

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Mariana Ruiz Lauar

***Efeitos da injeção intracerebroventricular de peróxido de
hidrogênio ou de ATZ sobre a resposta pressora da
angiotensina II centralmente***

Araraquara

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Efeitos da injeção intracerebroventricular de peróxido de hidrogênio ou de ATZ sobre a resposta pressora da angiotensina II centralmente

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

Aluna: Mariana Ruiz Lauer

Orientador: José Vanderlei Menani

Araraquara

2012

Dedico este trabalho de conclusão de curso, em especial, a toda minha família, que me incentivou e me apoio ao longo da minha graduação. A minha mãe, Regina Aparecida Ruiz Lauar, pela força e amor incondicional que mesmo com a distância fez-me sentir como se estivesse em casa. Obrigada por ser este exemplo de força, determinação e amor para mim, mãe. Ao meu pai, Walid Geraldo Amin Lauar, que tão cedo se foi deixando uma imensa saudade, mas que seu amor e seus ensinamentos estarão para sempre em minha vida contribuindo cada vez mais para minha formação não só profissional, mas principalmente, humana. Aos meus irmãos, Juliana Ruiz Lauar e Tarik Ruiz Lauar principalmente pela amizade, amor e apoio sem fim além de estarem sempre dispostos a me ajudarem em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela fé e motivação que me ajuda a fazer cada dia valer a pena.

As agências de fomento à pesquisa CNPq (processo nº 110919/2007-6) e FAPESP (processo nº 2010/07124-9) por financiarem meu projeto durante toda minha graduação, tornando possível a realização da minha pesquisa.

A todos meus amigos da turma 79 de Farmácia-Bioquímica pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos, pelo companheirismo nos momentos difíceis e pelas risadas nas horas felizes. As minhas amigas de república pela convivência e sorrisos diários. Aos meus amigos de São Paulo, que mesmo longe, participaram ativamente das minhas conquistas durante minha graduação.

Ao Prof. Dr. José Vanderlei Menani pela paciência e dedicação nestes 6 anos de orientação durante minha iniciação científica que, dentre vários resultados obtidos, encontra-se este trabalho de conclusão de curso.

A todos os Professores, amigos, colegas e técnicos do Laboratório de Fisiologia que também participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho. Em especial, Prof. Dra. Patrícia Maria de Paula, Dra. Graziela Torres Blanch e Dr. Andre Henrique Freiria-Oliveira que guiaram meus passos ao longo da minha iniciação científica.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	8
2. LISTA DE FIGURAS	10
3. LISTA DE ABREVIATURAS	13
4. INTRODUÇÃO	14
5. OBJETIVOS	19
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
6.1. Animais	20
6.2. Cirurgia para desenvolvimento da hipertensão 2 rins, 1 clipe	20
6.3. Implante de cânulas no ventrículo lateral	20
6.4. Injeção de drogas no VL	21
6.5. Drogas utilizadas	22
6.6. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	22
6.7. Histologia encefálica para localização dos pontos das injeções	22
6.8. Apresentação dos resultados e estatística	23
7. EXPERIMENTOS REALIZADOS	24
7.1. Efeitos da administração de H ₂ O ₂ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos normotensos.....	24
7.2. Efeitos da administração de ATZ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos normotensos.....	24

7.3. Efeitos da administração de ATZ i.v. combinado com H ₂ O ₂ icv sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos normotensos	24
7.4. Efeitos da administração de H ₂ O ₂ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos SHR.....	25
7.5. Efeitos da administração de ATZ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos SHR.....	25
7.6. Efeitos da administração de ATZ i.v. combinado com H ₂ O ₂ icv sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos SHR	25
7.7. Efeitos da administração de H ₂ O ₂ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos 2R1C	25
7.8. Efeitos da administração de ATZ i.v. sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos 2R1C	26
7.9. Efeitos da administração de ATZ i.v. combinado com H ₂ O ₂ icv sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos 2R1C.....	26
8. RESULTADOS	27
8.1. Análise histológica	27
8.3. Efeitos da administração de ATZ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos normotensos.....	31
8.4. Efeitos da administração de ATZ i.v. combinado com H ₂ O ₂ icv sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos normotensos	34
8.5. Efeitos da administração de H ₂ O ₂ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos SHR.....	37

8.6. Efeitos da administração de ATZ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos SHR.....	40
8.7. Efeitos da administração de ATZ i.v. combinado com H ₂ O ₂ icv sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos SHR	43
8.8. Efeitos da administração de H ₂ O ₂ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos 2R1C	46
8.9. Efeitos da administração de ATZ i.v. sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos 2R1C	49
8.10. Efeitos da administração de ATZ i.v. combinado com H ₂ O ₂ icv sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos 2R1C.....	52
9. DISCUSSÃO	55
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. RESUMO

As espécies reativas de oxigênio podem participar de mecanismos envolvidos em respostas fisiológicas, como os efeitos hipertensores e dipsogênicos da angiotensina II (ANG II) central, que seriam pelo menos em parte devidos a produção de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Por isso, uma superexpressão da enzima superóxido dismutase que reduz a disponibilidade de $O_2^{\bullet-}$ convertendo-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) inibiria o efeito pressor da ANG II administrada centralmente. Porém, alguns resultados de nosso laboratório demonstram que H_2O_2 injetado intracerebroventricularmente (icv) reduz a ingestão de água induzida pela ANG II em ratos normotensos. Portanto, no presente trabalho propomos estudar os efeitos de injeções de H_2O_2 ou de ATZ (inibidor da catalase) sozinhos ou combinados no ventrículo lateral (VL) e também os efeitos do ATZ injetado intravenosamente (i.v.) sozinho ou combinado com H_2O_2 no VL sobre a resposta pressora da ANG II também injetada no VL em ratos normotensos, espontaneamente hipertensos (SHRs) ou em ratos com hipertensão renovascular do tipo 2 rins 1 clipe (2R1C). Foram utilizados ratos Holtzman normotensos, SHRs e ratos com hipertensão renovascular 2R1C com cânulas de aço inoxidável previamente implantadas no VL. A pressão arterial e a frequência cardíaca foram registradas em sistema computadorizado diretamente da aorta em ratos não anestesiados por uma cânula de polietileno introduzida pela artéria femoral e a injeção i.v. foi realizada por meio de uma cânula de polietileno introduzida na veia femoral. A pressão arterial e frequência cardíaca foram registradas continuamente

desde 30 minutos antes da primeira injeção (veículo, salina, H₂O₂ ou ATZ) até 30 minutos após a injeção de ANG II.

Os resultados demonstraram que a injeção icv de H₂O₂ (5 µmol/1 µL) reduziu fortemente a resposta pressora produzida pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µL) em ratos normotensos (7 ± 3 mmHg vs. controle: 19 ± 4 mmHg), SHR (11 ± 3 mmHg vs. controle: 22 ± 5 mmHg) e em ratos com hipertensão 2R1C (3 ± 1 mmHg, vs. controle: 15 ± 2 mmHg), porém, não alterou significativamente a pressão arterial basal desses animais. Injeção do bloqueador da catalase ATZ icv (5 nmol/1 µL) em ratos SHR (17 ± 4 mmHg vs. controle: 35 ± 6 mmHg) também reduziu significativamente a resposta pressora da ANG II icv. Já a injeção i.v. de ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal), aboliu a resposta pressora produzida pela injeção icv de ANG II (1 ± 1 mmHg, vs. controle: 17 ± 1 mmHg), além de reduzir a pressão arterial basal (-13 ± 1 mmHg, vs. controle: 1 ± 1 mmHg) dos ratos com hipertensão 2R1C. Injeção de ATZ i.v. combinada com injeção icv de H₂O₂ em ratos normotensos aboliu a resposta pressora induzida pela ANG II (4 ± 1 mmHg vs. controle: 18 ± 2 mmHg). A injeção de ATZ i.v. combinada com a injeção de H₂O₂ icv produziu efeitos semelhantes aos do pré-tratamento apenas com ATZ i.v. tanto na resposta pressora da ANG II icv (4 ± 1 mmHg, vs. controle: 19 ± 2 mmHg), como na pressão arterial basal (-11 ± 1 mmHg, vs. salina: -1 ± 1 mmHg) dos ratos 2R1C. Os resultados sugerem que o aumento dos níveis de H₂O₂ centralmente prejudica mecanismos pressores ativados pela ANG II. Além disso, o aumento da concentração de H₂O₂ endógeno diminui a pressão arterial de animais com hipertensão 2R1C. Injeções de ANG II, H₂O₂ ou ATZ sozinhos ou combinados não produziram efeitos consistentes na FC.

2. LISTA DE FIGURAS

Figura I: Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo dos grupos estudados mostrando o sítio de injeção no VL.....27

Figura II: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzida pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) combinada com injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 µmol/1 µl) em ratos normotensos.....29

Figura III: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzida pela ANG II icv (50 ng/1 µl) depois de (A) veículo e (B) H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv em ratos normotensos.....30

Figura IV: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzida pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) combinada com injeções icv de salina ou ATZ (5 nmol/1 µl) em ratos normotensos.....32

Figura V: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzida pela ANG II icv (50 ng/1 µl) depois de (A) veículo e (B) ATZ (5 nmol/1 µl) icv em ratos normotensos.....33

Figura VI: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzidas pela ANG II (50 ng/1 µl) icv em ratos pré-tratados com injeções i.v. de salina ou ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) combinadas com injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 µmol/1 µl) em ratos normotensos.....35

Figura VII: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzida pela ANG II icv (50 ng/1 µl) depois de (A) salina i.v. + PBS icv e (B) ATZ i.v. (3,6 mmol/kg de peso corporal) + H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv em ratos normotensos.....36

Figura VIII: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzida pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) combinada com injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 µmol/1 µl) em ratos SHR.....38

Figura IX: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzida pela ANG II icv (50 ng/1 µl) depois de (A) veículo e (B) H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv de ratos SHR.....39

Figura X: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzida pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) combinada com injeções icv de salina ou ATZ (5 nmol/1 µl) em ratos SHR.....41

Figura XI: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzida pela ANG II icv (50 ng/1 µl) depois de (A) salina icv e (B) ATZ (5 nmol/1 µl) icv de ratos SHR.....42

Figura XII: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzidas pela ANG II (50 ng/1 µl) icv em ratos pré-tratados com injeções i.v. de salina ou ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) combinadas com injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 µmol/1 µl) em ratos SHR.....44

Figura XIII: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzidas pela ANG II icv (50 ng/1 µl) após injeções de (A) salina i.v. + veículo icv e (B) ATZ (3,6 mmol/kg) i.v. + H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv de ratos SHR.....45

Figura XIV: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzidas pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) pré-tratados com injeção i.v. de salina + injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 µmol/1 µl) em ratos com hipertensão 2R1C.....47

Figura XV: Registro representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzidas pela ANG II (50 ng/1 µl) injetada icv após injeção de (A) salina i.v. + veículo (PBS) icv e (B) salina i.v. + H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv em ratos com hipertensão 2R1C.....48

Figura XVI: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzidas pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) pré-tratados com injeções i.v. de ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) ou salina + PBS (1 µl) icv em ratos com hipertensão 2R1C.....50

Figura XVII: Registro representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzidas pela injeção de ANG II (50 ng/1 µl) icv pré-tratados com injeções de (A) salina i.v. + veículo (PBS) icv e (B) ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) i.v. + PBS icv em ratos com hipertensão 2R1C.....51

Figura XVIII: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzidas pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) pré-tratados com injeções i.v. de ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) + H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv em ratos com hipertensão 2R1.....53

Figura XIX: Registro representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzidas pela injeção de ANG II icv (50 ng/1 µl) pré-tratados com injeções de (A) salina i.v. + veículo (PBS) icv ou (B) ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) i.v. + H₂O (5 µmol/1 µl) icv em ratos com hipertensão 2R1C.....54

3. LISTA DE ABREVIATURAS

2R1C	hipertensão 2 rins, 1 clipe
ANG II	angiotensina II
AT1	receptores angiotensinérgicos tipo 1
ATZ	3-amino-1,2,4-triazol – inibidor da catalase
AV3V	região anteroventral do terceiro ventrículo
EROs	espécies reativas de oxigênio
FC	frequência cardíaca
GABA	ácido γ-aminobutírico
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HO[•]	radical hidroxil
i.v.	intravenosa
icv	intracerebroventricular
K_{ATP} channels	canais de potássio sensíveis a ATP
MnPO	núcleo preótico mediano
NTS	núcleo do trato solitário
O₂^{•-}	ânion superóxido
OSF	órgão subfornical
OVLT	órgão vascular da lâmina terminal
PAM	pressão arterial média
PAP	pressão arterial pulsátil
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo
RVL	região rostroventrolateral do bulbo
sc	subcutânea
SHR	ratos espontaneamente hipertensos
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
SON	núcleo supraótico do hipotálamo
VL	ventrículo lateral

4. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) tem um papel fundamental na regulação de mecanismos homeostáticos que controlam a pressão arterial (Dampney, 1994). No prosencéfalo em particular, existem regiões que estão envolvidas com a regulação cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrolítico [revisão em (Dampney, 1994; McKinley and Johnson, 2004)]. A administração intracerebroventricular (icv) ou em várias áreas prosencefálicas de angiotensina II (ANG II), produz aumento da pressão arterial (Johnson et al., 1978; Colombari et al., 1992; Colombari et al., 1994). Este aumento da pressão arterial induzido por ANG II em áreas prosencefálicas é decorrente de um aumento da atividade do sistema nervoso simpático e/ou secreção de vasopressina (Hoffman et al., 1977; Hatzinikolaou et al., 1981; Miyajima and Bunag, 1984).

As espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecidas por suas propriedades microbicidas, compreendem espécies químicas endogenamente produzidas pelo organismo como os radicais livres ($O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Weinberg, 1990; Rhee et al., 2003). A alta capacidade oxidante destas espécies atribui-lhes propriedades destrutivas para as células sendo frequentemente associadas à morte celular e ao processo de apoptose (Irani, 2000; Jiang et al., 2003). Apesar de seu potencial citotóxico quando em altas concentrações, vários estudos têm demonstrado que tais espécies, quando em baixas concentrações, podem participar na sinalização intra e intercelular, agindo conjuntamente com mediadores químicos clássicos como a ANG II, noradrenalina e glutamato [revisão em (Zimmerman and Davisson, 2004)]. Ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil ($HO^{\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são conhecidos como espécies

reativas de oxigênio (EROs) e podem ser produzidas endogenamente e atuam como sinalizador molecular para regular funções biológicas (Adler et al., 1999; Chen et al., 2001; Zimmerman et al., 2002; Rhee et al., 2003; Zimmerman et al., 2004a; Zimmerman and Davisson, 2004; Avshalumov et al., 2005; Bao et al., 2009). Superóxido dismutase (SOD), uma importante enzima no metabolismo das EROs que cataliza a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , está amplamente distribuída no SNC, onde as EROs atuam como neuromoduladores afetando a neurotransmissão e o disparo neuronal (Aizenman et al., 1989; Volterra et al., 1994; Zoccarato et al., 1995; Chen et al., 2001; Zimmerman et al., 2002; Zimmerman and Davisson, 2004; Avshalumov et al., 2005; Campese et al., 2007).

No SNC, foi descrito que as ações dipsogênicas e cardiovasculares da ANG II, em camundongos, são dependentes do aumento da produção de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por neurônios dos órgãos circunventriculares (Zimmerman et al., 2002; Zimmerman and Davisson, 2004). No mecanismo proposto, a ativação de receptores angiotensinérgicos, do subtipo AT_1 , pela ANG II, desencadela uma cascata bioquímica intracelular que leva à ativação do complexo enzimático NADPH oxidase (Zimmerman et al., 2002; Zimmerman and Davisson, 2004). Uma vez ativada, esta enzima catalisa a transferência de dois elétrons da molécula de $NADPH_2^+$ para duas moléculas de oxigênio formando, dessa maneira, dois radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O superóxido foi identificado como um EROs pivô nos efeitos centrais da ANG II utilizando um modelo de animal transfectado. Neste modelo animal, partículas virais (adenovírus) carregando genes que codificam a enzima SOD, uma enzima responsável pela dismutação do superóxido em H_2O_2 e oxigênio, são transfectados em neurônios dos órgãos circunventriculares, por meio de injeção no ventrículo lateral de camundongos. Como resultados, os neurônios transfectados

passam a superexpressar a SOD diminuindo a disponibilidade do superóxido formado quando o sistema NADPH oxidase é ativado pela ANG II (Zimmerman et al., 2002; Zimmerman and Davisson, 2004). A redução substancial tanto na resposta dipsogênica quando nas cardiovasculares sugere fortemente que a geração de EROs dependente de ANG II é um evento importante para os efeitos biológicos da ANG II centralmente (Zimmerman et al., 2002; Zimmerman et al., 2004a; Zimmerman and Davisson, 2004). A evidência que ANG II induz a formação de $O_2^{\bullet-}$ é reforçada pelos estudos mostrando que ANG II central aumenta a fluorescência por dihidroethidium, uma sonda padrão seletiva para $O_2^{\bullet-}$ e que a ANG II induz um influxo de cálcio dependente de $O_2^{\bullet-}$ (Zimmerman et al., 2004b; Zimmerman et al., 2005). Em adição, a produção de EROs induzida por ANG II sugere o envolvimento da NADPH oxidase (Zimmerman et al., 2004a; Peterson et al., 2009).

Comparada com outras EROs, peróxido de hidrogênio é uma EROs relativamente estável e difusível que pode atuar centralmente através de mecanismos diferentes modulando a transmissão sináptica neuronal. Respostas excitatórias ou inibitórias do H_2O_2 atuando centralmente tem sido relatadas (Sorg et al., 1997; Volterra et al., 1994; Zoccarato et al., 1995; Zoccarato et al., 1999; Sah et al., 2002; Wehage et al 2002; Bao et al. 2005; Avshalumov et al., 2005; Takahashi et al., 2007). Centralmente, H_2O_2 pode bloquear captação de glutamato pelas células da glia, que pode resultar em um aumento dos níveis extracelular de glutamato aumentando a excitabilidade neuronal ou até causando toxicidade (Sorg et al., 1997; Volterra et al., 1994). Por outro lado, tem sido mostrado que H_2O_2 inibe a ação do glutamato e aumenta a liberação de ácido γ -aminobutírico (GABA) ou atua em canais de íons, especialmente canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP} channels) causando hiperpolarização neuronal e reduzindo a excitabilidade (Zoccarato et al.,

1995, Zoccarato et al., 1999, Sah et al., 2002, Takahashi et al., 2007; Bao et al. 2005; Avshalumov et al 2005).

Estudos tem demonstrado a importância do $O_2^{\bullet-}$ como parte da sinalização de mecanismos ativados pela ANG II, entretanto, possíveis efeitos de outras EROs, como H_2O_2 , nas respostas induzidas pelas ANG II não foram investigadas ainda. Apesar das controvérsias sobre a correlação entre variações na atividade da SOD e nos níveis de H_2O_2 (Teixeira et al., 1998; Gardner et al., 2002; Chan et al., 2006; Kowald et al., 2006), a superexpressão central de SOD pode também reduzir a resposta induzida pela ANG II devido a um aumento nos níveis de H_2O_2 . Endogenamente, a produção de H_2O_2 pode resultar da ativação da NADPH oxidase ou da respiração mitocondrial acoplada a via da SOD ou da atividade de monoamina (Maker et al., 1981; Zimmerman et al., 2004a; Peterson et al., 2009; Bao et al., 2005, 2009) e independentemente desta fonte, H_2O_2 pode afetar as respostas induzidas pelas ANG II através de mecanismos que reduzem a excitabilidade neuronal.

ANG II atuando centralmente produz aumento da pressão arterial em decorrência de um aumento da atividade do sistema nervoso simpático e/ou secreção de vasopressina. A hipertensão nos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) está associada a um aumento da atividade simpática e do sistema renina-angiotensina em decorrência principalmente da ativação de mecanismos centrais (Brody et al., 1984; Haeusler et al., 1972; Judy et al., 1976; Mori, 1973, Moreira et al., 2009). Outro modelo de hipertensão que é bastante dependente de ativação do sistema renina-angiotensina é a hipertensão renovascular (2 rins – 1 clipe, 2R1C) que foi desenvolvido por Goldblatt (Goldblatt, 1934). Neste modelo, a hipertensão é produzida pela oclusão parcial de uma das artérias renais por um clipe de prata, promovendo assim uma constrição parcial desta artéria, o que leva a um aumento

dos níveis de renina circulante e consequente exacerbação do sistema renina-angiotensina. Após o período de três a quatro semanas, quando a hipertensão já esta estabelecida, tem-se também um aumento na atividade simpática, que contribui para a manutenção da hipertensão, além de uma queda nos níveis de ANG II circulante. (Goldblatt, 1938; Goldblatt, 1958).

Dados anteriores do nosso laboratório (Giglioti et al., 2006) demonstraram que a resposta dipsogênica induzida pela injeção central de ANG II foi fortemente reduzida pela injeção (icv) prévia de H_2O_2 ou pelo acúmulo de H_2O_2 formado endogenamente após o bloqueio da enzima catalase com ATZ injetado icv, sugerindo a modulação inibitória de H_2O_2 nas respostas dipsogênicas induzidas pelas ANG II.

Tendo em vista então a importância das EROs, o envolvimento da ANG II em áreas prosencefálicas e seu papel no desenvolvimento/manutenção em modelos de hipertensão, a hipótese deste presente trabalho foi investigar a influência do H_2O_2 na resposta pressora da ANG II central.

5. OBJETIVOS

Portanto, neste presente estudo nós investigamos se o H_2O_2 exógeno injetado icv ou o aumento da produção de H_2O_2 endógeno pela injeção icv do inibidor da catalase ATZ (3-amino-1,2,4-triazol) pode modificar a resposta pressora induzida pela ANG II icv em ratos normotensos. Além disso, investigamos os efeitos do H_2O_2 exógeno ou endógeno nas respostas pressoras em SHRs e em ratos com hipertensão renovascular (2R1C). Em adição, nós também testamos os efeitos da injeção intravenosa de ATZ combinada com a injeção icv de H_2O_2 na resposta pressora da ANG II icv em ratos normotensos, SHR e 2R1C.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com pesos entre 150 a 350 g. Os animais foram mantidos no Biotério da Disciplina de Fisiologia em gaiolas de aço inoxidável individuais, em salas climatizadas (24 ± 2 °C), com ciclo claro-escuro 12-12 h, tendo disponível ração peletizada Biobase, água *ad libitum*. Aos mesmos foram dispensados cuidados diários de limpeza e higiene do ambiente.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP (n° 05/2010).

6.2. Cirurgia para desenvolvimento da hipertensão 2 rins, 1 clipe

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal). Foi feita então a laparotomia para exposição da artéria renal esquerda que foi cuidadosamente isolada para a colocação de um clipe de prata de 0,2 mm de diâmetro interno que permitia a oclusão parcial da artéria. A incisão foi suturada e os animais receberam tratamento com antibiótico (Pentabiótico Veterinário pequeno porte, Fort Dodge, 0,1 ml/rato, intramuscular) e analgésico Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,1 ml/rato subcutaneamente - sc).

6.3. Implante de cânulas no ventrículo lateral

Para as cirurgias, os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho

estereotáxico (modelo Kopf 900). O *lambda* e o *bregma* foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos ratos e para se determinar os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável. Nesse ponto foi feita a trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. A seguir, foi determinado o ponto de introdução da cânula de aço inoxidável (12 x 0,7 mm d.i.) no ventrículo lateral (VL). As coordenadas utilizadas nos ratos Holtzman (tanto os normotensos quanto os com hipertensão 2R1C) foram: 0,3 mm caudal ao bregma, 1,6 mm lateral à linha média e 3,5 mm abaixo da dura-máter e as coordenadas utilizadas nos ratos SHR foram: 0,5 mm rostral ao bregma, 1,6 mm lateral à linha média e 3,5 mm abaixo da dura-máter. As cânulas foram fixadas na cabeça dos ratos com parafusos e resina acrílica. Após a cirurgia, os ratos receberam uma injeção intramuscular (0,1 mL/rato) de Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e injeção sc do analgésico/antiinflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,1 mL/rato). Foi guardado um período em torno de 5 dias após a cirurgia cerebral para se iniciar os testes de registro de pressão arterial e frequência cardíaca.

6.4. Injeção de drogas no VL

As injeções no VL foram feitas com seringa de microlitro Hamilton (10 µl), conectada por meio de um tubo de polietileno (PE-10) a uma cânula injetora de aço inoxidável com 12 mm de comprimento (2 mm a mais que a cânula guia implantada no VL). O volume injetado foi de 1 µL.

6.5. Drogas utilizadas

ANG II (50 ng/1 μ L), peróxido de hidrogênio (5 μ mol/1 μ L) e 3-amino-1,2,4-triazol (ATZ - inibidor da catalase, 5 nmol/1 μ L) foram injetados no VL ou ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) foi injetado i.v. ANG II e ATZ foram dissolvidos em salina (NaCl 0,15 M), H₂O₂ foi dissolvido em PBS (salina tamponada – veículo).

6.6. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

Um dia antes do registro, os ratos previamente submetidos ao implante de cânula no VL, foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal) para a canulação da artéria e veia femoral, para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) e infusão de drogas. No final da canulação, as cânulas (tubos de polietileno PE-10 soldados a tubos de polietileno PE-50) foram exteriorizadas e suturadas na pele do dorso do animal. No dia seguinte, cânulas foram conectadas a um transdutor de pressão acoplado a um amplificador (ETH-200 CB Sciences Inc) e a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments). A PAM foi calculada a partir do sinal de PAP. A FC foi calculada como a frequência instantânea do sinal de PAP.

6.7. Histologia encefálica para localização dos pontos das injeções

Ao final dos experimentos, sob anestesia profunda, o coração dos animais foi exposto cirurgicamente e foi realizada primeiramente perfusão de solução de formalina a 10%. A seguir, os cérebros foram retirados e mergulhados no mesmo agente fixador por pelo menos 72 h. Posteriormente, utilizando um micrótomo de congelamento (Leica SM 2000 R) os cérebros foram seccionados em cortes coronais

de 50 μm , corados pela técnica de Nissl para posterior análise no microscópio óptico.

6.8. Apresentação dos resultados e estatística

Os animais cujo sítio de injeção foi considerado positivo tiveram seus resultados analisados e tabelados. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados pela análise de variância de uma via combinada com o teste de Student-Newman-Keuls. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

7. EXPERIMENTOS REALIZADOS

7.1. Efeitos da administração de H₂O₂ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos normotensos

PAM e FC foram registradas um dia depois da cirurgia de canulação arterial. Cerca de 30 min depois de se iniciar os registros de PAM e FC, PBS (1µl) ou H₂O₂ (5 µmol/1 µl) foi injetado icv seguido da injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) 1 min depois. Os registros de PAM e FC continuaram por mais 30 min após a injeção de ANG II e após 4 horas, os mesmos tratamentos icv foram repetidos nos mesmos animais mas de forma contrabalanceada.

7.2. Efeitos da administração de ATZ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos normotensos

Um protocolo similar ao descrito acima para testar os efeitos da combinação de H₂O₂ e ANG II icv foi também usado em um grupo diferente de animais para testar as respostas cardiovasculares da combinação de ATZ (5 nmol/1 µl) e ANG II (50 ng/1 µl) icv, exceto que ATZ ao contrário do H₂O₂ foi injetado 10 min antes de ANG II.

7.3. Efeitos da administração de ATZ i.v. combinado com H₂O₂ icv sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos normotensos

PAM e FC foram registradas um dia depois da cirurgia de canulação arterial. Cerca de 30 min depois de se iniciar os registros de PAM e FC, salina ou ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) foi injetado i.v. seguido 9 min depois da injeção de PBS ou H₂O₂ icv. Um min após PBS ou H₂O₂ e dez min após salina ou ATZ todos os

ratos receberam injeção de ANG (50 ng/1 μ l) icv e o registro da PAM e FC continuou por mais 30 min. No dia seguinte, os mesmos tratamentos i.v. e icv foram repetidos nos mesmos animais mas de forma contrabalanceada.

7.4. Efeitos da administração H_2O_2 icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos SHR

Ao invés de ratos normotensos, foram utilizados ratos SHRs submetidos ao mesmo protocolo descrito no item 7.1 acima.

7.5. Efeitos da administração de ATZ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos SHR

Ao invés de ratos normotensos, foram utilizados ratos SHRs submetidos ao mesmo protocolo descrito no item 7.2 acima.

7.6. Efeitos da administração de ATZ i.v. combinado com H_2O_2 icv sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos SHR

Ao invés de ratos normotensos, foram utilizados ratos SHRs submetidos ao mesmo protocolo descrito no item 7.3 acima.

7.7. Efeitos da administração de H_2O_2 icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos 2R1C

Ao invés de ratos normotensos, foram utilizados ratos 2R1C submetidos ao mesmo protocolo descrito no item 7.1 acima.

7.8. Efeitos da administração de ATZ i.v. sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos 2R1C

Ao invés de ratos normotensos, foram utilizados ratos 2R1C submetidos ao protocolo similar ao descrito no item 7.2 acima, exceto que os ratos receberam injeção i.v. de ATZ ao invés de ATZ icv.

7.9. Efeitos da administração de ATZ i.v. combinado com H₂O₂ icv sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos 2R1C

Ao invés de ratos normotensos, foram utilizados ratos 2R1C submetidos ao mesmo protocolo descrito no item 7.3 acima.

8. RESULTADOS

8.1. Análise histológica

A figura I mostra um sítio típico de injeção no VL. Como sugerido pela análise histológica, as injeções icv de H_2O_2 não produzem danos do tecido neural que poderiam afetar as respostas da ANG II. Além da análise histológica, outra razão para excluir qualquer influência de dano neural nos efeitos do H_2O_2 é a completa recuperação da resposta pressora induzida pela ANG II nos animais que receberam a segunda injeção de ANG II combinada com salina ou PBS icv (controle) cerca de 4 horas ou no outro dia do primeiro teste em que receberam ANG II combinada com H_2O_2 ou ATZ icv.

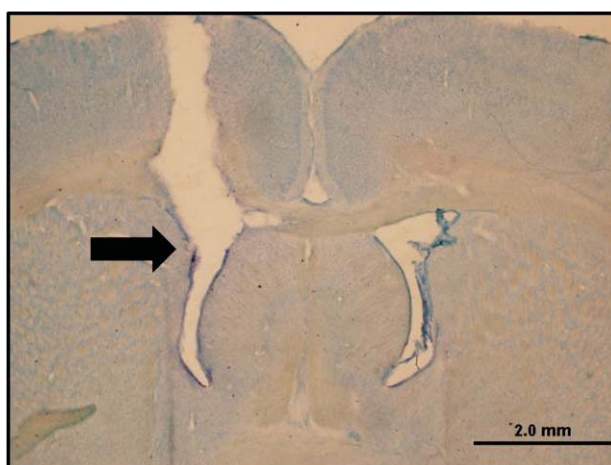


Figura I: Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo dos grupos estudados mostrando o sítio de injeção no VL (indicado pela seta).

8.2. Efeitos da administração H_2O_2 icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos normotensos

A resposta pressora da ANG II (50 ng/1 μ l) icv foi reduzida em 63% pelo pré-tratamento com H_2O_2 (5 μ mol/1 μ l) icv (7 ± 3 mmHg vs. controle: 19 ± 4 mmHg) [$F(3,21)=14,3$; $P<0,05$] (Fig II) Injeções de H_2O_2 (5 μ mol/1 μ l) icv sozinho não modificou a PAM. Injeções de H_2O_2 e ANG II icv sozinhos ou combinados não produziram alterações na FC (Fig II). A Figura III mostra o registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo estudado tratado com veículo ou H_2O_2 (5 μ mol/1 μ l) combinados com ANG II (50 ng/1 μ l) icv.

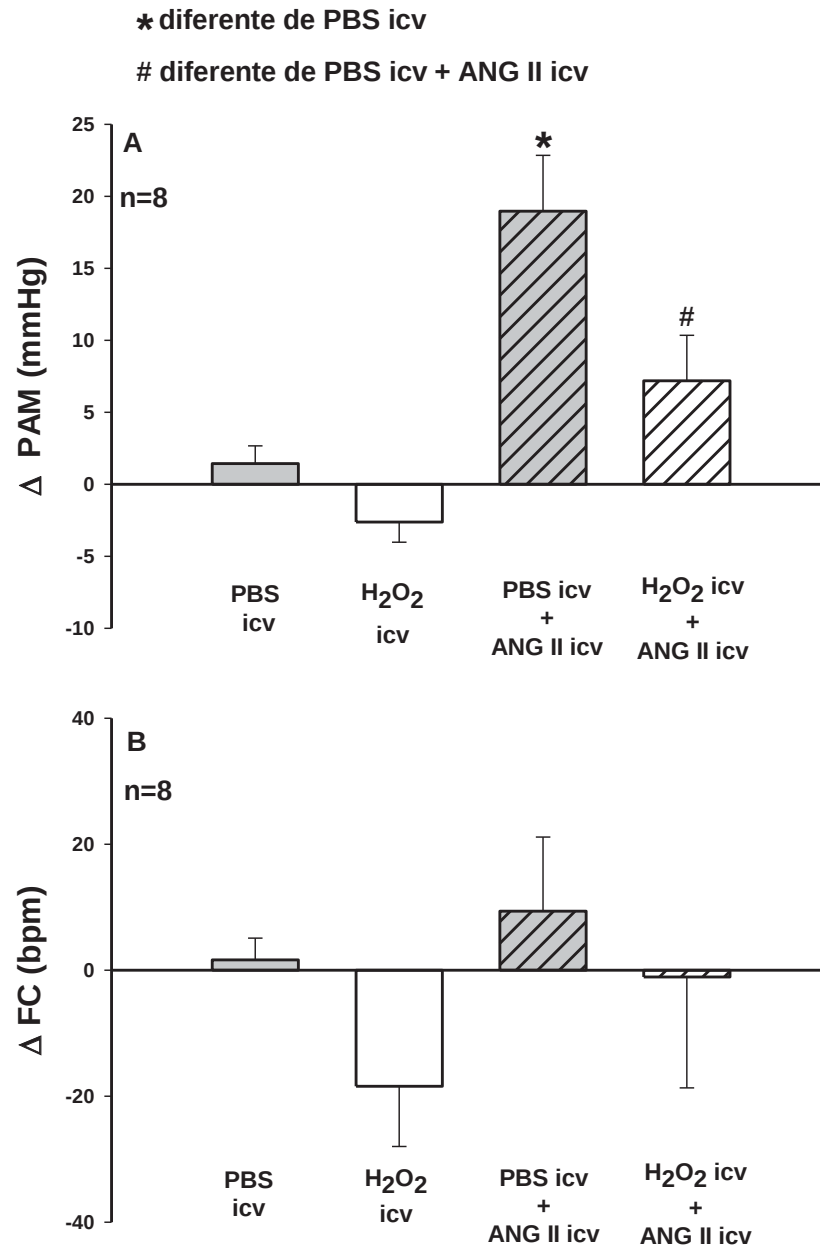


Figura I: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzida pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 μ l) combinada com injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 μ mol/1 μ l) em ratos normotensos. Os resultados são representados pela média $\pm$ EPM, n= número de animais.

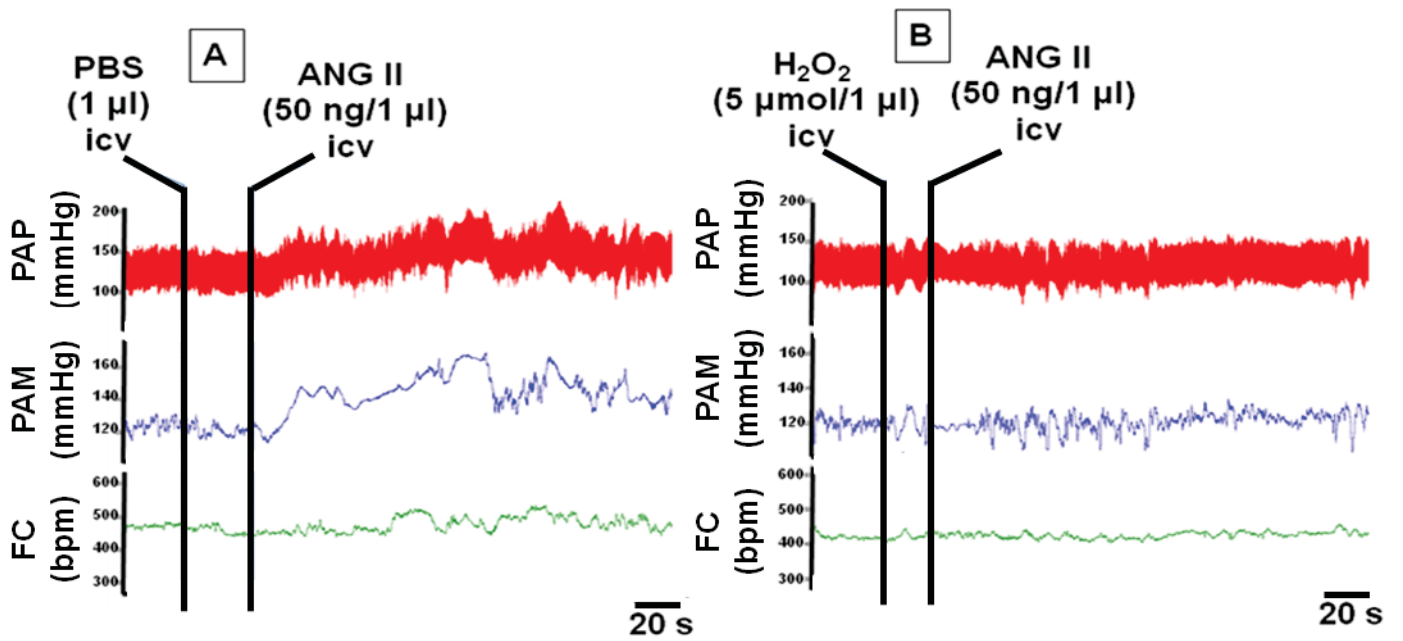


Figura II: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzida pela ANG II icv (50 ng/1 µl) depois de (A) veículo e (B) H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv em ratos normotensos.

8.3. Efeitos da administração de ATZ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos normotensos

O pré-tratamento com ATZ (5 nmol/1 μ l) icv também reduziu a resposta pressora da ANG II (50 ng/1 μ l) icv em 78% (5 ± 3 mmHg vs. controle: 23 ± 3 mmHg) [$F(3,36)=65,6$; $P<0,05$] (Fig IV). Injeções de ATZ (5 nmol/1 μ l) icv sozinho não produziu alterações na PAM e FC. Injeções de ANG II icv sozinha não alterou a FC, entretanto, ANG II icv reduziu a FC depois do pré-tratamento com ATZ [$F(3,36)=3,8$; $P<0,05$]. (Fig IV). A Figura V mostra o registro da PAP, PAM e FC de um rato representativo do grupo estudado tratado com salina ou AZT (5 nmol/1 μ l) icv combinados com ANG II (50 ng/1 μ l) icv.

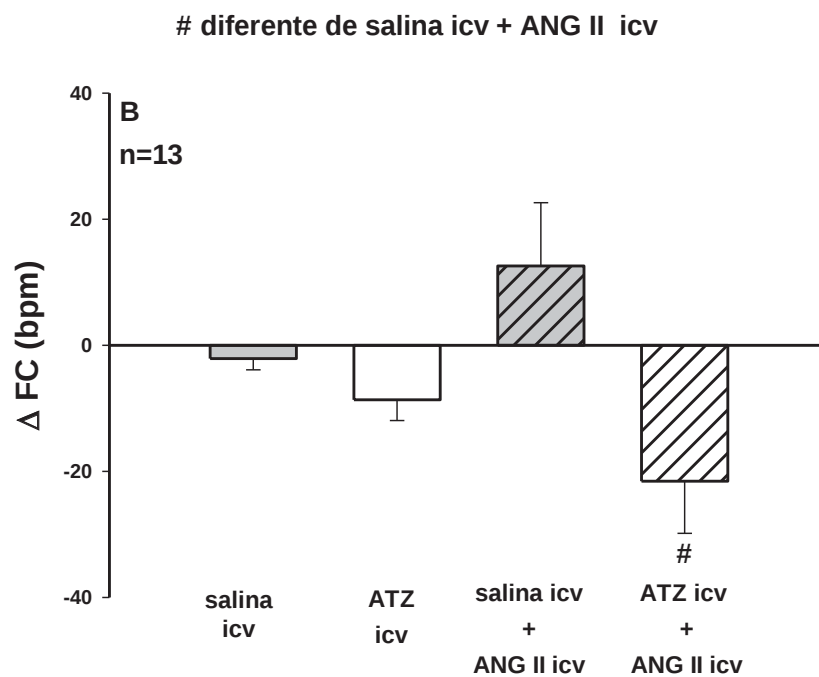
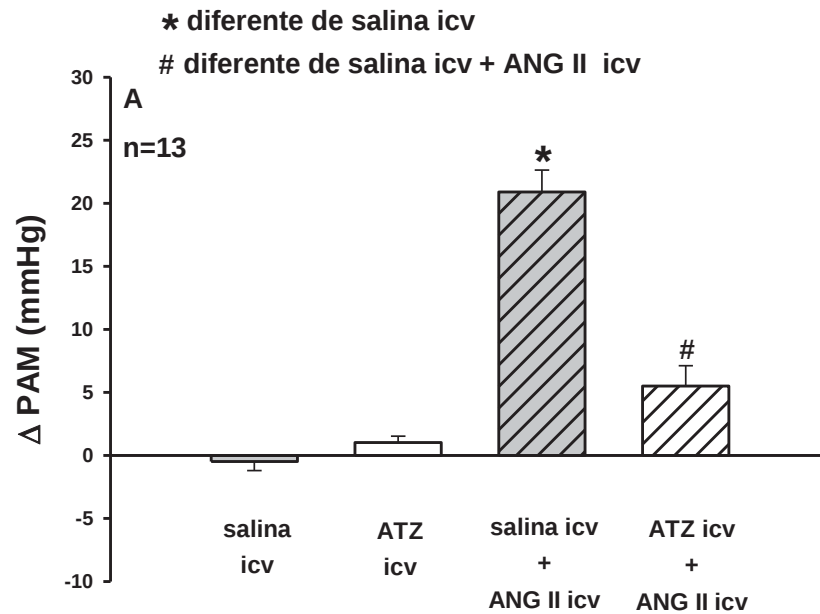


Figura III: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzida pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 μ l) combinada com injeções icv de salina ou ATZ (5 nmol/1 μ l) em ratos normotensos. Os resultados são representados pela média $\pm$ EPM, n= número de animais.

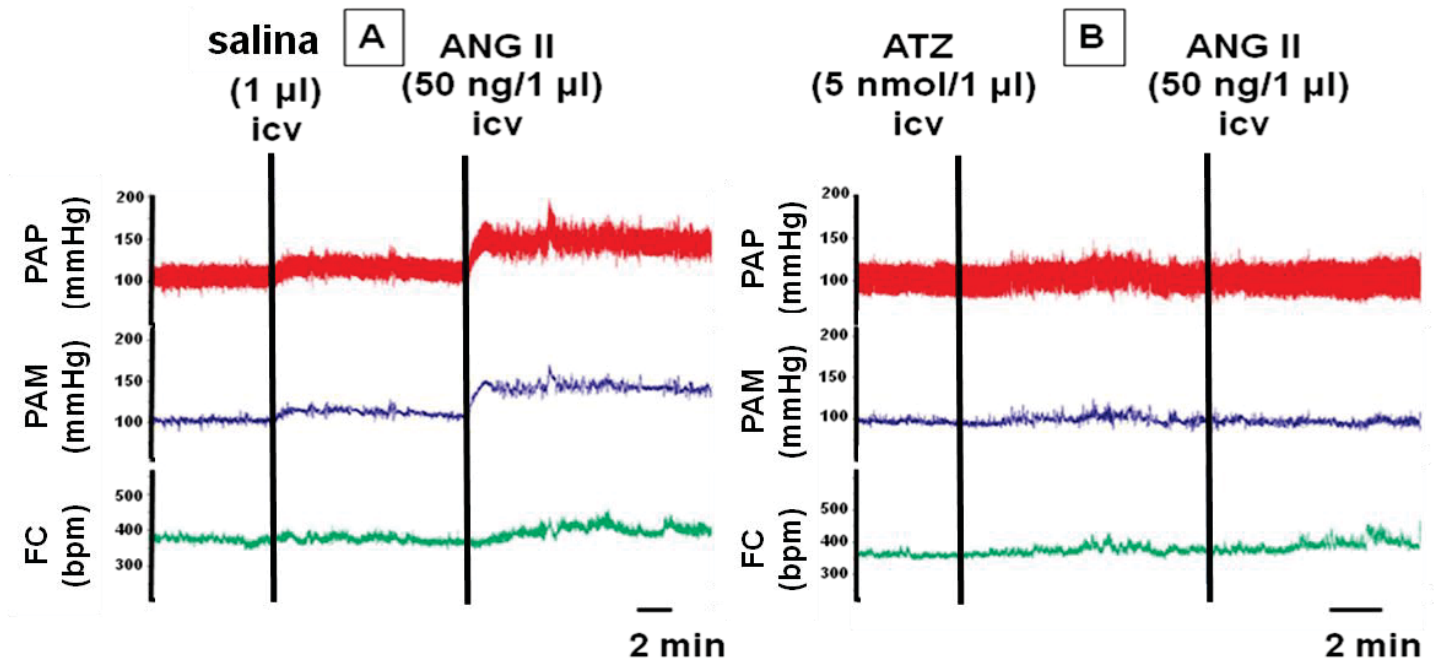


Figura IV: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzida pela ANG II icv (50 ng/1 µl) depois de (A) salina icv e (B) ATZ (5 nmol/1 µl) icv em ratos normotensos.

8.4. Efeitos da administração de ATZ i.v. combinado com H₂O₂ icv sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos normotensos

Injeções i.v. de ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) combinadas com injeções de H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv reduziram em 78% a resposta pressora produzida pela ANG II (50 ng/1 µL) icv (4 ± 1 mmHg vs. controle: 18 ± 2 mmHg) [$F(5, 42) = 11,5$; $P < 0,05$] (Fig VI). Todos os tratamentos realizados não modificaram a FC dos animais (Fig VI). A Figura VII mostra o registro da PAP, PAM e FC de um rato representativo do grupo estudado tratado com salina ou ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) i.v. combinado com H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv e ANG II (50 ng/1 µl) icv.

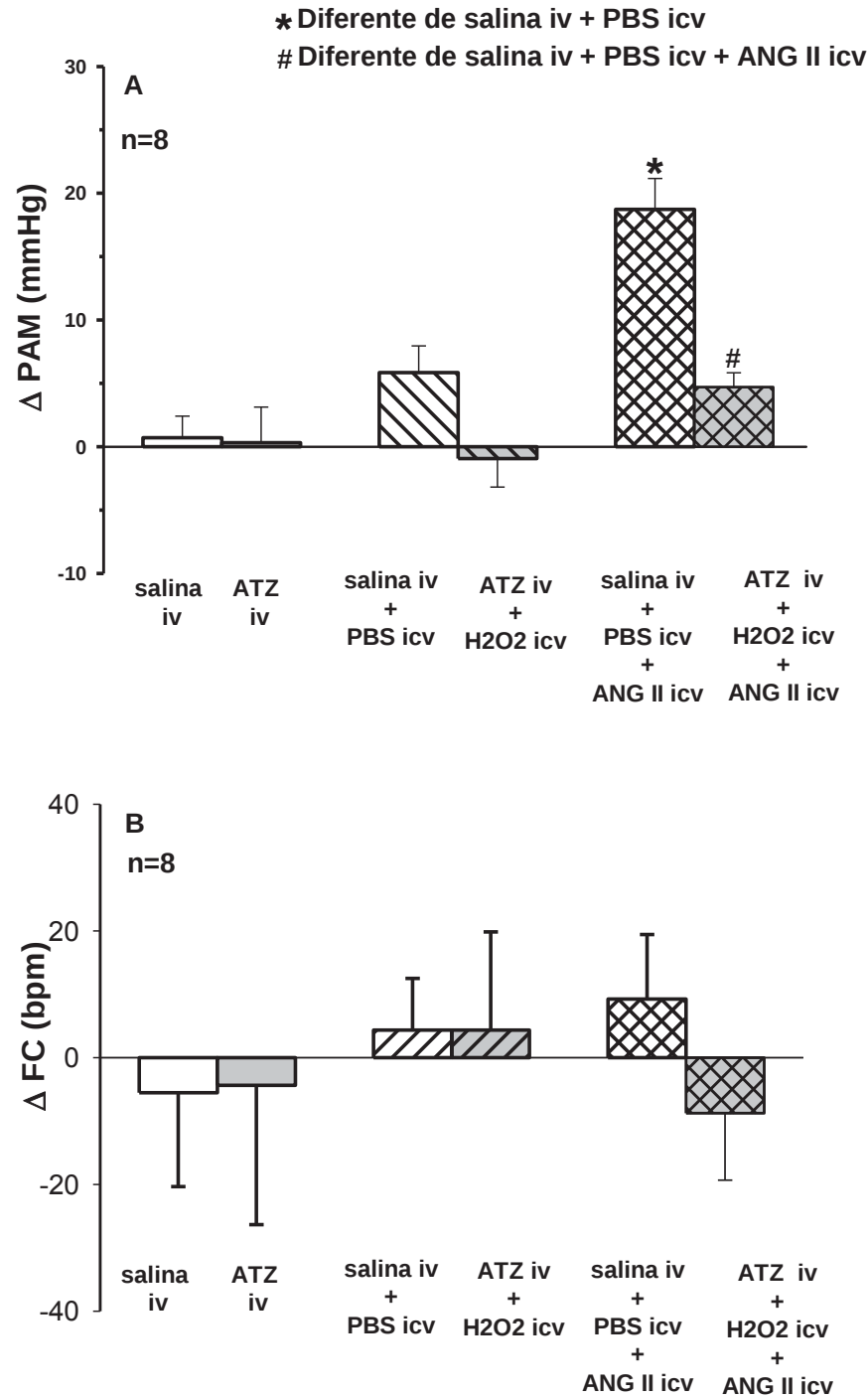


Figura V: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzidas pela ANG II (50 ng/1 μ l) icv em ratos pré-tratados com injeções i.v. de salina ou ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) combinadas com injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 μ mol/1 μ l) em ratos normotensos. Os resultados estão representados pela média $\pm$ EPM, n= número de animais.

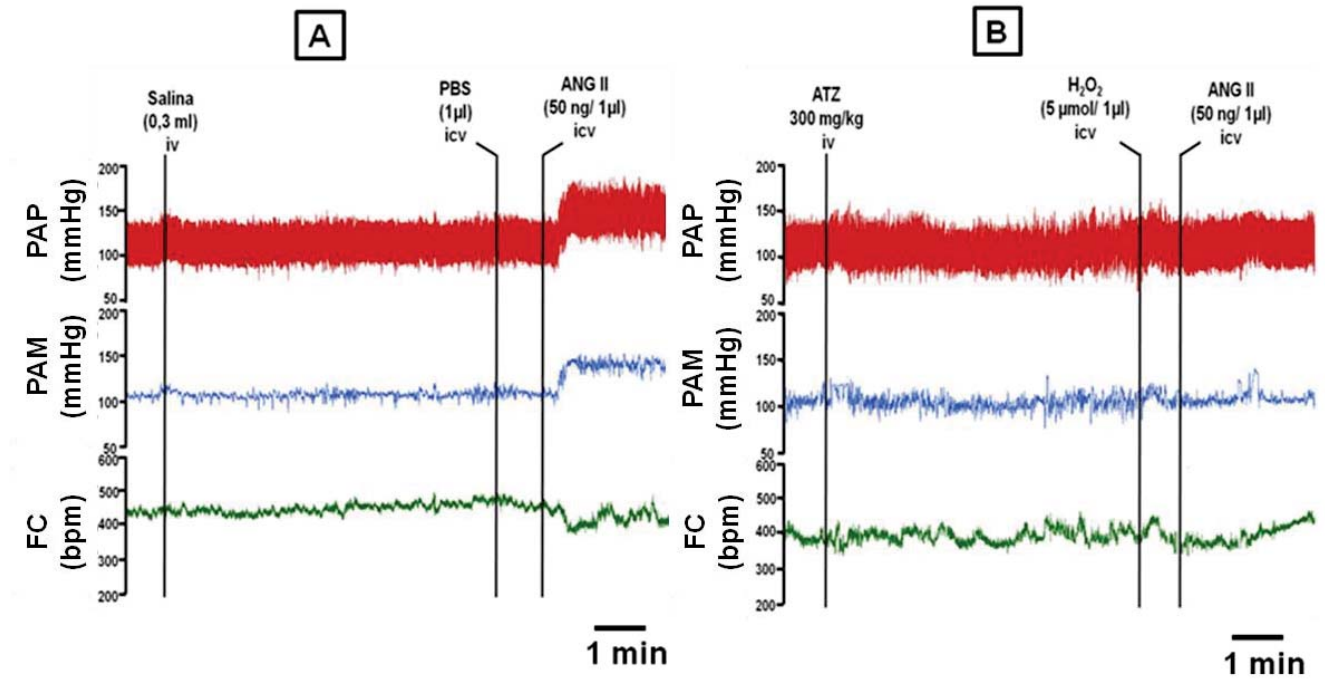


Figura VI: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzida pela ANG II icv (50 ng/1 µl) depois de (A) salina i.v. + PBS icv e (B) ATZ i.v. (3,6 mmol/kg de peso corporal) + H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv em ratos normotensos.

8.5. Efeitos da administração de H₂O₂ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos SHR

A resposta pressora da ANG II (50 ng/1 µl) icv foi reduzida em 50% pelo pré-tratamento com H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv em animais SHR (11 ± 3 mmHg vs. controle: 22 ± 5 mmHg) [$F(3,27)=17,77$; $P<0,05$] (Fig VII). Injeções de H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv sozinho não modificou a PAM. Injeções de H₂O₂ e ANG II icv sozinhos ou combinados não produziram alterações na FC (Fig VIII). A Figura IX mostra a PAP, PAM e FC de um rato representativo do grupo estudado tratado com veículo ou H₂O₂ (5 µmol/1 µl) combinados com ANG II (50 ng/1 µl) icv.

* Diferente de PBS icv

Diferente de PBS icv + ANG II icv

38

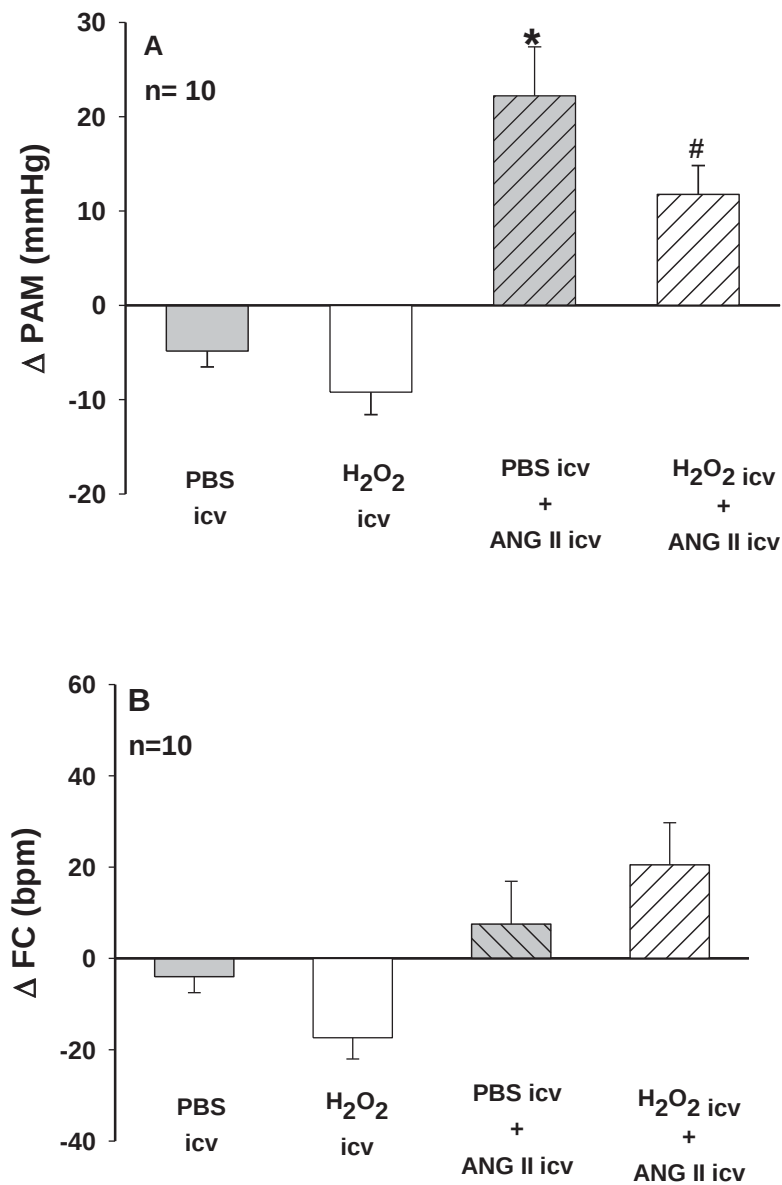


Figura VIII: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzida pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) combinada com injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 µmol/1 µl) em ratos SHR. Os resultados são representados pela média ± EPM, n= número de animais.

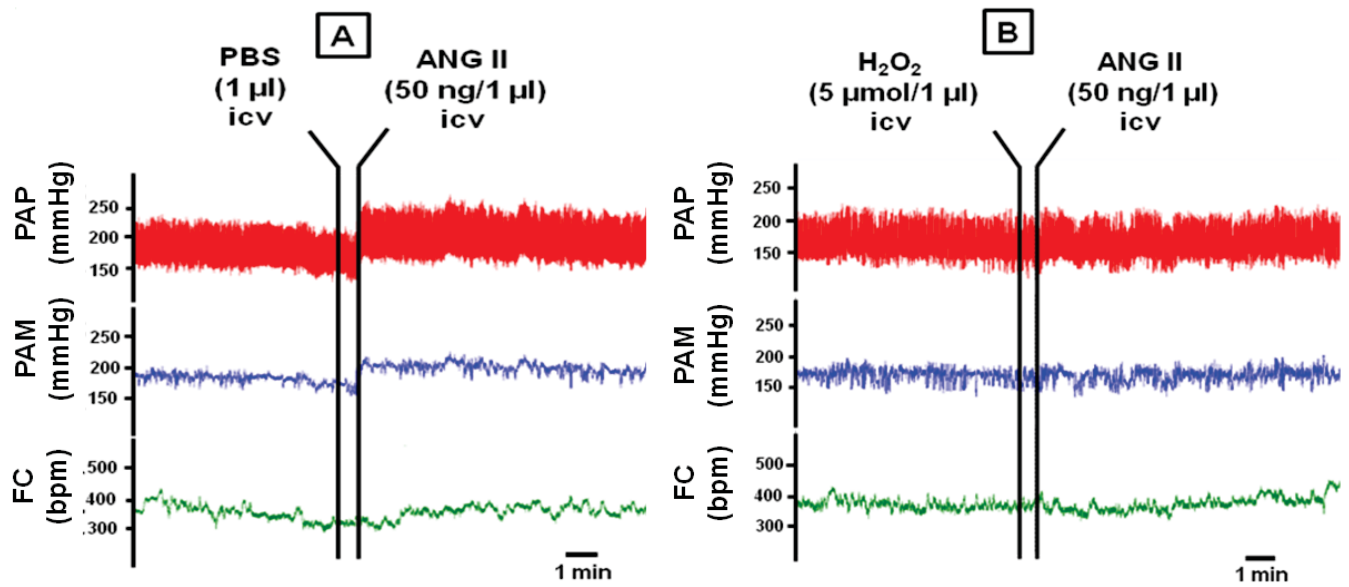


Figura IX: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzida pela ANG II icv (50 ng/1 µl) depois de (A) veículo icv e (B) H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv de ratos SHR.

8.6. Efeitos da administração de ATZ icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos SHR

O pré-tratamento com ATZ (5 nmol/1 μ l) icv também reduziu a resposta pressora da ANG II (50 ng/1 μ l) icv em 51% (17 ± 4 mmHg vs. controle: 35 ± 6 mmHg) [$F(3,15)=17,3$; $P<0,05$] (Fig X). Injeções de ATZ (5 nmol/1 μ l) icv sozinho não produziu alterações na PAM e FC. A Figura XI mostra o registro da PAP, PAM e FC de um rato representativo do grupo estudado tratado com salina ou AZT (5 nmol/1 μ l) icv combinados com ANG II (50 ng/1 μ l) icv.

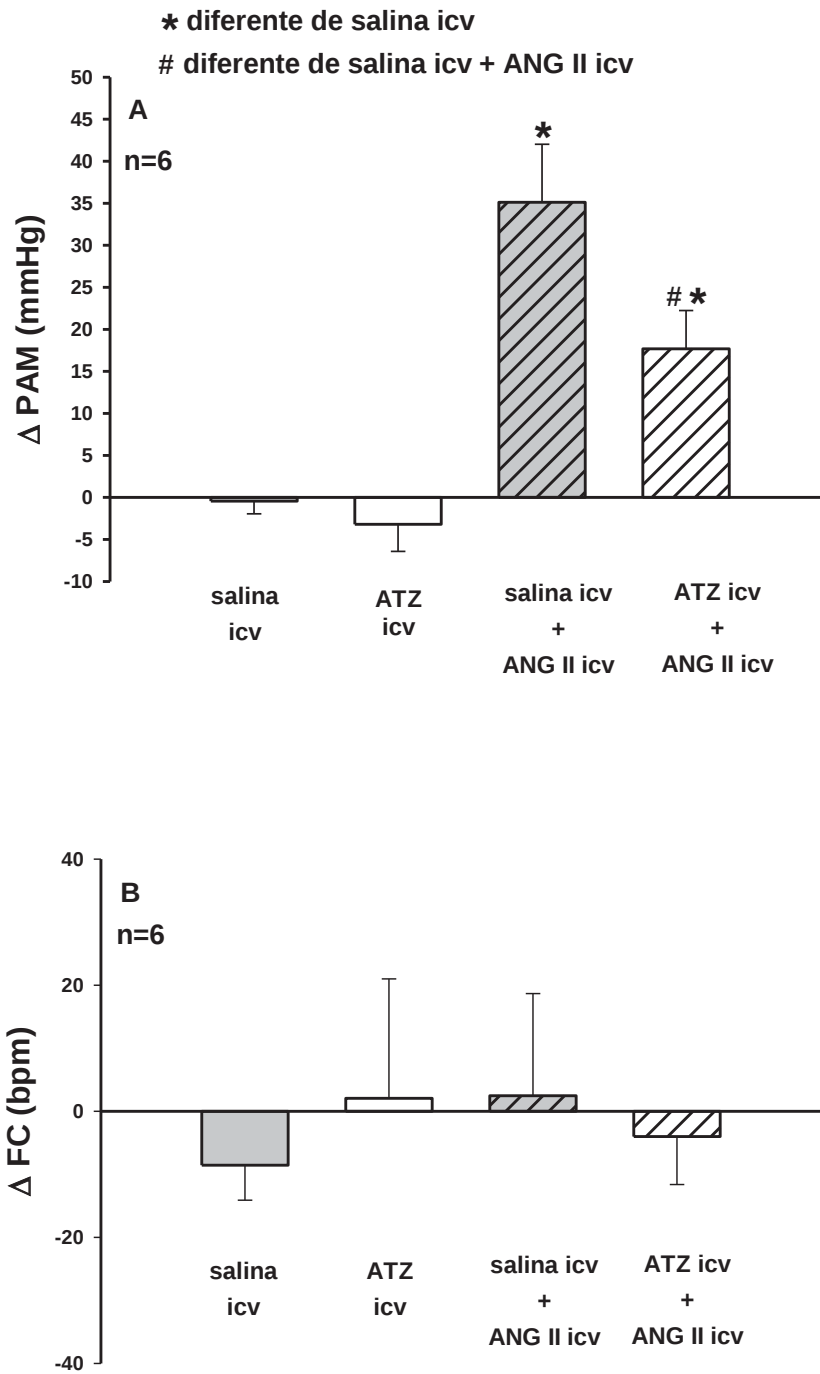


Figura X: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzida pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 μ l) combinada com injeções icv de salina ou ATZ (5 nmol/1 μ l) em ratos SHR. Os resultados são representados pela média $\pm$ EPM, n= número de animais.

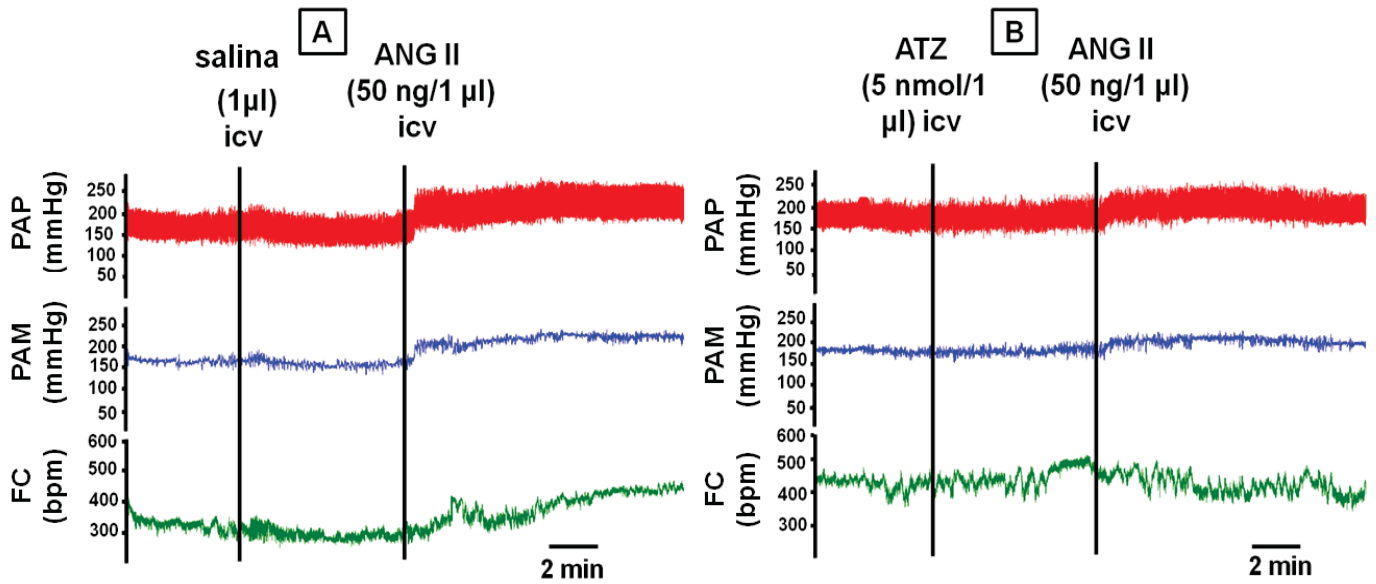


Figura XI: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzida pela ANG II icv (50 ng/1 µl) depois de (A) salina icv e (B) ATZ (5 nmol/1 µl) icv de ratos SHR

8.7. Efeitos da administração de ATZ i.v. combinado com H₂O₂ icv sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos SHR

Injeções i.v. de ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) combinadas com injeções de H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv reduziram em 57% a resposta pressora produzida pela ANG II (50 ng/1 µL) icv (13 ± 1 mmHg vs. controle: 29 ± 3 mmHg) [$F(5, 42) = 14,4$; $P < 0,05$] (Fig 2). Injeções i.v. de ATZ combinadas com H₂O₂ icv também reduziram a pressão arterial basal (-11 ± 2 mmHg vs. controle: $0,2 \pm 1$ mmHg) dos ratos (Fig XII). Todos os tratamentos realizados não modificaram a FC dos animais (Fig XII). A Figura XIII mostra o registro da PAP, PAM e FC de um rato representativo do grupo estudado tratado com salina ou ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) i.v. combinado com H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv e ANG II (50 ng/1 µl) icv.

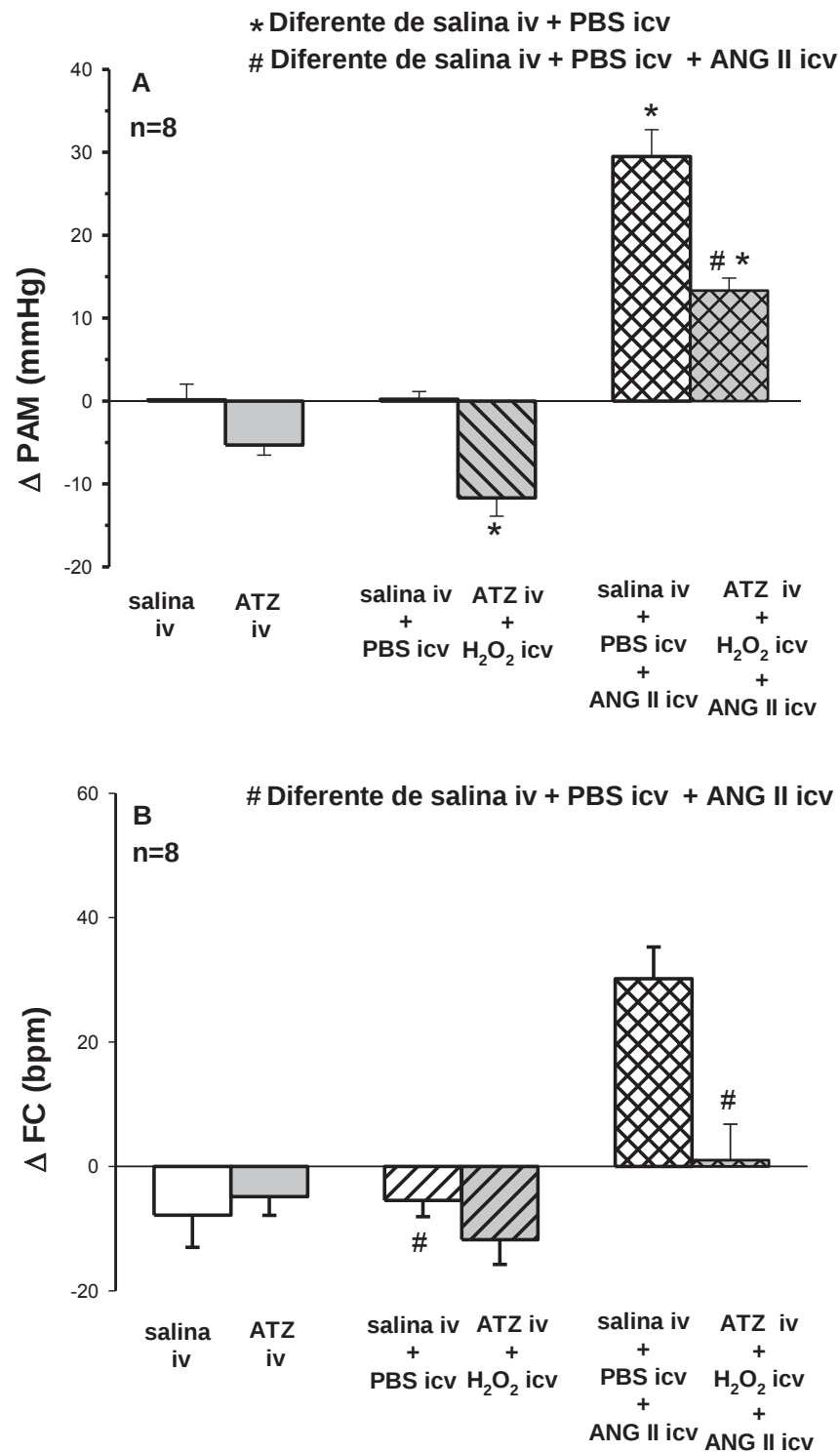


Figura XII: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzidas pela ANG II (50 ng/1 μ l) icv em ratos pré-tratados com injeções i.v. de salina ou ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) combinadas com injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 μ mol/1 μ l) em ratos SHR. Os resultados estão representados pela média $\pm$ EPM, n= número de animais.

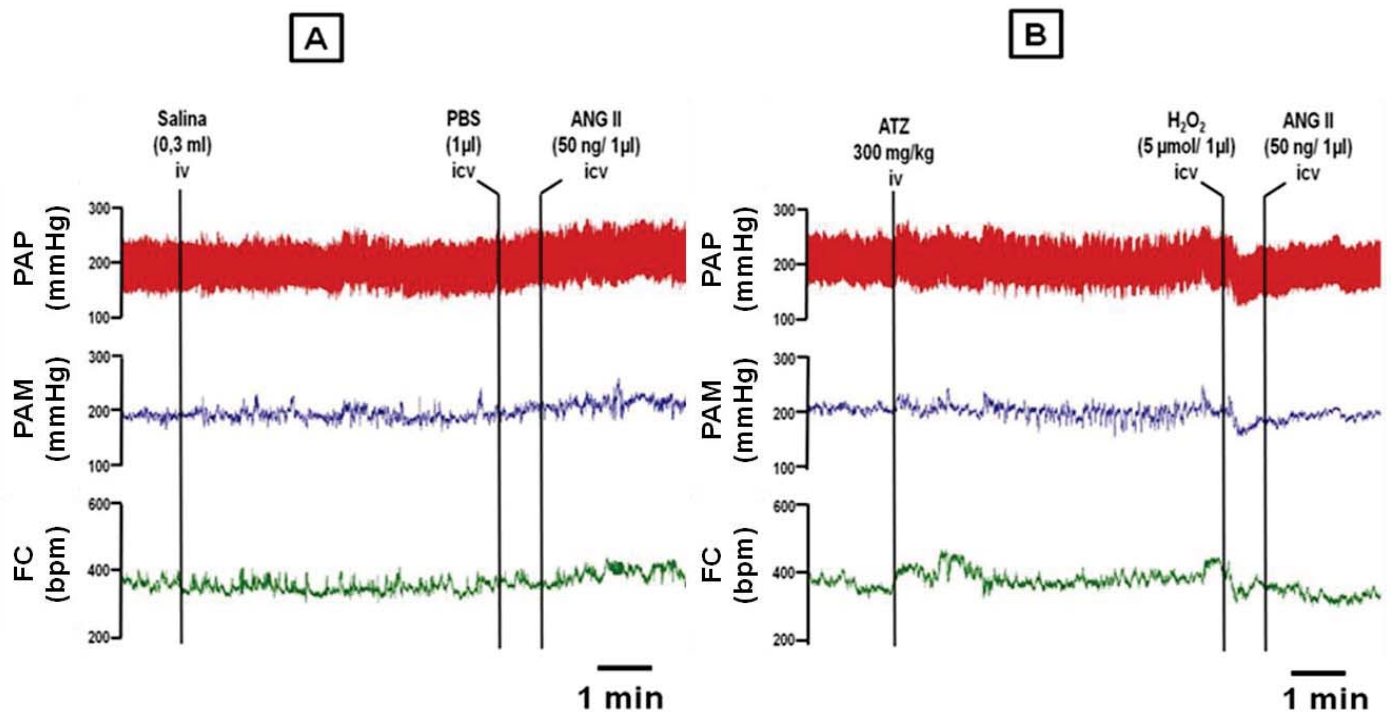


Figura XIII: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzidas pela ANG II icv (50 ng/1 µl) após injeções de (A) salina i.v. + veículo icv e (B) ATZ (3,6 mmol/kg) i.v. + H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv de ratos SHR

8.8. Efeitos da administração H_2O_2 icv sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos 2R1C

A resposta pressora da ANG II (50 ng/1 μ l) icv foi reduzida em 80% pelo pré-tratamento com H_2O_2 (5 μ mol/1 μ l) icv em animais com hipertensão 2 rins, 1 clipe (2R1C) (3 ± 1 mmHg, vs. controle: 15 ± 2 mmHg) [$F(4, 25) = 5,45$; $P < 0,05$] (Fig. XIV). Injeções de H_2O_2 (5 μ mol/1 μ l) icv sozinhas não reduziram significativamente a PAM basal (-6 ± 2 mmHg, vs. controle: 1 ± 1 mmHg). Injeções icv de H_2O_2 e de ANG II sozinhas ou combinadas não produziram alterações na FC (Fig. XIV). A Figura XV mostra o registro da PAP, PAM e FC de um rato representativo do grupo estudado tratado com veículo ou H_2O_2 (5 μ mol/1 μ l) combinados com ANG II (50 ng/1 μ l) icv.

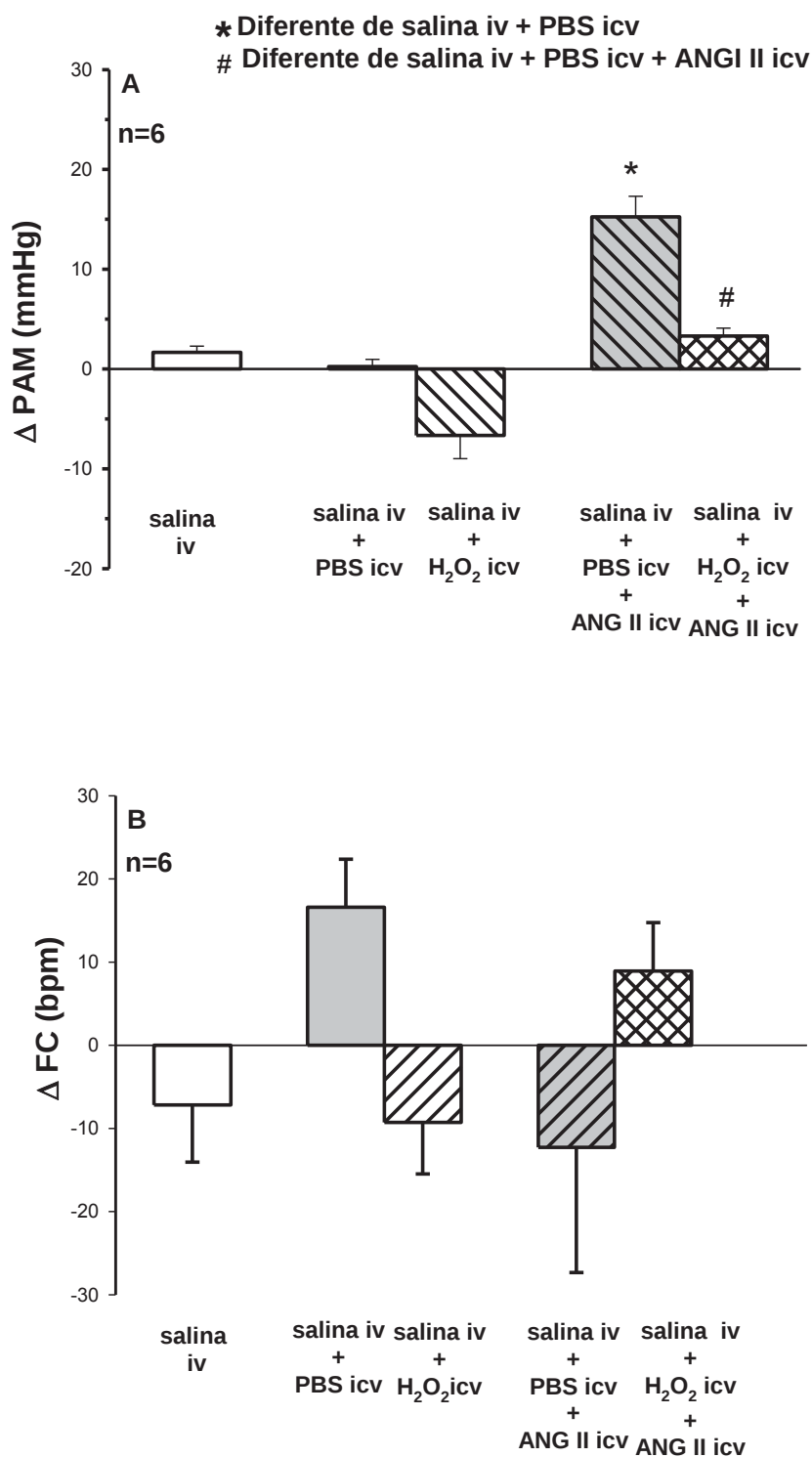


Figura XIV Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzidas pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 μ l) pré-tratados com injeção i.v. de salina + injeções icv de PBS ou H₂O₂ (5 μ mol/1 μ l) em ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média $\pm$ EPM, n = número de animais.

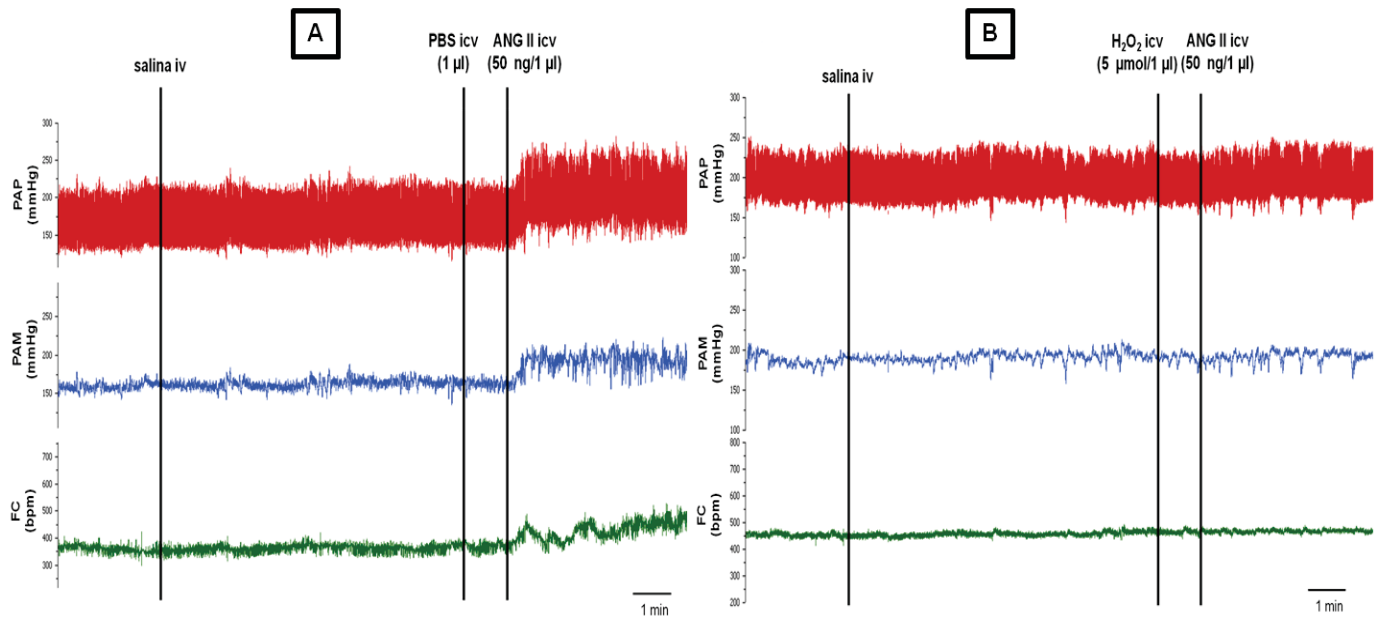


Figura XV: Registro representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzidas pela ANG II (50 ng/1 µl) injetada icv após injeção de (A) salina i.v. + veículo (PBS) icv e (B) salina i.v. + H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv em ratos com hipertensão 2R1C.

8.9. Efeitos da administração de ATZ i.v. sozinho sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos 2R1C

A resposta pressora da ANG II (50 ng/1 μ l) icv foi reduzida em 94% pelo pré-tratamento com ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) iv em animais com hipertensão 2R1C (1 ± 1 mmHg, vs. controle: 17 ± 1 mmHg) [$F(5, 42) = 18,35$; $P < 0,05$] (Fig. XVI). Injeções de ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) i.v. sozinhas reduziram a PAM basal (-13 ± 1 mmHg, vs. controle: 1 ± 1 mmHg). Injeções i.v. de ATZ e icv de ANG II sozinhas ou combinadas não produziram alterações na FC (Fig. XVI). A Figura XVII mostra o registro da PAP, PAM e FC de um rato representativo do grupo estudado tratado com salina i.v. ou ATZ i.v. (3,6 mmol/kg de peso corporal) combinados com ANG II (50 ng/1 μ l) icv

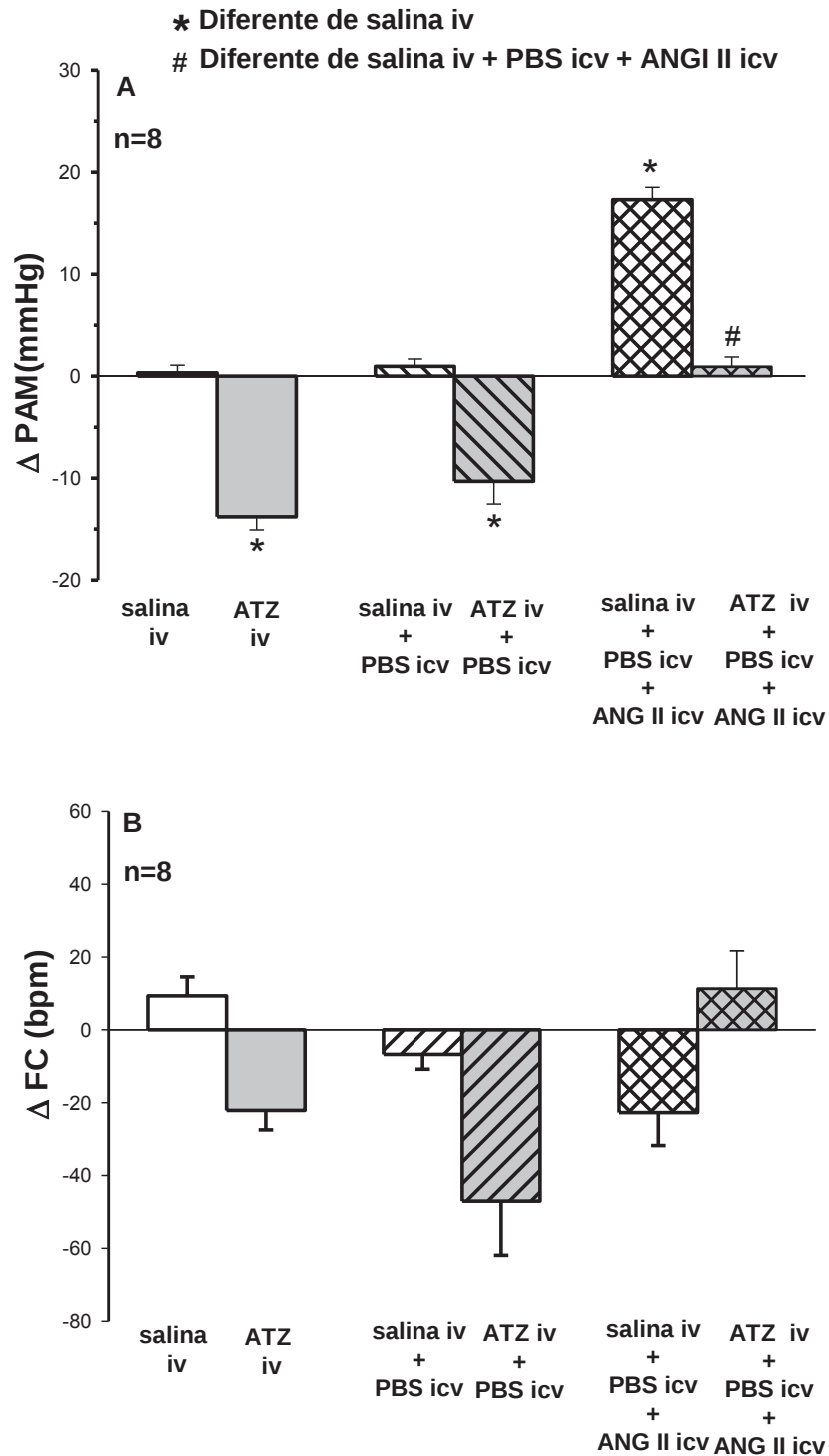


Figura XVI: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzidas pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 μ l) pré-tratados com injeções i.v. de ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) ou salina + PBS (1 μ l) icv em ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média $\pm$ EPM, n= número de animais.

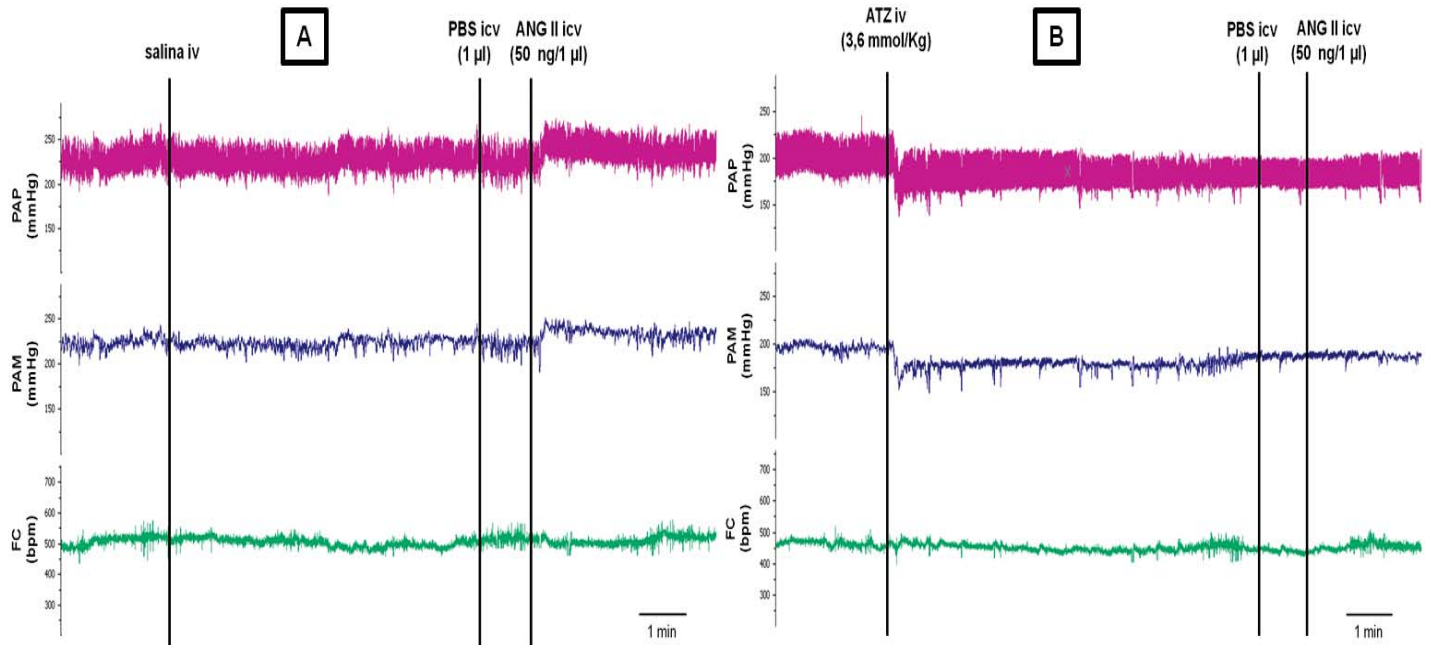


Figura XVII: Registro representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzidas pela injeção de ANG II (50 ng/1 µl) icv pré-tratados com injeções de (A) salina i.v. + veículo (PBS) icv e (B) ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) i.v. + PBS icv em ratos com hipertensão 2R1C.

8.10. Efeitos da administração de ATZ i.v. combinado com H₂O₂ icv sobre a resposta pressora induzida pela injeção de ANG II icv em ratos 2R1C

A resposta pressora da ANG II (50 ng/1 µl) icv foi reduzida em 79% pelo pré-tratamento com ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) i.v. + H₂O (5 µmol/1 µl) icv em ratos com hipertensão 2R1C (4 ± 1 mmHg, vs. controle: 19 ± 2 mmHg) [$F(5, 36) = 19,9$; $P < 0,05$] (Figs. 6A e 7). Injeções de ATZ i.v. sozinhas ou combinadas com H₂O₂ icv reduziram de maneira semelhante a PAM basal (-10 ± 1 e -11 ± 1 mmHg, respectivamente, vs. salina: -1 ± 1 mmHg) (Fig. XVIII). Injeções icv de ANG II e de ATZ i.v. + H₂O icv sozinhas ou combinadas não produziram alterações na FC (Fig. XVIII). A Figura XIX mostra o registro da PAP, PAM e FC de um rato representativo do grupo estudado tratado com salina ou ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) i.v. combinado com H₂O₂ (5 µmol/1 µl) icv e ANG II (50 ng/1 µl) icv.

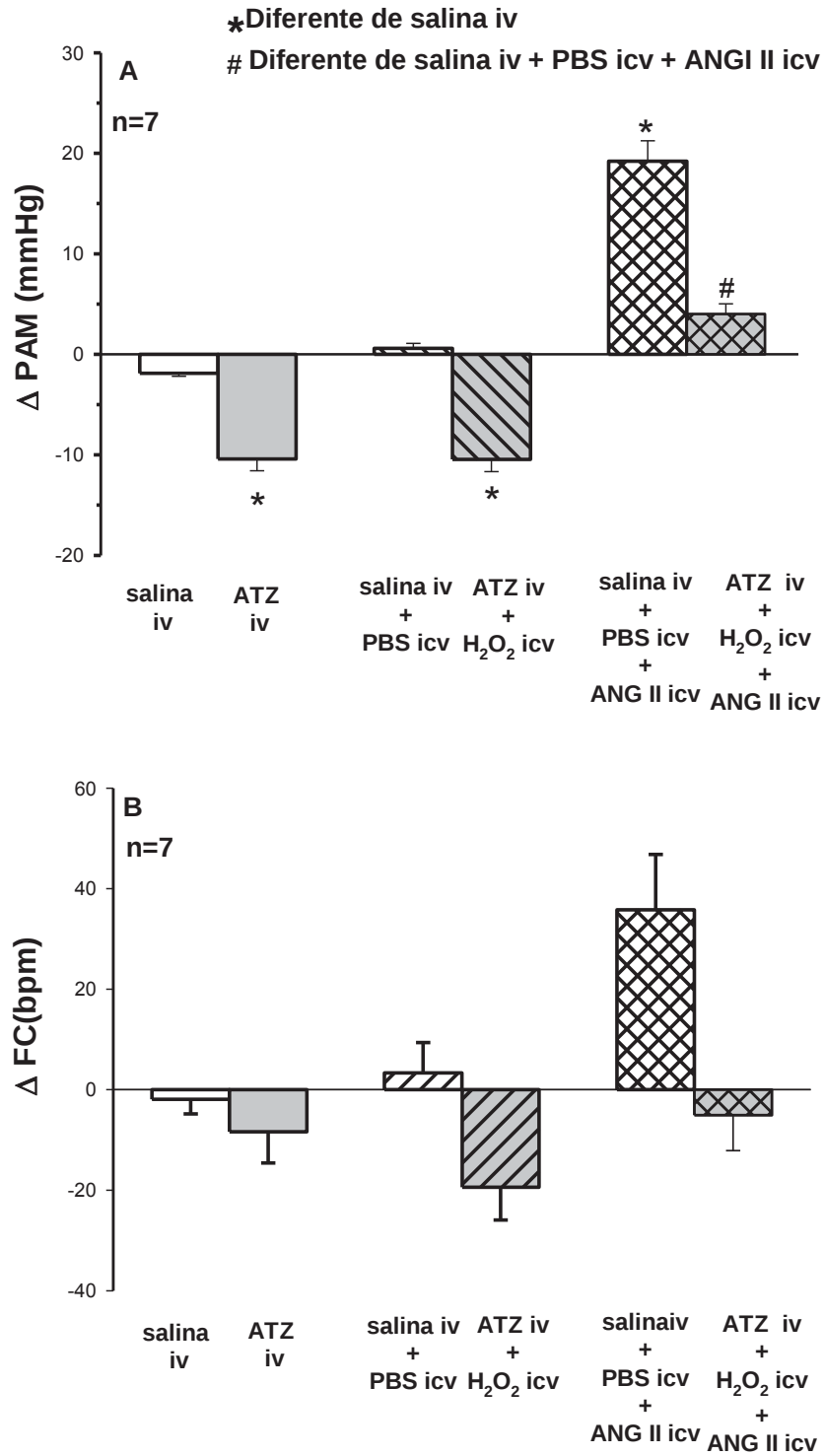


Figura XVIII: Mudanças na (A) PAM e (B) FC induzidas pela injeção icv de ANG II (50 ng/1 μ l) pré-tratados com injeções i.v. de ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) + H₂O₂ (5 μ mol/1 μ l) icv em ratos com hipertensão 2R1C. Os resultados estão representados pela média $\pm$ EPM, n= número de animais.

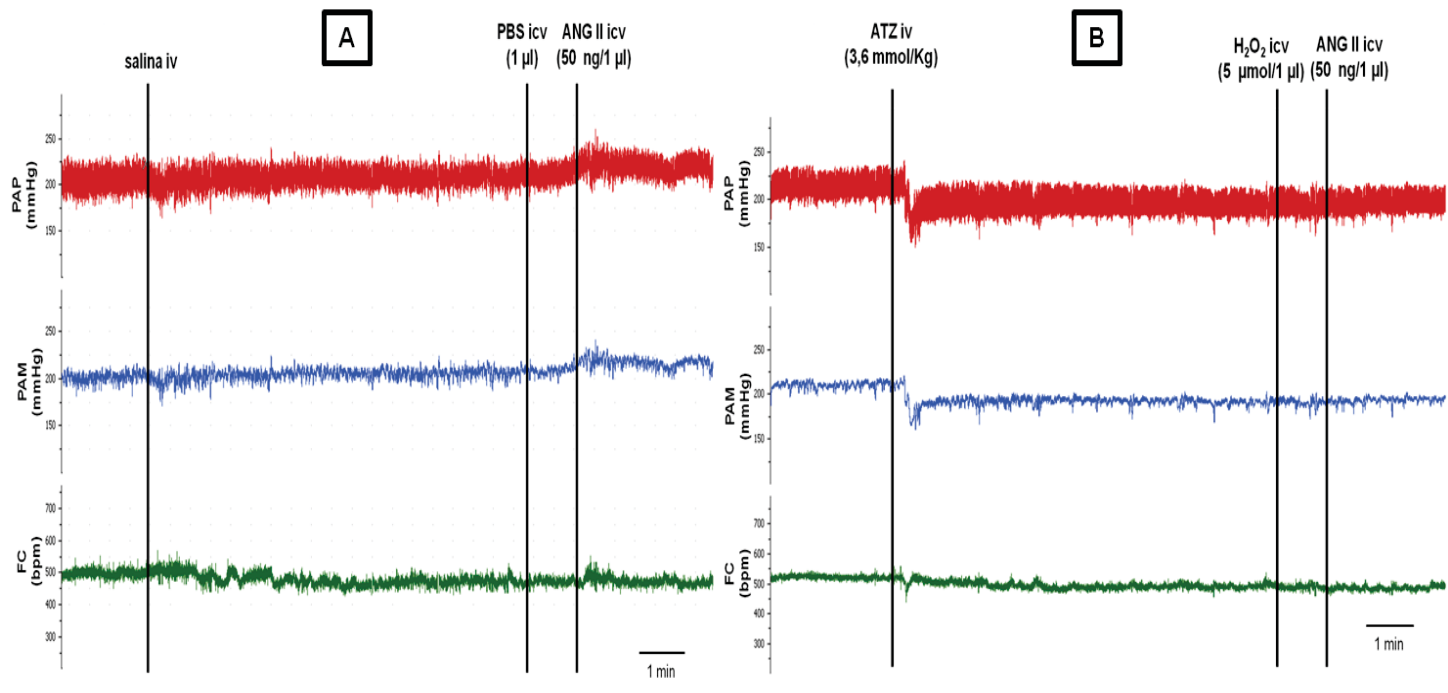


Figura XIX: Registro representativo mostrando mudanças na PAP, PAM, FC induzidas pela injeção de ANG II icv (50 ng/1 µl) pré-tratados com injeções de (A) salina i.v. + veículo (PBS) icv ou (B) ATZ (3,6 mmol/kg de peso corporal) i.v. + H₂O (5 µmol/1 µl) icv em ratos com hipertensão 2R1C

9. DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostram que as injeções icv de H_2O_2 ou ATZ reduziram fortemente a resposta pressora produzida pela injeção icv de ANG II em ratos normotensos ou hipertensos, sugerindo que o aumento nos níveis de H_2O_2 central de origem endógena ou exógena prejudica mecanismos pressores ativados pela ANG II central. Injeções i.v. de ATZ também quase aboliram a resposta pressora da ANG II icv em ratos normotensos. Injeção de ATZ i.v. combinada com injeção icv de H_2O_2 em ratos normotensos aboliu a resposta pressora induzida pela ANG II. Em ratos SHR, similarmente aos ratos normotensos, a injeção icv de H_2O_2 ou ATZ também reduziu a resposta pressora induzida pela ANG II. A injeção de ATZ i.v. combinada com a injeção icv de H_2O_2 aboliu a resposta pressora induzida pela ANG II, além de reduzir a pressão arterial basal de ratos SHRs. Além disso, os presentes resultados mostram que a injeção icv de H_2O_2 reduziu a resposta pressora da ANG II em ratos com hipertensão renovascular do tipo 2R1C, porém, não alterou significativamente a pressão arterial basal desses animais. Já a injeção i.v. do bloqueador da catalase, ATZ, aboliu a resposta pressora produzida pela injeção icv de ANG II, além de reduzir a pressão arterial basal dos ratos com hipertensão 2R1C. A injeção de ATZ i.v. combinada com a injeção de H_2O_2 icv produziu efeitos semelhantes aos do tratamento apenas com ATZ tanto na resposta pressora da ANG II icv, como na pressão arterial basal dos ratos com hipertensão 2R1C.

Os resultados sugerem que o aumento dos níveis de H_2O_2 centralmente prejudica mecanismos pressores ativados pela ANG II. Além disso, o aumento da concentração de H_2O_2 endógeno diminui a pressão arterial de ratos SHRs ou animais com hipertensão 2R1C. A redução da resposta pressora da ANG II pelos

tratamentos com ATZ i.v. ou H_2O_2 icv em ratos com hipertensão 2R1C são semelhantes aos efeitos observados em ratos normotensos, porém, mais intensa do que a redução da resposta pressora da ANG II pelos mesmos tratamentos em ratos SHR. No entanto, de maneira semelhante ao que ocorreu em ratos SHR, o tratamento com ATZ i.v. combinado com H_2O_2 icv reduziu a pressão arterial basal dos ratos com hipertensão 2R1C, um efeito que não foi observado em ratos normotensos. Além disso, nos ratos com hipertensão 2R1C, apenas o tratamento com ATZ i.v. foi suficiente para reduzir a pressão arterial basal de maneira semelhante ao que ocorreu com a combinação de ATZ i.v. e H_2O_2 icv, o que confirma que apenas o H_2O_2 endógeno é eficiente para bloquear mecanismos pressores envolvidos na hipertensão 2R1C. Assim, o aumento da disponibilidade de H_2O_2 causa redução da pressão arterial em animais hipertensos, particularmente dos ratos SHRs ou ratos com hipertensão 2R1C. Pelo menos em parte estes efeitos podem depender de uma redução dos efeitos centrais da ANG II. Assim, pode-se sugerir que ATZ quando injetado i.v. provavelmente produz seu efeito por atravessar a barreira hematoencefálica e, agindo centralmente, reduz a resposta pressora induzida pela ANG II central. Injeções de ANG II, H_2O_2 ou ATZ sozinhos ou combinados não produziram consistentes efeitos na FC. Injeções de H_2O_2 ou ATZ icv nas doses testadas também não produzem qualquer destruição neuronal que poderia afetar as respostas da ANG II. O efeito do H_2O_2 icv ou ATZ reduzindo a resposta pressora da ANG II é transitória e a recuperação completa da resposta pressora induzida pela ANG II ocorre quando os ratos receberam a segunda injeção de ANG II combinada com salina icv (controle) cerca de 4 horas ou no dia seguinte do primeiro experimento em que receberam ANG II combinada com H_2O_2 ou ATZ icv

ou i.v. Portanto, qualquer possibilidade de dano ou destruição de receptores angiotensinérgicos ou neurônios não é, também, a causa dos efeitos do H_2O_2 .

A resposta pressora da ANG II central é fortemente dependente da ativação de receptores angiotensinérgicos do tipo AT1, que são receptores acoplados à proteína G e localizados em neurônios dos órgãos circunventriculares que geram sinais facilitatórios para aumentar a secreção de vasopressina e ativação simpática. (Johnson et al., 1978; Johnson, 1985; Hoffman et al., 1977; Mahon et al., 1995). Os órgãos circunventriculares ativados diretamente pela ANG II icv são o órgão subfornical (SFO), órgão vascular da lâmina terminal, (OVLT) e núcleo preóptico mediano (MnPO). Destas regiões, sinais facilitatórios podem chegar ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e para a região rostroventrolateral do bulbo (RVL) para aumentar a atividade simpática e no PVN e núcleo supraóptico do hipotálamo (SON) para aumentar a secreção de vasopressina. (Hoffman et al., 1977; Johnson et al., 1978; Johnson, 1985; Mahon et al., 1995). Embora H_2O_2 possa atuar em qualquer um desses núcleos para reduzir a resposta pressora da ANG II icv, as principais áreas envolvidas nos efeitos do H_2O_2 são provavelmente os órgãos circunventriculares facilmente alcançados pelo H_2O_2 injetado icv. Portanto, sem excluir completamente outras possibilidades, H_2O_2 icv poderia atuar nos mesmos sítios ou até mesmo em neurônios diretamente ativados pela ANG II icv.

Resultados preliminares de nosso laboratório demonstraram que H_2O_2 injetado icv também reduziu a resposta dipsogênica da ANG II icv (Giglioti et al., 2006). Portanto, os efeitos de H_2O_2 injetado centralmente não são específicos para a resposta pressora induzida pela ANG II. Lesões na área anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) que inclui o OVLT, MnPO e núcleo preóptico periventricular quase aboliu a resposta pressora e dipsôgenica do ANG II icv, sugerindo que mecanismos

importantes para a resposta pressora da ANG II icv estão presentes nessas áreas. (Brody et al., 1978; Johnson et al., 1978; Menani et al., 1990). Várias substâncias injetadas dentro do ventrículo lateral facilmente atingem a região AV3V e podem afetar respostas dependentes da atividade dessa área. Portanto, H₂O₂ injetado icv pode reduzir a atividade neural na região AV3V que é essencial para a resposta pressora da ANG II icv. É importante observar que injeções icv de H₂O₂ ou ATZ, similarmente à lesão AV3V, reduziram a resposta pressora da ANG II, entretanto, não modificaram significativamente a pressão arterial basal em ratos normotensos, o que novamente reforça a sugestão de que mecanismos integrados na região AV3V podem estar envolvidos na inibição da resposta pressora da ANG II pelo H₂O₂ exógeno ou endógeno atuando centralmente, ou seja, remoção de mecanismos pressores da área AV3V pela lesão ou ação do H₂O₂ central afetaria a resposta pressora da ANG II icv sem mudanças na pressão arterial basal. Embora os presentes resultados não demonstrem um significativo efeito do ATZ injetado i.v. ou H₂O₂ injetado dentro do ventrículo lateral na PAM ou FC basal em ratos normotensos, estudos prévios mostraram que injeções de H₂O₂ dentro do quarto ventrículo ou de H₂O₂ ou ATZ no núcleo do trato solitário (NTS), em menores doses do que as doses usadas no presente estudo, induziram respostas hipotensora e bradicárdica, sugerindo que H₂O₂ pode, diferentemente, afetar mecanismos envolvidos no controle cardiovascular dependendo do sítio específico de ação no cérebro (Cardoso et al., 2006, 2009).

Agindo centralmente, H₂O₂ pode afetar a excitabilidade neural através de diferentes mecanismos que incluem mudanças na neurotransmissão ou ativação de canais de íons. Estudos demonstraram que H₂O₂ pode bloquear captação de glutamato pelas células da glia, que pode resultar em um aumento extracelular dos

níveis de glutamato e o que aumentaria a excitabilidade neural (Sorg et al., 1997; Volterra et al., 1994). Por outro lado, H_2O_2 pode também reduzir a excitabilidade neural como consequência da inibição da liberação de glutamato ou aumento da liberação de GABA ou ativação de canais de K_{ATP} (Zoccarato et al., 1995, 1999; Sah et al., 2002; Takahashi et al., 2007; Bao et al., 2005; Avshalumov et al., 2005). O presente estudo sugere que o aumento dos níveis de H_2O_2 centralmente, mesmo quando injetado sozinho, ou quando combinado pela injeção de ATZ i.v., que poderia atravessar a barreira hematoencefálica, aumentando a disponibilidade de H_2O_2 endógeno centralmente, reduz os sinais facilitatório envolvidos na resposta pressora induzida pela ANG II central, entretanto, eles não permitem concluir quais seriam os mecanismos ativados por H_2O_2 centralmente que reduzem os sinais facilitatórios produzidos pela ANG II. Como sugerido acima, H_2O_2 pode atuar diminuindo a atividade neural na região AV3V reduzindo a resposta pressora da ANG II central. Estudos futuros serão necessários para investigar quais são as áreas centrais e os mecanismos envolvidos na inibição induzida pelo H_2O_2 na resposta da ANG II.

A liberação de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela ativação central de receptores AT1 é considerado parte da sinalização de mecanismos ativados pela ANG II e um passo essencial para ativação de mecanismos centrais envolvidos nas respostas pressora e dipsogênica induzidos pela atuação da ANG II central (Zimmerman et al., 2002, 2004a; Zimmerman and Davisson, 2004). A superexpressão central da enzima superóxido dismutase (SOD) reduz os níveis de $O_2^{\bullet-}$ centralmente e a resposta pressora da ANG II central (Zimmerman et al., 2002, 2004a,b; Zimmerman and Davisson, 2004). Embora mudanças na atividade de SOD não necessariamente afetem os níveis de H_2O_2 (Teixeira et al., 1998; Gardner et al., 2002; Chan et al., 2006; Kowald et al., 2006), os efeitos de H_2O_2 na resposta

pressora da ANG II central levanta questões sobre a possibilidade do envolvimento de H_2O_2 na inibição das respostas pressoras e dipsogênica induzidas pelas ANG II pela superexpressão da SOD, que pode ser testada em estudos futuros.

Em resumo, resultados prévios (Zimmerman et al., 2002; Zimmerman et al., 2004a; Zimmerman and Davisson, 2004) e os presentes resultados sugerem que $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 possuem papéis opostos na resposta pressora ativada pela ANG II centralmente. Considerando que SOD pode controlar os níveis dessas duas EROs, esta enzima pode ter um importante papel na modulação dos efeitos centrais da ANG II. Entretanto, com os presentes resultados não é possível excluir fontes e mecanismos alternativos para a inibição da resposta pressora da ANG II central pelo aumento dos níveis de H_2O_2 centralmente.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z (1999) Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18:6104-6111.

Aizenman E, Lipton SA, Loring RH (1989) Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 2:1257-1263.

Avshalumov MV, Chen BT, Kóos T, Tepper JM, Rice ME (2005) Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci* 25:4222-4231.

Bao L, Avshalumov MV, Patel JC, Lee CR, Miller EW, Chang CJ, Rice ME (2009) Mitochondria are the source of hydrogen peroxide for dynamic brain-cell signaling. *J Neurosci* 29:9002-9010

Bao L, Avshalumov MV, Rice ME (2005) Partial mitochondrial inhibition causes striatal dopamine release suppression and medium spiny neuron depolarization via H₂O₂ elevation, not ATP depletion. *J Neurosci* 25:10029-40.

Brody MJ, Fink GD, Buggy J, Haywood JR, Gordon FJ, Johnson AK (1978) The role of the anteroventral third ventricle (AV3V) region in experimental hypertension. *Circ Res* 43: 1-13.

Brody MJ, O'Neil TP, Porter JP (1984) Role of central catecholaminergic systems in the pathogenesis and treatment of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 6: S727–S741.

Campese VM, Sindhu RK, Ye S, Bai Y, Vaziri ND, Jabbari B (2007) Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain. *Brain Res* 1134:27 – 32.

Cardoso LM, Colombari DSA, Menani JV, Chianca-Jr DA, Colombari E (2006) Cardiovascular responses produced by central injection of hydrogen peroxide in conscious rats. *Brain Res Bull* 71:37-44.

Cardoso LM, Colombari DS, Menani JV, Toney GM, Chianca DA Jr, Colombari E (2009) Cardiovascular responses to hydrogen peroxide into the nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol* 297:R462-469.

Colombari, D. S. A., A. S. Haibara, L. A. A. Camargo, W. A. Saad, A. Renzi, L. A. De Luca Jr, and J. V. Menani (1994) Role of medial septal area on the cardiovascular, fluid and electrolytic responses to angiotensin II and cholinergic activation into the subfornical organ in rats: *Brain Res.Bull.*, v. 33, p. 249-254.

Colombari, E., W. A. Saad, L. A. A. Camargo, A. Renzi, L. A. De Luca Jr, and J. V. Menani (1992) AV3V lesion supresses the pressor, dipsogenic and natriuretic responses to cholinergic activation of the septal area in rats: *Brain Res.*, v. 572, p. 172-175.

Chan SH, Tai MH, Li CY, Chan JYH (2006) Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Biol Med* 40: 2028-39.

Chen BT, Avshalumov MV, Rice ME (2001) H_2O_2 is a novel, endogenous modulator of synaptic dopamine release. *J Neurophysiol* 85:2468-2476.

Dampney, R. A. L (1994) Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system: *Physiological Reviews*, v. 74, no. 2, p. 323-364.

Gardner R, Salvador A, Moradas-Ferreira P (2002). Why does SOD overexpression sometimes enhance, sometimes decrease, hydrogen peroxide production? A minimalist explanation. *Free Radic Biol Med* 32: 1351-7.

Giglioti, C, L M Cardoso, J V Menani, E Colombari, D S A Colombari (2006) Central injections of hydrogen peroxide inhibit angiotensin II-induced water intake. *Soc.Nerosci.Abstract*.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW (1934) Studies on experimental hypertension: I. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*. Feb 28;59(3):347-79

Goldblatt H (1938) Experimental hypertension induced by renal ischemia. *Bull N Y Acad Med*. Sep;14(9):523-53.

Goldblatt H (1958) Experimental renal hypertension; mechanism of production and maintenance. *Circulation*. Apr;17(4, Part 2):642-7.

Haeusler G, Finch L, Thoenen H (1972) Central adrenergic neurons and the initiation and development of experimental hypertension. *Experientia* 28:1200–1203.

Hatzinikolaou, P., H. Gavras, H. R. Brunner, and I. Gavras (1981) Role of vasopressin, catecholamines and plasma volume in hypertonic saline-induced hypertension: *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.*, v. 240, p. H827-H831.

Hoffman WE, Philips MI, Schmid PG, Falcon J, Weet JF (1977) Antidiuretic hormone release and the pressor response to central angiotensin II and cholinergic stimulation. *Neuropharmacology*: 16:463-472.

Irani, K. (2000) Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling: *Circulation Research*, v. 87, p. 179-183.

Jiang, B., J. H. Liu, Y. M. Bao, and L. An (2003) Hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells and the protective effect of puerarin: *Cell Biol.Int.*, v. 27, p. 1026-1031.

Johnson, AK, Hoffman WE, Buggy J (1978) Attenuated pressor responses to intracranially injected stimuli and altered antidiuretic activity following preoptic hypothalamic periventricular ablations. *Brain Res* 157:161-166.

Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Murphy WR, Hockel GM. (1976) Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in spontaneously hypertensive rat. *Circ Res* 38: II-21–II-29.

Kowald A, Lehrach H, Klipp E (2006) Alternative pathways as mechanism for the negative effects associated with overexpression of superoxide dismutase. *J Theor Biol.* 2006 238:828-40.

Maker HS, Weiss C, Silides DJ, Cohen G (1981) Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates *J Neurochem* 36:589–593.

McKinley, M. J., and A. K. Johnson (2004) The Physiological Regulation of Thirst and Fluid Intake: *News Physiol.Sci.*, v. 19, no. 1, p. 1-6.

Menani JV, Saad WA, Camargo LAA, Renzi A, De Luca Jr LA, Colombari E (1990) The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol. *Neurosc. Lett.* 113: 339-344.

Miyajima, E., and R. D. Bunag (1984) Sympathetic hyperactivity elevates blood pressure during acute cerebroventricular infusions of hypertonic salt in rats: *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, v. 6, p. 844-851.

Mori K. (1973) Participation of the sympathetic nervous system in spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 37: 609–618.

Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, Menani JV (2009) Antihypertensive effects of central ablations in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Jun;296(6):R1797-806.

Peterson JR, Burmeister MA, Tian X, Zhou Y, Guraju MR, Stupinski JA, Sharma RV, Davisson RL (2009) Genetic silencing of Nox2 and Nox4 reveals differential roles of these NADPH oxidase homologues in the vasopressor and dipsogenic effects of brain angiotensin II Hypertension 54:1106-14.

Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, Kang SW (2003) Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol*. 14(Suppl 3):S211-215.

Sah R, Galeffi F, Ahrens R, Jordan G, Schwartz-Bloom RD (2002) Modulation of the GABA(A)-gated chloride channel by reactive oxygen species. *J Neurochem* 80:383-391.

Sorg O, Horn TF, Yu N, Gruol DL, Bloom FE (1997) Inhibition of astrocyte glutamate uptake by reactive oxygen species: role of antioxidant enzymes. *Mol Med* 3:431-440.

Takahashi A, Mikami M, Yang J (2007) Hydrogen peroxide increases GABAergic mIPSC through presynaptic release of calcium from IP3 receptor-

sensitive stores in spinal cord substantia gelatinosa neurons. *Eur J Neurosci* 25:705-716.

Teixeira HD, Schumacher RI, Meneghini R (1998) Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7872-5.

Volterra A, Trotti D, Tromba C, Floridi S, Racagni G (1994) Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* 14: 2924-2932.

Weinberg, E. D. (1990), Cellular iron metabolism in health and disease: *Drug Metab.Rev.*, v. 22, p. 531-579.

Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A (2002) Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem* 277:23150-6

Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL (2002) Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 91:1038-1045.

Zimmerman MC, Davisson RL (2004) Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function. *Prog Biophys Mol Biol* 84:125-149.

Zimmerman MC, Dunlay RP, Lazartigues E, Zhang Y, Sharma RV, Engelhardt JF, Davisson RL (2004a) Requirement for Rac1-dependent NADPH oxidase in the cardiovascular and dipsogenic actions of angiotensin II in the brain. *Circ Res* 95:532-539.

Zimmerman MC, Lazartigues E, Sharma RV, Davisson RL (2004b) Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res* 95:210-216.

Zimmerman MC, Sharma RV, Davisson RL (2005) Superoxide mediates angiotensin II-induced influx of extracellular calcium in neural cells. *Hypertension* 45:717-23.

Zoccarato F, Valente M, Alexandre A (1995) Hydrogen peroxide induces a long-lasting inhibition of the Ca^{2+} -dependent glutamate release in cerebrocortical synaptosomes without interfering with cytosolic Ca^{2+} . *J Neurochem* 64:2552-2558.

Zoccarato F, Cavallini L, Valente M, Alexandre A (1999) Modulation of glutamate exocytosis by redox changes of superficial thiol groups in rat cerebrocortical synaptosomes. *Neurosci Lett* 1999 274:107-110.