes da ANG II como a vasoconstrição periférica, reabsorção de sódio e secreção de aldosterona (UNGER, 2002). No SNC, a ANG II atuando nos receptores AT1 em diferentes áreas no SNC, promove aumento da atividade simpática, prejuízo do barorreflexo e secreção de vasopressina [revisão em (PHILLIPS, 1987; UNGER, 2002), o que contribui para a manutenção da hipertensão em ratos 2R1C, bem como em humanos com hipertensão renovascular (PETERSSON et al., 2002; RONCARI et al., 2018; TSYRLIN et al., 2013). Por outro lado, ainda não é totalmente descrita a função dos receptores AT2, porém estudos, inclusive de nosso laboratório, mostram que a ativação de receptores AT2 em diferentes áreas do SNC promove efeitos antagônicos que se opõem aos de ativação dos receptores AT1, ou seja, reduz a atividade simpática, diminui a pressão arterial e melhora da função do barorreflexo em ratos hipertensos (BLANCH et al., 2014; RUCHAYA et al., 2016; STECKELINGS et

al., 2017). Portanto, sugere-se que os receptores AT2 por exercer efeitos anti-hipertensivos pode ser uma via interessante para contribuir em distúrbios cardiovasculares. (Figura 1).

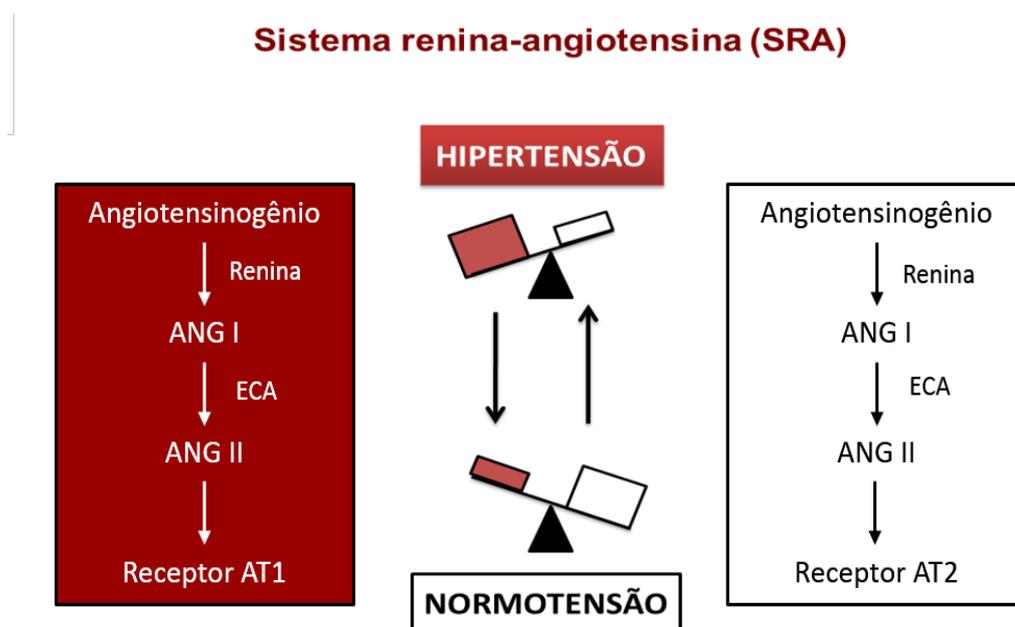


Figura 1. Ilustração dos principais componentes do Sistema Renina Angiotensina. (Adaptado de IWAI; HORIUCHI, 2009).

1.3 Controle central da pressão arterial

Está bem estabelecido há algumas décadas que a hipertensão está associada ao aumento da atividade simpática e que as estruturas bulbares e hipotalâmicas regulam o tônus vasomotor (BLANCH et al., 2014; COLOMBARI et al., 2011; DAMPNEY, 1994; GUYENET, 2006; URZEDO-RODRIGUES et al., 2011). Entre as estruturas bulbares importantes podemos citar o bulbo rostroventrolateral (RVL), a qual é uma região chave para o controle cardiovascular. Localizado na região rostral do bulbo, imediatamente caudal ao núcleo do nervo facial, o RVL é fundamental para

o controle cardiovascular uma vez que abriga os principais neurônios pré-motores bulbo-espinhais que inervam os neurônios pré-ganglionares simpáticos na coluna intermédio lateral da medula espinhal (DAMPNEY, 1994; FELDBERG; GUERTZENSTEIN, 1986; GUERTZENSTEIN; SILVER, 1974; GUYENET, 2006).

Em animais 2R1C, há evidências que o bloqueio ganglionar ou a inibição do RVL leva a normalização e maior redução da pressão arterial quando comparado aos animais controle, indicando mais uma vez que a simpatoexcitação é um fator importante para a manutenção da hipertensão renovascular induzida (BERGAMASCHI et al., 1995). De fato, o RVL tem como função intermediar respostas simpatoexcitatórias pois recebe projeções neuronais de diferentes núcleos do encéfalo e assim é capaz também de enviar estas respostas à muitas outras regiões, relacionadas a doenças cardiovasculares (GUYENET, 2006). Diversos estudos apontam que o RVL contém uma elevada densidade de receptores AT1 quando comparado à densidade de receptores AT2, e que um dos principais mecanismos envolvidos na manutenção da hiperatividade simpática em animais com hipertensão 2R1C está associado à um aumento da atividade de neurônios do RVL desencadeado pela ANG II devido à maior expressão de receptores AT1 nesta região (ALLEN et al., 1987; CARVALHO et al., 2003; DE OLIVEIRA-SALES et al., 2010).

Sabe-se que o SRA é um alvo eficaz para o tratamento de indivíduos com hipertensão e que as estratégias terapêuticas mais utilizadas para o controle da pressão arterial são por meio de inibidores da ECA, como por exemplo o captopril e antagonistas de receptores AT1, como por exemplo o losartan. Dentre as diferenças entre estas classes terapêuticas podemos pontuar como vantagem, a seletividade aumentada dos antagonistas de receptores AT1, que representa uma forma mais específica de bloquear o SRA, melhorando sua eficácia e tolerabilidade por reduzir os

efeitos colaterais. Documentado há muitos anos como uma droga segura, o losartan é o primeiro fármaco não peptídeo, oralmente ativo, desenhado para competir seletivamente com a ligação da ANG II ao receptor AT1 (BURNIER; BRUNNER, 1998). Oliveira-Sales et al. (DE OLIVEIRA-SALES et al., 2010) demonstraram que o bloqueio específico e seletivo de receptores AT1 com o losartan no RVL promove redução da pressão arterial em aproximadamente 20 mmHg em ratos com hipertensão 2R1C, mas não em animais normotensos.

Por outro lado, há evidências que os receptores AT2 possuem importante função fisiológica apenas no desenvolvimento e crescimento dos animais, devido à observação de níveis elevados desses receptores no feto, e posterior regressão dos níveis dessa proteína após o nascimento (TSUTSUMI et al., 1993), embora alguns estudos mais recentes tenham também demonstrado expressão de receptores AT2 em encéfalos de ratos adultos (YU et al., 2010). Mais recentemente foi demonstrado que a superexpressão de receptores AT2, por meio de transdução viral, na região RVL de ratos normotensos, induz uma redução na pressão arterial (GAO et al., 2008). Dados do nosso laboratório também mostraram efeitos específicos e benéficos dos receptores AT2 no núcleo do trato solitário, região dorsal do bulbo que está envolvido com a regulação cardiovascular (BLANCH et al., 2014).

Neste contexto, o Composto 21 (C21) é descrito como o primeiro agonista não peptídeo oralmente ativo responsável por impulsionar as investigações sobre o enigmático receptor AT2. O C21 é um agonista altamente seletivo e permite a estimulação de receptores AT2 *in vivo* e *in vitro* sem afetar os receptores AT1 (BOSNYAK et al., 2011; UNGER; DAHLOF, 2010; WAN et al., 2004). Foi demonstrado que em animais com ligadura coronária para induzir a insuficiência cardíaca, a ativação de receptores AT2 no prosencéfalo através da infusão de C21

intracerebroventricular, suprime o nível aumentado da atividade nervosa simpática, melhorando a sensibilidade barorreflexa que pode proporcionar benefício importante para esta patologia cardíaca (GAO et al., 2014) e promove efeito hipotensor quando injetado perifericamente em ratos espontaneamente hipertensos, que são ratos um modelo animal de hipertensão primária (BOSNYAK et al., 2010).

Além de seus efeitos isolados, tem sido sugerido que a associação da ativação dos receptores AT2 com o bloqueio de receptores AT1 possa ter um efeito sinérgico na regulação da pressão arterial em animais hipertensos (BOSNYAK et al., 2010). Assim, nossa primeira hipótese é de que o C21 isoladamente, ao estimular receptores AT2 em animais com hipertensão renovascular poderia promover alterações cardiovasculares benéficas. Em seguida investigamos se a ativação de receptores AT2 em animais 2R1C associada com o antagonismo de receptores AT1 poderia provocar reduções da pressão arterial mais efetivas do que cada um isoladamente.

2. OBJETIVOS

Verificar o efeito da ativação de receptores AT2 isoladamente através da microinjeção bilateral de C21 e a ativação de receptores AT2 por meio da microinjeção bilateral de C21 associada ao bloqueio dos receptores AT1 com o losartan no bulbo RVL de animais 2R1C sobre a resposta pressora.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Holtzman jovens (150-180 g) fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia e Farmácia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Araraquara. Os animais foram mantidos com água e ração granulada *ad libitum* em gaiolas individuais, e ambiente com temperatura e umidade controlados e ciclo claro/escuro de 12:12 horas. A Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista aprovou todos os protocolos experimentais utilizados (Proc. CEUA 07/2011, Proc. CEUA 14/2017).

3.2 Cirurgia para desenvolvimento da hipertensão 2R1C

Para todas as cirurgias, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal (pc)) combinada com xilazina (7 mg/kg de pc); a seguir, foram posicionados em uma mesa cirúrgica e foi feita uma laparotomia para exposição do rim esquerdo. A artéria renal foi então cuidadosamente limpa e isolada para a colocação de um clipe de prata, que ocluiu parcialmente a artéria (diâmetro interno de 0,2 mm, padronizado pelo peso no animal). Nos ratos sham (ratos normotensos com cirurgia fictícia), o mesmo procedimento cirúrgico foi feito, exceto a inserção do clipe de prata. A incisão foi suturada e imediatamente após a cirurgia, os ratos receberam uma injeção intramuscular de antibiótico (benzilpenicilina – 80.000 UIs e estreptomicina – 33 mg, 0,1 ml/rato) e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,03 ml/rato), bem como 1 ml de salina estéril subcutânea para facilitar a rehidratação pós-cirúrgica. A hipertensão 2R1C atinge seu platô com 4-6 semanas, sendo mantida nesta fase por um aumento na atividade do

sistema nervoso simpático e por altos níveis de ANG II (DE OLIVEIRA-SALES et al., 2010; RONCARI et al., 2018).

3.3 Registro da pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda

A pressão arterial da cauda foi medida em ratos conscientes pela utilização de um sistema não invasivo de registro de pressão pela cauda (modelo MRBP-R01, IITC, USA). Esta medida foi realizada na 4ª semana após a cirurgia para desenvolvimento da hipertensão 2R1C para assim, avaliar o sucesso da mesma e se os animais poderiam seguir as próximas etapas experimentais. Antes das medições, os ratos foram aquecidos durante 5 minutos a 28 °C, a fim de permitir a detecção das pulsações arteriais da cauda e para atingir um nível estável de impulsos. Animais com pressão sistólica acima de 140 mmHg seguiram para as próximas etapas, os demais já eram eutanasiados.

3.4 Procedimento experimental em animais não anestesiados

Após 6 semanas da cirurgia 2R1C ou sham, os animais utilizados acordados para experimento foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). Após a incisão longitudinal da pele e do tecido subcutâneo da cabeça, o periósteo foi afastado, as suturas de bregma e lambda foram expostas, e serviram como referência para nivelamento da cabeça do animal. Determinado o ponto de introdução da cânula de aço inoxidável (15 x 0,7 mm d.i.), foi executada a trepanação da abóbada com auxílio de uma broca esférica. Através desse orifício, a cânula foi introduzida baseada nos parâmetros estereotáxicos do Atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1986), a saber: AP = 4,6 mm caudal à sutura lambdóide; L= 1,8 mm lateral à sutura lambdoide e V = 6,5 mm abaixo da superfície do osso. As cânulas bilaterais foram fixadas nas cabeças dos ratos com parafusos e resina acrílica

e uma dose profilática de penicilina (50.000 UI, intramuscularmente) e uma dose de anti-inflamatório (cetoprofeno 1%, 0,1 ml/rato, subcutaneamente) foram administradas.

Após um período de recuperação de 5 a 7 dias do implante de cânulas no RVL os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) para a canulação da artéria femoral para o registro da pressão arterial. A cânula consiste em tubos de polietileno PE-10 soldados a tubos de polietileno PE-50. No final da canulação da artéria, a cânula foi exteriorizada e suturada na pele do dorso do animal. No dia seguinte, a cânula da artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão (Stathan Gould) e acoplado a um amplificador (ETH-200, CB SCIENCES INC) e a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments). A PAP, PAM e FC foram registradas simultaneamente. A PAM foi calculada a partir do sinal de PAP. A FC foi calculada como a frequência instantânea do sinal de PAP.

As injeções na região RVL foram feitas com seringa de microlitro Hamilton (0,5 µl), conectada a uma cânula injetora de aço inoxidável com 18 mm de comprimento (3 mm a mais que a cânula guia implantada no RVL), através de um tubo de polietileno (PE-10). O volume injetado do C21 foi de 200 nL em cada lado (injeções bilaterais).

3.5 Procedimento experimental para animais anestesiados

Seis semanas após a cirurgia de desenvolvimento da hipertensão 2R1C, os animais foram anestesiados como descrito acima e um tubo de polietileno (PE-10 ligado a PE-50, Clay Adams, Parsippany, EUA) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral, e em seguida outro cateter foi inserido na veia femoral. As cânulas foram passadas subcutaneamente, exteriorizadas e suturadas no dorso do animal.

No dia seguinte a canulação da artéria e veia femorais, os animais foram conectados a um transdutor de pressão Stathan Gould (P23 Db) (Stathan Gould, Cleveland, EUA) acoplado a um pré-amplificador ETH-200 (Bridge Bio-Amplifier, CBSciences Inc., Dover, EUA), conectado a um sistema de aquisição de dados de computador Powerlab (modelo Powerlab 16SP, ADInstruments, Castle Hill, Austrália), para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP). A PAM e a FC foram derivadas do sinal da PAP. Foi realizado um registro controle de 20 min em animais não-anestesiados, em seguida os animais foram anestesiados com uretana (1,2-1,4 g/kg de peso corporal, iv). A uretana é uma anestesia geral e terminal (COLOMBARI; CRAVO, 1999; COLOMBARI et al., 2000; MAGGI; MELI, 1986), ou seja, não há recuperação do animal após a cirurgia. O grau anestésico do animal foi avaliado pela ausência do reflexo de retirada pelo pinçamento da pata. A partir desse momento, os animais foram colocados sobre uma manta térmica e a temperatura corporal é monitorada por meio de um termômetro retal e mantida entre 36-37 °C. A seguir, uma cânula foi inserida na traquéia para auxiliar a ventilação. Os animais anestesiados foram posicionados em um aparelho estereotático (modelo Kopf 900). Após a incisão longitudinal da pele e do tecido subcutâneo da cabeça, o perióstio foi afastado, as suturas de bregma e lambda foram expostas, e serviram como referência para nivelamento da cabeça do animal. Determinado o ponto de introdução da injetora de aço inoxidável (15 x 0,7 mm d.i.), foi executada a trepanação da abóbada com auxílio de uma broca esférica. Através desse orifício, as injetoras, presas por um suporte foram introduzidas bilateralmente com base nos parâmetros estereotáticos do Atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1986), a saber: AP = 4,2 mm caudal à sutura lambdóide; L = 1,8 mm lateral à sutura lambdoide e V = 8,0 mm abaixo da superfície do osso. As injeções das drogas foram feitas no RVL com uma seringa de

microlitro Hamilton (5 μ l), conectada a uma cânula injetora de aço inoxidável com 18 mm de comprimento, através de um tubo de polietileno (PE-10). O volume injetado de drogas foi de 200 nL em cada lado (injeções bilaterais).

3.6 Drogas

As drogas utilizadas foram:

- Glutamato (1 nmol/200 nL; Sigma, EUA);
- Composto 21 (C21; 100 μ mol/200 nL, Vicore Pharma, Suécia), agonista de receptores AT2, gentilmente cedido pelo nosso colaborador, Dr. Colin Summers, da Universidade da Florida;
- Losartan (1 nmol/200 nL, Sigma, EUA), antagonista de receptores AT1.

Toda as drogas foram dissolvidas em salina (NaCl 0,15 M).

3.7 Eutanásia e Análise histológica

Terminados os registros da PAM e FC, os animais utilizados não anestesiados nos experimentos receberam anestesia profunda (tiopental sódico; 70 mg/kg de peso corporal; intraperitoneal) para que, assim como os animais anestesiados, receberem injeções de corante (azul de Evans a 2%) no RVL no mesmo volume utilizado para a droga. Em seguida, os rins foram removidos para confirmar a atrofia do rim clipado e a hipertrofia do rim contralateral, que é um índice da hipertensão 2R1C (BLANCH et al., 2014). A seguir, o coração dos animais foi exposto cirurgicamente e foi realizada perfusão de 50 mL de solução de formalina 10%. Os encéfalos foram retirados e mergulhados no mesmo agente fixador por pelo menos 72 h. Posteriormente, utilizando um micrótomo de congelamento (Leica SM 2000 R) cortes coronais de 40 μ m do bulbo foram feitos, montados em lâminas e corados pela técnica de Nissl e

Giemsa para posterior análise no microscópio óptico dos sítios de injeção na região RVL.

3.8 Apresentação dos resultados e análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm EPM e através do Software SigmaPlot foi realizada uma análise de variância de uma via para medidas repetidas, associadas ao teste de Student-Newman-Keuls ou teste *t* de Student, conforme o indicado. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1 Ratos não anestesiados

- *Efeitos da microinjeção bilateral do Composto 21 (agonista AT₂; 100 μ mol/200 nL) na região RVL sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca em ratos sham ou com hipertensão renovascular 2R1C não anestesiados e com livre movimentação.*

Após 20 min de registro basal da PAM e FC, foi realizada uma injeção bilateral de C21 no RVL e a PAM e FC foram registrados por 30 min adicionais.

4.2 Ratos anestesiados

O projeto inicial previa a realização de protocolos experimentais em ratos não-anestesiados, os quais tiveram que ser interrompidos pela grande perda de animais após o implante de cânulas no RVL. Como a cânula-guia transpassa o núcleo vestibular, que é um dos responsáveis para a estabilização motora do animal, alguns animais desenvolviam uma instabilidade motora muito grande e tiveram que ser sacrificados. Nesse sentido, para minimizar a perda de animais, conforme preconiza

o CONCEA, solicitamos autorização ao CEUA (14/2017) para a realização dos mesmos experimentos em ratos anestesiados, os quais foram integralmente realizados.

- *Efeitos das microinjeções bilaterais no RVL de composto 21 (agonista AT₂; 100 μmol/200 nL) associado ao losartan (antagonista de receptores AT₁) sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca em ratos sham ou com hipertensão 2R1C anestesiados.*

No dia do experimento, após 20 min de registro basal da PAM e FC em animais acordados, para aferir a PAM e FC em animais sem o efeito da anestesia, foi realizada a anestesia com uretana iv, e cirurgias descritas (traqueostomia, introdução de agulha injetora no RVL). Foi realizada inicialmente uma injeção bilateral de glutamato (1nmol/200nL), a fim de se verificar o aumento da PAM (característico do correto posicionamento da injetora no RVL), após 5-10 min, losartan (1nmol/200nL) foi injetado bilateralmente e após 15 min foi injetado C21 (100 μmol/200 nl) também bilateralmente, e as variáveis cardiovasculares foram registradas por mais 30 min.

5. RESULTADOS

5.1 Ratos não anestesiados

5.1.1 Valores basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e relação rim esquerdo/rim direito em ratos com hipertensão renovascular e sham

Na Tabela 1 podemos observar que os ratos 2R1C tiveram um aumento significativo da PAM basal registrada após 7 semanas da clipagem. Não houve diferença significativa na FC basal. Houve também uma redução da razão rim esquerdo/rim direito nos ratos 2R1C, que é também utilizado como outro índice de sucesso da cirurgia (SMITH; BISHOP, 1986).

Tabela 1. Pressão arterial média (PAM) basal, frequência cardíaca (FC) basal e peso dos rins de ratos 2R1C e sham.

Grupo	Número de animais	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Rim esquerdo/rim direito (g)
sham	5	104 ± 3	346 ± 12	0,71 ± 0,1
2R1C	5	169 ± 9*	336 ± 15	1,0 ± 0,02

Os resultados foram expressos como média ± EPM. * Diferente de sham; teste *t* de Student; $p < 0,05$; n = número de animais.

5.1.2 Efeitos do C21 injetado bilateralmente no RVL sobre a pressão arterial média (PAM) em ratos sham – normotensos e 2R1C.

Na Figura 2 podemos observar que a PAM não sofreu alteração após a microinjeção bilateral de C21 no RVL no ratos sham-normotensos (pré-C21: 104 ± 3 , vs. 30 min pós-C21: 104 ± 3 mmHg) [$F(6,24) = 0,830$; $p > 0,05$]. Porém na Figura 3 podemos observar que a PAM foi significativamente reduzida após a microinjeção bilateral de C21 no RVL (pré-C21: 169 ± 9 , vs. 30 min pós-C21: 152 ± 8 mmHg), [$F(6,24) = 9,593$; $p < 0,05$].

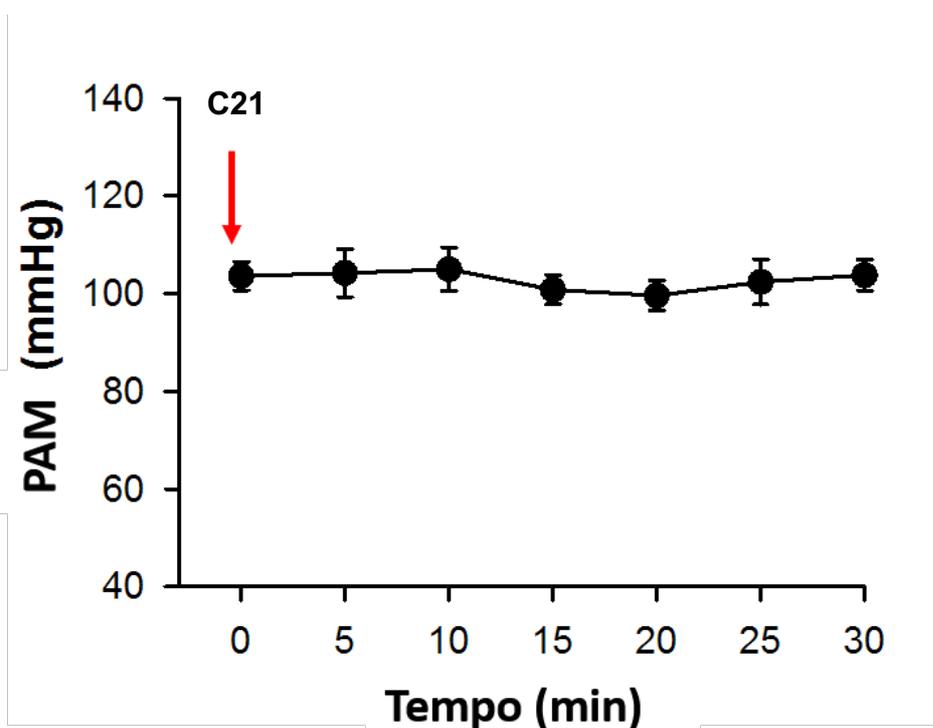


Figura 2. Alteração na pressão arterial média (PAM) após a microinjeção de C21 (C21; 100 μ mol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos sham ($n = 5$). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Anova de uma via para medidas repetidas.

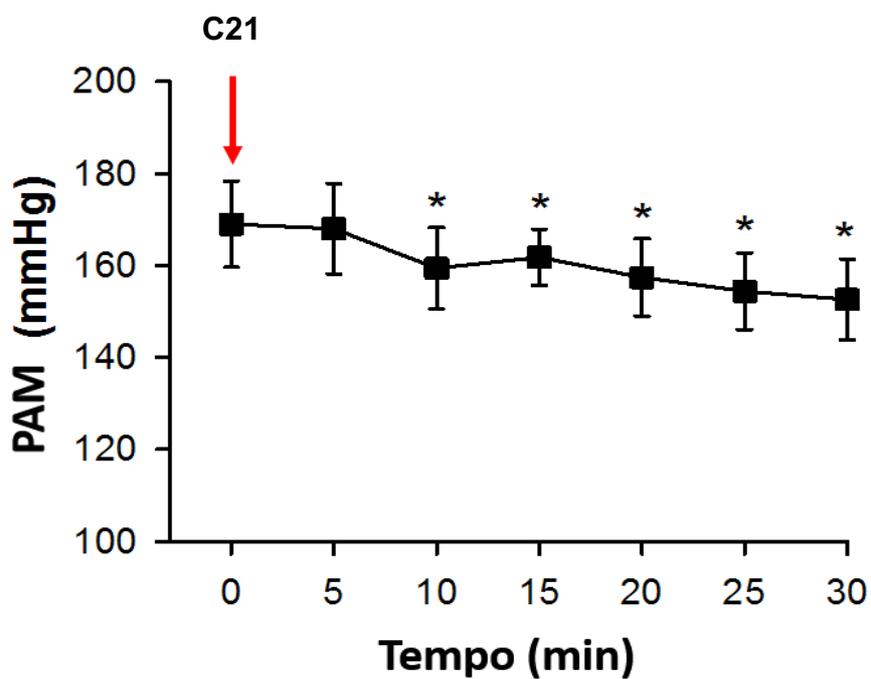


Figura 3. Alteração na pressão arterial média (PAM) após a microinjeção de C21 (C21; 100 μ mol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos 2R1C (n = 5). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Anova de uma via para medidas repetidas. *diferente do tempo 0.

5.1.3 Efeitos do C21 injetado bilateralmente no RVL sobre frequência cardíaca (FC) em ratos sham – normotensos e 2R1C.

Na figura 4, observamos que houve uma redução transitória na FC dos animais sham (346 ± 12 , vs. 303 ± 11 bpm, aos 20 min), e no final dos 30 min a já havia retornado próximo aos níveis iniciais (332 ± 12 bpm) [$F(6,24) = 2,934$; $p < 0,05$]. Já a FC dos ratos 2R1C apresentou apenas uma tendência à redução (pré-C21: 336 ± 15 , vs. 30 min pós-C21: 300 ± 5 bpm), [$F(6,24) = 1,723$; $p > 0,05$], Figura 5.

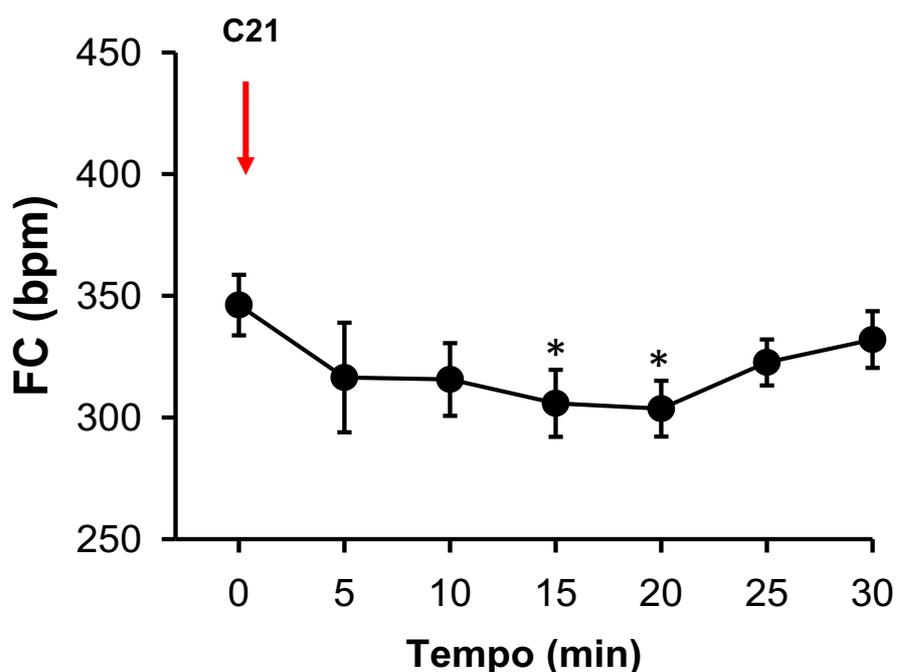


Figura 4. Alteração na frequência cardíaca (FC) após a microinjeção de C21 (C21; $100 \mu\text{mol}/200 \text{ nL}$) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos sham ($n = 5$). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Anova de uma via para medidas repetidas; $p < 0,05$ *diferente do tempo 0.

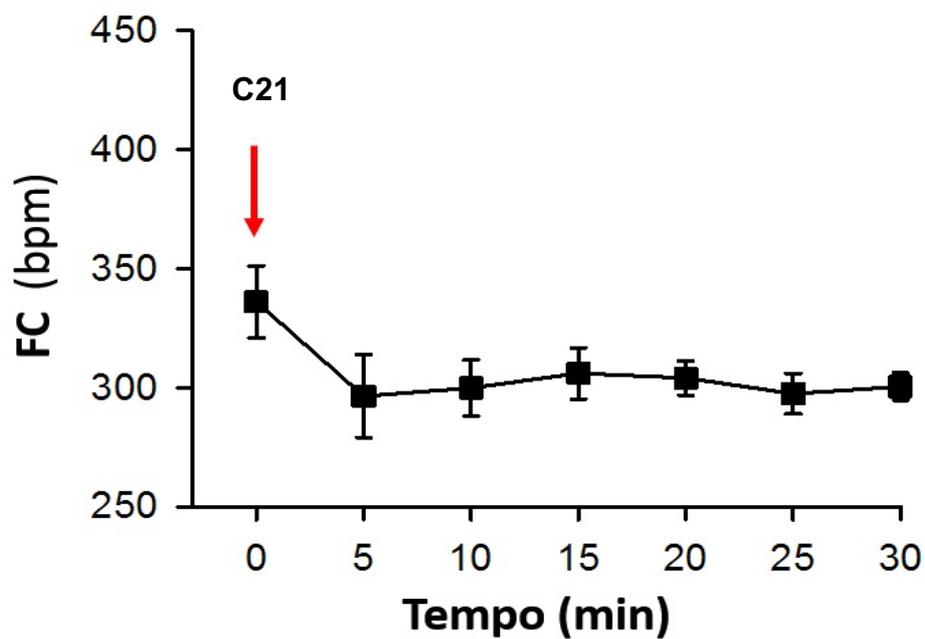


Figura 5. Alteração na frequência cardíaca (FC) após a microinjeção de C21 (C21; 100 μ mol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos 2R1C (n = 5). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Anova de uma via para medidas repetidas.

5.2 Ratos anestesiados

5.2.1 Valores basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e relação rim esquerdo/rim direito em ratos com hipertensão renovascular e sham.

Podemos observar que houve uma redução da razão rim esquerdo/rim direito nos ratos 2R1C (Tabela 2), que é também utilizado como índice de sucesso da cirurgia (Smith e Bishop, 1986). Os ratos 2R1C tiveram um aumento significativo da PAM basal registrada após 6 semanas da clipagem e a anestesia não modificou essas diferenças (Tabela 3). A anestesia causou um discreto aumento da PAM em ratos Sham e na FC de ratos 2R1C (Tabela 3). Após a anestesia a FC basal dos ratos 2R1C foi maior do que dos ratos Sham.

Tabela 2. Peso dos rins de ratos 2R1C e sham.

Grupo	n	Rim
		esquerdo/rim direito (g)
sham	7	1,0 ± 0,03
2R1C	6	0,62 ± 0,05*

Os resultados foram expressos como média ± EPM; * diferente de sham; teste *t* de Student; $p < 0,05$; n = número de animais.

Tabela 3. Pressão arterial média (PAM) basal e frequência cardíaca (FC) basal antes e após anestesia em ratos 2R1C e sham.

Grupo	n	PAM	FC	PAM	FC
		(mmHg)	(bpm)	(mmHg)	(bpm)
Experimental		antes	antes	após	após
sham	7	104 ± 1	344 ± 13	125 ± 5#	330 ± 17
2R1C	6	184 ± 8*	386 ± 27	200 ± 12*	472 ± 15*#

Os resultados foram expressos como média ± EPM; * diferente de sham; # diferente de antes de anestesia, análise de variância de duas vias; $p < 0,05$; n = número de animais.

5.2.2 Efeito do losartan associado ao C21 injetados bilateralmente no RVL sobre a pressão arterial média (PAM) em ratos sham – normotensos e 2R1C anestesiados.

Na Figura 6 podemos observar que em ratos sham a PAM não sofreu alteração após a microinjeção bilateral de losartan ou C21 no RVL de ratos sham (pré-los: 125 ± 5 mmHg, vs. 15 min pós-los: 124 ± 3 mmHg) [$F(6,54) = 1,387$; $p > 0,05$]. A microinjeção de C21 15 min após o losartan, também não alterou a PAM de ratos normotensos até o final do período experimental (121 ± 5 mmHg; 45 min após losartan, $p > 0,05$ vs basal). Porém na Figura 7 podemos observar que a PAM foi significativamente reduzida após a microinjeção bilateral de losartan no RVL (tempo 0, pré-los: 200 ± 12 mmHg, vs. 15 min pós-losartan: 170 ± 16 mmHg, $p < 0,05$), e sofreu queda adicional após a microinjeção de C21 no RVL (137 ± 18 mmHg; 45 min após losartan, $p < 0,05$ vs basal) [$F(5,45) = 21,762$; $p < 0,05$].

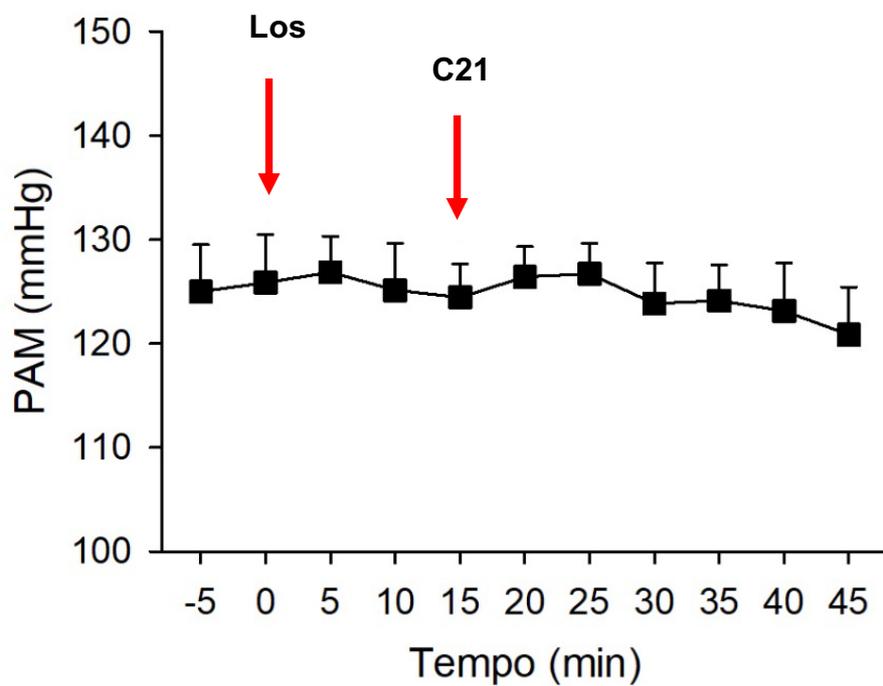


Figura 6. Alteração na pressão arterial média (PAM) após a microinjeção de Los (1 nmol/200nL) e C21 (100 μ mol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos sham (n = 7). Os resultados foram expressos como média \pm EPM; análise de variância de uma via para medidas repetidas; $p < 0,05$; n = número de animais.

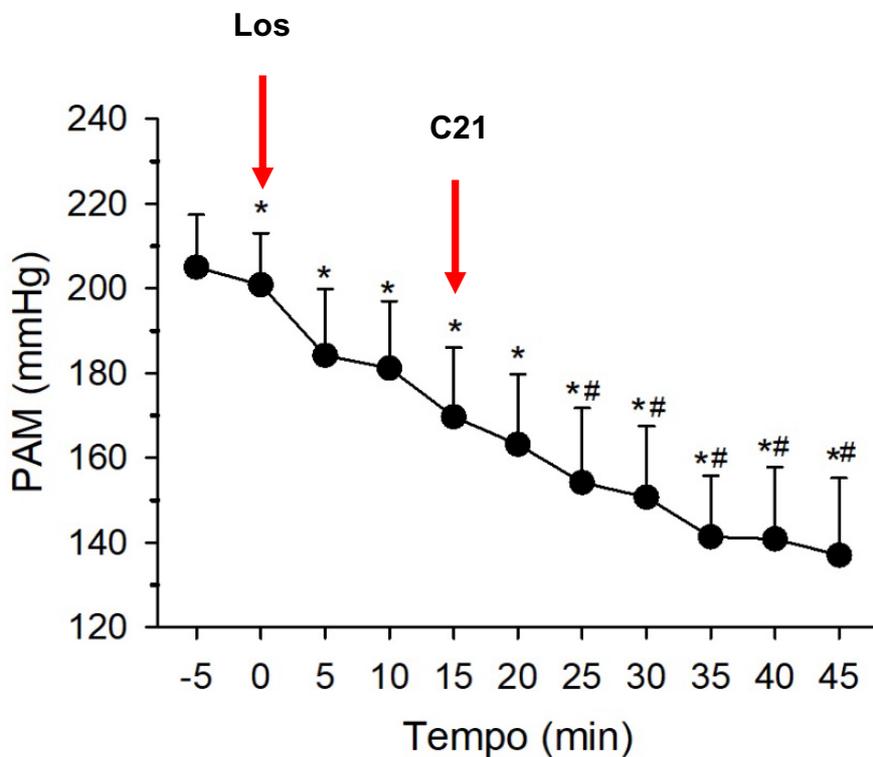


Figura 7. Alteração na pressão arterial média (PAM) após a microinjeção de Los (1 nmol/200nL) e C21 (C21; 100 μ mol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos 2R1C (n = 6). Os resultados foram expressos como média \pm EPM; análise de variância de uma via para medidas repetidas; $p < 0,05$; *diferente de basal (tempo 0); # diferente de losartan (tempo 15). n = número de animais.

5.2.3 Efeito do losartan associado ao C21 injetados bilateralmente no RVL sobre a frequência cardíaca (FC) em ratos sham – normotensos e 2R1C anestesiados.

Na Figura 8 podemos observar que não houve alterações significativas na FC após a microinjeção de losartan (pré-los: 330 ± 16 bpm, vs. 15 min pós-los: 344 ± 15 bpm) [$F(6,54) = 1,136$; $p > 0,05$] tampouco após o C21 no RVL de ratos sham até o final do período experimental (348 ± 12 bpm; 45 min após losartan, $p > 0,05$, vs basal). Já a FC dos ratos 2R1C apresentou uma queda mais lenta, embora houvesse uma tendência de queda com o losartan, esta não foi significativa 15 min após a microinjeção ($p = 0,07$), Figura 9. Porém, após a microinjeção de C21, a FC dos ratos 2R1C reduziu de maneira significativa (400 ± 13 bpm; 45 min após losartan, $p < 0,05$ vs basal) [$F(5,45) = 2,751$; $p < 0,05$], Figura 9.

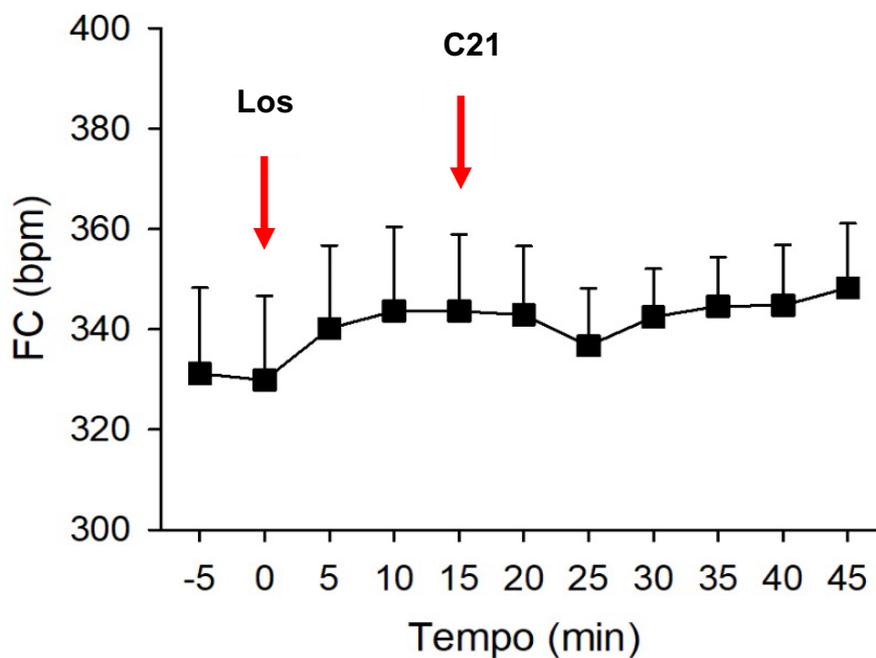


Figura 8. Alteração na frequência cardíaca (FC) após a microinjeção de Los (1 nmol/200nL) e C21 (100 μ mol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos sham (n = 7). Os resultados foram expressos como média \pm EPM; análise de variância de uma via para medidas repetidas; $p < 0,05$; n = número de animais.

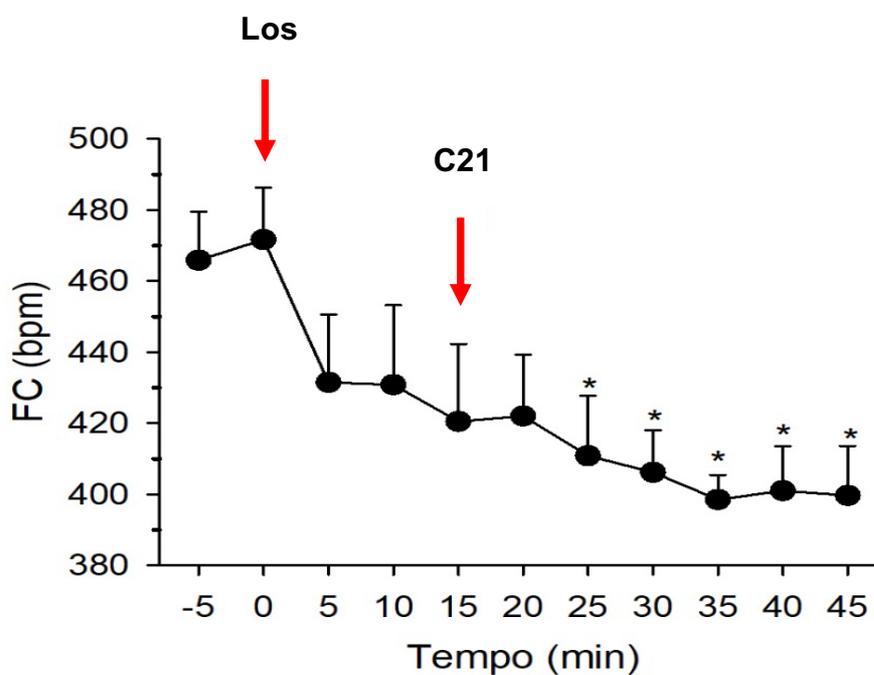


Figura 9. Alteração na frequência cardíaca (FC) após a microinjeção de Los (1 nmol/200 nL) e C21 (C21; 100 μ mol/200 nL) bilateral no bulbo rostroventrolateral (RVL) em ratos 2R1C (n = 6). Os resultados foram expressos como média \pm EPM; análise de variância de uma via para medidas repetidas; $p < 0,05$; *diferente de basal (tempo 0). n = número de animais.

5.3 Análise histológica da região RVL

A figura abaixo mostra o sítio de injeção no RVL no lado direito e um retirado do Atlas Paxinos e Watson (1986) mostrando a localização anatômica do RVL.

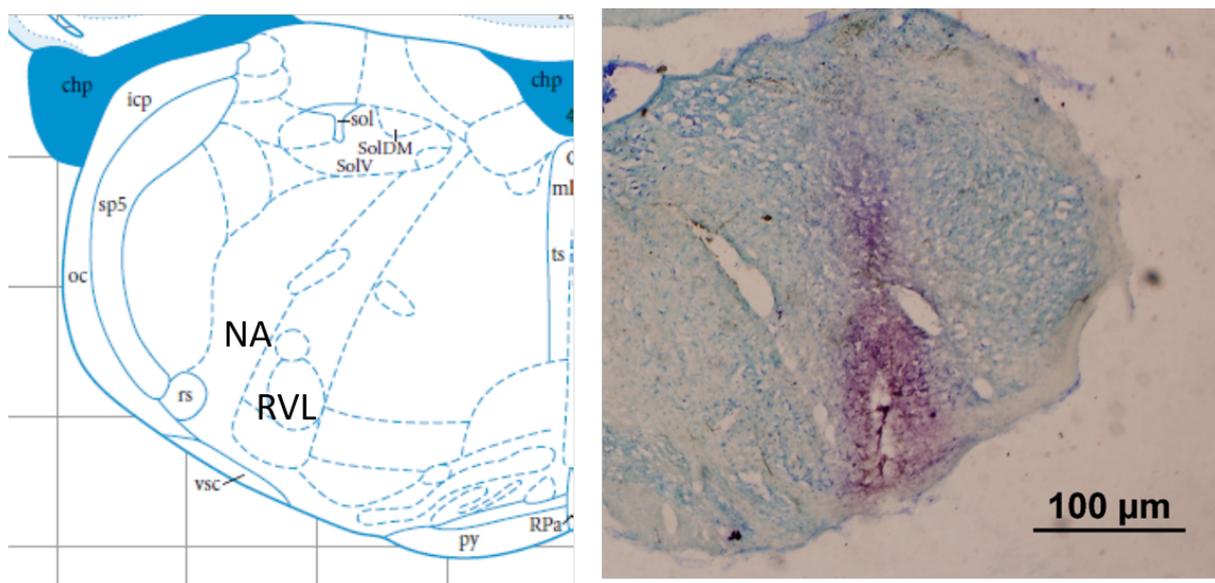


Figura 10. Fotomicrografia representativa do grupo mostrando a microinjeção no RVL no painel à direita e o esquema retirado do Atlas de Paxinos e Watson (1986) à esquerda mostrando a localização anatômica do RVL. RVL = bulbo rostroventrolateral; NA = núcleo ambíguo.

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que a ativação de receptores AT2 induzida pelo agonista seletivo de receptores AT2, o Composto 21, quando microinjetado no RVL de ratos 2R1C não anestesiados provoca uma significativa diminuição da PAM. Em animais sham (normotensos) não houve alteração da PAM. Além disso, os resultados mostram que a microinjeção de C21 no RVL de ratos sham não anestesiados, promove apenas uma redução transitória na frequência cardíaca desses animais, com uma tendência à redução em ratos 2R1C. Porém as alterações da frequência cardíaca ainda precisam ser melhor entendidas. A associação do bloqueio de receptores AT1 por antagonista de receptor AT1, losartan, e ativação de receptores AT2 induzida pelo agonista seletivo de receptores AT2, o composto 21, quando microinjetado no RVL de ratos 2R1C anestesiados provoca uma significativa diminuição da PAM, porém em animais sham não houve alteração da PAM. Os resultados também mostram que o losartan associado ao C21 promove uma redução na frequência cardíaca desses animais, o que não foi observado em animais sham.

Como descrito anteriormente, o modelo de hipertensão renovascular (2R1C) é caracterizado por um aumento da atividade do sistema renina angiotensina e da atividade nervosa simpática, (BARBOSA et al., 2017; BLANCH et al., 2014; DE OLIVEIRA-SALES et al., 2010; DEFORREST et al., 1982; GOLDBLATT et al., 1934; LEENEN et al., 1975; RONCARI et al., 2018), logo, o SRA é um alvo eficaz para o tratamento de indivíduos com hipertensão e portanto as estratégias terapêuticas mais utilizadas atualmente para o controle da pressão arterial são por meio de inibidores da ECA (IECA) e de antagonistas de receptor de ANG II, principalmente o receptor AT1. Oliveira Sales et al. (DE OLIVEIRA-SALES et al., 2010) demonstram que a maior expressão de receptores AT1 no RVL contribui para a hiperatividade simpática e

hipertensão de animais 2R1C, além de que o bloqueio dos receptores AT1 com o losartan é capaz de produzir uma redução na pressão arterial neste modelo experimental em aproximadamente 20 mmHg, quando microinjetado no RVL. Por outro lado, recentes estudos realizados em nosso laboratório demonstraram efeitos benéficos dos receptores AT2, que se opõe aos efeitos dos receptores AT1 no cérebro de animais com hipertensão renovascular, onde o aumento da expressão da proteína do receptor AT2 no complexo solitário-vagal atenua o desenvolvimento da hipertensão e causa uma melhora no barorreflexo em animais 2R1C (BLANCH et al., 2014). Dados anteriores da literatura também observaram que a maior expressão de receptores AT2 do RVL de ratos normotensos é capaz de reduzir a pressão arterial e a excreção de urina (GAO et al., 2008) e que a ativação destes receptores, através da infusão intracerebroventricular de C21 durante 7 dias, diminui significativamente a pressão arterial (aproximadamente 15 mmHg) e a excreção de noradrenalina no período noturno em ratos normotensos acordados (GAO et al., 2011).

Como estratégia terapêutica, e considerando a função antagônica dos receptores AT2 aos receptores AT1, nossa hipótese era de que a ativação de receptores AT2, através da estimulação pelo agonista seletivo de receptores AT2, o C21, pudesse alcançar algum efeito benéfico sobre essa síndrome e que o bloqueio de receptores AT1 induzido por losartan associado à ativação de receptores AT2 pelo C21 pudesse realizar efeitos benéficos maiores ainda quando comparado ao bloqueio de receptores AT1 ou a ativação de receptores AT2, isoladamente. No presente estudo demonstramos que em ratos acordados uma microinjeção de C21 para ativar receptores AT2 no RVL, é capaz de reduzir a pressão arterial em aproximadamente 20 mmHg em ratos 2R1C, sem nenhuma alteração significativa na pressão arterial de ratos normotensos (sham). Além disso, podemos observar através de nossos

resultados que em ratos anestesiados o bloqueio dos receptores AT1 pela microinjeção de losartan seguida da microinjeção de C21 para ativar receptores AT2 no RVL, é capaz de reduzir a pressão arterial em aproximadamente 63 mmHg em ratos 2R1C, porém não houve alteração significativa na pressão arterial de ratos sham. No presente estudo não está claro porque o C21 produziu redução da pressão arterial apenas nos ratos 2R1C. É possível que na hipertensão renovascular, os níveis de receptores AT2 no RVL estejam aumentados, para compensar a grande atividade nos receptores AT1, e desta forma tentar contra-regular a forte ativação da Ang II nos receptores AT1. Estudos com medidas da expressão gênica na região RVL, nos mostrando os níveis de RNAm para os receptores AT1 e AT2 em animais hipertensos, bem como, os níveis proteicos de receptores AT1 e AT2 no RVL em ratos hipertensos possam nos ajudar a explicar a redução da pressão arterial nos ratos 2R1C. Com relação a FC, ainda não temos dados suficientes para concluir os efeitos da estimulação dos receptores AT2 pelo C21 em ratos sham ou 2R1C.

Por fim, pode-se concluir que este estudo além de colaborar para fortes evidências de que a função dos receptores AT1 é de fato antagônica ao dos receptores AT2, mostra mais uma vez que os receptores AT2 são capazes de produzir efeitos benéficos nesta patologia e a associação destas duas vias é poderosamente efetiva para o controle da hipertensão, o que abre caminho para mais uma estratégia terapêutica.

7. REFERÊNCIAS

ALLEN, A.M., et al. Angiotensin II receptors and angiotensin converting enzyme in the medulla oblongata. **Hypertension**. v.9, n.6 pt 2, p.III198-III205, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.9.6 Pt 2.III198>.

BARBOSA, R.M., et al. Increased Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Nucleus of the Solitary Tract Attenuates Renovascular Hypertension in Rats. **American Journal of Hypertension**. v.30, p.435-443, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajh/hpx001>.

BERENQUER, L.M., et al. Role of renin-angiotensin system in the impairment of baroreflex control of heart rate in renal hypertension. **J Hypertens**. v.9, p.1127-1133, 1991.

BERGAMASCHI, C., et al. Role of the rostral ventrolateral medulla in maintenance of blood pressure in rats with Goldblatt hypertension. **Hypertension**. v.26, p.1117-20, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.26.6.1117>.

BLANCH, G.T., et al. Increased Expression of Angiotensin II Type 2 Receptors in the Solitary-Vagal Complex Blunts Renovascular Hypertension. **Hypertension**. v.64, p.777-783, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03188>.

BOSNYAK, S., et al. Stimulation of angiotensin AT2 receptors by the non-peptide agonist, Compound 21, evokes vasodepressor effects in conscious spontaneously hypertensive rats. *Br.J.Pharmacol.* v.159, p.709-716, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00575.x>.

BOSNYAK, S., et al. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. **Clin.Sci.(Lond)**. v.121, p.297-303, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/CS20110036>.

BURNIER, M., BRUNNER, H.R. Angiotensin II receptor antagonists in hypertension. **Kidney Int Suppl**. v.68, p.S107-11, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.06822.x>.

CARVALHO, T.H., et al. Role of endogenous angiotensin II on glutamatergic actions in the rostral ventrolateral medulla in Goldblatt hypertensive rats. **Hypertension**. v.42, p.707-712, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000086524.35251.2D>.

COLOMBARI, D.S.A., CRAVO, S.L. Effects of acute AV3V lesions on renal and hindlimb vasodilation induced by volume expansion. **Hypertension**. v.34, p.762-767, 1999. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/pdf/10.1161/01.HYP.34.4.762>.

COLOMBARI, D.S.A., et al. Afferent pathways in cardiovascular adjustments induced by volume expansion in anesthetized rats. **Am.J.Physiol**. v.279, p.R884-R890, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.3.R884>.

COLOMBARI, D.S.A., et al. Switching control of sympathetic activity from forebrain to hindbrain in chronic dehydration. **The Journal of Physiology**. v.589, p.4457-4471, 2011. Disponível em <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.210245>.

DAMPNEY, R.A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**. v.74, p.323-64, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.2.323>.

DE GASPARO, M., et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacol.Rev**. v.52, p.415-472, 2000.

DE OLIVEIRA-SALES, E.B., et al. Upregulation of AT1R and iNOS in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) is essential for the sympathetic hyperactivity and hypertension in the 2K-1C Wistar rat model. **Am.J.Hypertens**. v.23, p.708-715, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ajh.2010.64>.

DEFORREST, J.M., et al. Angiotensin II is a necessary component for the development of hypertension in the two kidney, one clip rat. **Am J Cardiol**. v.49, p.1515-7, 1982.

FELDBERG, W., GUERTZENSTEIN, P.G. Blood pressure effects of leptazol applied to the ventral surface of the brain stem of cats. **J.Physiol**. v.372, p.445-456, 1986.

GAO, J., et al. Activation of central angiotensin type 2 receptors suppresses norepinephrine excretion and blood pressure in conscious rats. **Am.J.Hypertens**. v.24, p.724-730, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.33>.

GAO, J., ZUCKER, I.H., GAO, L. Activation of Central Angiotensin Type 2 Receptors by Compound 21 Improves Arterial Baroreflex Sensitivity in Rats With Heart Failure. **Am.J.Hypertens**, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu044>.

GAO, L., et al. Effects of angiotensin type 2 receptor overexpression in the rostral ventrolateral medulla on blood pressure and urine excretion in normal rats. **Hypertension**. v.51, p.521-527, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101717>.

GOLDBLATT, H., et al. Studies On Experimental Hypertension : I. The Production Of Persistent Elevation Of Systolic Blood Pressure By Means Of Renal Ischemia. **J.Exp.Med.** v.59, p.347-379, 1934. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.59.3.347>.

GUERTZENSTEIN, P.G., SILVER, A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. **J Physiol.** v.242, p.489-503, 1974. Disponível em: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1113/jphysiol.1974.sp010719>.

GUYENET, P.G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat.Rev Neurosci.** v.7, p.335-346, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrn1902>.

HANSEN, K.J., et al., 2002. Prevalence of renovascular disease in the elderly: a population-based study. **J.Vasc.Surg.** v.36, p.443-451. Disponível em: <https://doi.org/10.1067/mva.2002.127351>.

IWAI, M., HORIUCHI, M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. **Hypertens.Res.** v.32, p.533-536, 2009.

LEENEN, F.H., DE, J.W. Plasma renin and sodium balance during development of moderate and severe renal hypertension in rats. **Circ.Res.** v.36, p.179-186, 1975.

LEENEN, F.H., et al. Changes in the renin-angiotensin-aldosterone system and in sodium and potassium balance during development of renal hypertension in rats. **Clin.Sci.Mol.Med.** v.48, p.17-26, 1975.

LINCEVICIUS, G.S., et al. Aldosterone Contributes to Sympathoexcitation in Renovascular Hypertension. **Am J Hypertens.** v.28, p.1083-90, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu300>.

MAGGI, C.A., MELI, A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations. Part 3: Other systems and conclusions. **Experientia.** v.42, p.531-7, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01952426>.

OLIVEIRA-SALES, E.B., et al. Sympathetic overactivity occurs before hypertension in the two-kidney, one-clip model. **Exp Physiol.** v.101, p.67-80, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/EP085390>.

PADMANABHAN, S., CAULFIELD, M., DOMINICZAK, A.F. Genetic and molecular aspects of hypertension. **Circ Res.** v.116, p.937-59, 2015.

PAXINOS, G., WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, Vol., **Academic Press**, Inc, San Diego, 1986.

PETERSSON, M.J., et al. Increased cardiac sympathetic drive in renovascular hypertension. **J.Hypertens**. v.20, p.1181-1187, 2002.

PHILLIPS, M.I. Functions of angiotensin in the central nervous system. **Ann.Rev.Physiol**. v.49, p.413-435, 1987.

RONCARI, C.F., et al. Enhanced angiotensin II induced sodium appetite in renovascular hypertensive rats. *Peptides*. v.101, p.82-88, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.025>.

RUCHAYA, P.J., et al. Overexpression of AT2R in the solitary-vagal complex improves baroreflex in the spontaneously hypertensive rat. **Neuropeptides**. v.60, p.29-36, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.06.006>.

SAÚDE, M.d. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. **Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico [Internet]**. Vol., ed.^eds. Ministério da Saúde, Brasília, pp. 139, 2019. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2019_vigilancia_fatores_risco.pdf.

STECKELINGS, U.M., KLOET, A., SUMNERS, C. Centrally Mediated Cardiovascular Actions of the Angiotensin II Type 2 Receptor. **Trends Endocrinol Metab**. v.28, p.684-693, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.06.002>.

TSUTSUMI, K., SELTZER, A., SAAVEDRA, J.M. Angiotensin II receptor subtypes and angiotensin-converting enzyme in the fetal rat brain. **Brain Res**. v.631, p.212-220, 1993.

TSYRLIN, V.A., et al. Arterial baroreceptor reflex counteracts long-term blood pressure increase in the rat model of renovascular hypertension. **PLoS ONE**. 8, e64788, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064788>.

UNGER, T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. **The American Journal of Cardiology**. v.89, p. 3-9, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(01\)02321-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(01)02321-9).

UNGER, T., DAHLOF, B. Compound 21, the first orally active, selective agonist of the angiotensin type 2 receptor (AT2): implications for AT2 receptor research and therapeutic potential. **J Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst**. v.11, p.75-77, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1470320309347792>.

URZEDO-RODRIGUES, L.S., et al. Hypothalamic disconnection caudal to paraventricular nucleus affects cardiovascular and drinking responses to central angiotensin II and carbachol. **Brain Res.** v.1388, p.100-108, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.03.021>.

WAN, Y., et al. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist. **J Med.Chem.** v.47, p.5995-6008, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm049715t>.

WHO, **Hypertension**, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>.

YU, L., et al. Developmental changes in AT1 and AT2 receptor-protein expression in rats. **J.Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.** v.11, p.214-221, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1470320310379065>.