

Anexo 1

Resumo

A hipertensão essencial é uma doença que afeta cerca de 20% da população adulta, chegando a 50% no caso dos idosos, sendo que os mecanismos de sua gênese ainda não são totalmente conhecidos.

O objetivo deste trabalho é investigar a expressão de dois genes relacionados aos mecanismos renais de controle da pressão arterial em três áreas do sistema nervoso central de ratos (bulbo dorsal, bulbo ventrolateral e hipotálamo) através da técnica de PCR em tempo real, avaliando, desta forma seu possível envolvimento nos mecanismos centrais relacionados à gênese da hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos.

Um deles, o gene SAH, cujo papel ainda não foi totalmente caracterizado, tem apresentado taxas de transcrição mais altas em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) em relação aos correspondentes normotensos WKY.

O segundo gene, codificador da proteína associada ao receptor AT₁ da angiotensina II (ATRAP) está relacionado com a internalização destes receptores, tendo, portanto, uma grande importância nos mecanismos reguladores da pressão arterial.

Nossos resultados mostram, pela primeira vez, a transcrição de ambos os genes nas três áreas do sistema nervoso relacionadas com o controle central da pressão arterial.

Ainda não foi possível estabelecer uma relação entre a expressão do gene SAH com o desenvolvimento da hipertensão em qualquer dos estágios do desenvolvimento da linhagem SHR.

O gene codificador da proteína ATRAP apresentou um aumento de expressão nos ratos hipertensos entre 1 e 2 meses de idade, período importante na gênese da hipertensão nesta cepa. Desta forma, este estudo demonstra a expressão de dois genes caracterizados previamente nos rins em áreas importantes para a regulação central da pressão arterial em diferentes períodos de desenvolvimento de ratos SHR e WKY.

Anexo 2

Abstract

Essential hypertension is a disease that affects nearly 20% of the adult population, reaching 50% of the elder, and the mechanisms of its genesis are not yet completely known.

This work aims to investigate two genes related to the renal mechanisms of blood pressure in three areas of the central nervous system (dorsal bulb, ventrolateral bulb and hypothalamus) by means of real time PCR, in order to evaluate their possible involvement in the central mechanisms of blood pressure control.

One of them is the SAH gene, whose role remains to be clarified. It has higher transcription rates in hypertensive rats (SHR) than in the correspondent normotensives WKY.

The other gene codifies the angiotensin II type 1 receptor associated protein (ATRAP) inducing its internalization. Thus, besides the transcriptional differences of the ATRAP protein between SHR and WKY rats, the ATRAP codifying gene is linked to blood pressure control played by means of the renin-angiotensin system through AT₁ receptors.

Our results provide evidence for the first time, on the expression of both genes in areas of the nervous system involved with the central blood pressure regulation.

It was not possible to establish a relationship between the SAH gene expression and the development of hypertension in the SHR rat.

The expression of the ATRAP codifying gene was increased in the SHR between 1 and 2 months of age, which is an important period for hypertension development in this strain.

Thus, this study shows the expression of SAH gene and ATRAP codifying gene in areas of the nervous system of SHR and WKY important for the central regulation of blood pressure.

Índice

I- Introdução	4
1.1 O sistema renal no controle da pressão arterial.....	5
1.2- O controle da pressão arterial pelo sistema nervoso central.....	9
1.3 A Hipertensão	13
1.4- O gene codificador da proteína ATRAP	16
1.5- O gene SAH	20
2- Objetivos gerais	25
2.1- Objetivos específicos	26
3- Material e métodos	27
3.1- Animais	27
3.2- Obtenção e processamento do mRNA.....	27
3.3- PCR em tempo real	31
3.4- Tratamento com Olmesartan	33
3.5- Análise estatística	35
4- Resultados	36
4.1- Avaliação da expressão do gene SAH e do gene codificador da ATRAP.....	36
4.1.1- Avaliação da expressão do gene codificador da proteína ATRAP.....	36
4.1.2- Avaliação da expressão do gene SAH.....	43
4.2- Verificação da modulação da expressão do gene codificador da ATRAP e do gene SAH pelo tratamento com Olmesartan.....	50
5- Discussão	60
5.1- Avaliação da expressão do gene codificador da proteína ATRAP ao longo do desenvolvimento de ratos SHR e WKY	67
5.2- Avaliação da expressão do gene SAH ao longo do desenvolvimento de ratos SHR e WKY	76
5.3- A influência do tratamento de ratos SHR com bloqueador dos receptores AT ₁ , Olmesartan, na expressão dos genes SAH e da proteína ATRAP.....	85
6- Conclusões	92
7- Referências Bibliográficas	93

I- Introdução

A pressão arterial é um dos parâmetros vitais mais importantes à manutenção da vida.

Níveis adequados de pressão são responsáveis pela correta perfusão sanguínea em todos os órgãos e tecidos do organismo, de acordo com as suas necessidades momentâneas, possibilitando o fornecimento de nutrientes, oxigênio e hormônios, a chegada de células de defesa, além de promover o carreamento de metabólitos, dos locais de origem às vias de eliminação, evitando, assim, um acúmulo potencialmente tóxico ao organismo (Navar, 2005).

Desta forma, o ajuste fino da pressão arterial (PA) é indispensável e a sua regulação é atribuída a vários sistemas trabalhando em conjunto em uma complexa e precisa interconexão.

Fisicamente, a PA é determinada pela força que o sangue exerce nas paredes dos vasos, dependendo, basicamente, do produto de dois fatores: a resistência periférica (RP) e o débito cardíaco (DC) ($PA = RP \times DC$) (Aires, 1999). O débito cardíaco é definido como a quantidade de sangue que o coração lança na circulação a cada contração, e a resistência periférica é definida como a resistência que os vasos oferecem à passagem do sangue.

Os sistemas de ajuste da pressão arterial podem ser classificados de acordo com seu modo de ação, podendo ser divididos em mecanismos de ajuste a longo prazo, realizado pelo sistema renal, e de curto prazo, realizados majoritariamente pelo sistema nervoso central (Cowley, 1992). Nos próximos tópicos estes dois sistemas serão abordados mais detalhadamente.

1.1 O sistema renal no controle da pressão

arterial

De forma simplificada, o sistema renal promove seus efeitos na regulação da pressão arterial de forma relativamente lenta, porém duradoura, agindo basicamente por dois mecanismos: o mecanismo hemodinâmico e o mecanismo hormonal.

No mecanismo hemodinâmico, o controle da PA é feito através do controle no volume de fluido contido no sistema circulatório. Por exemplo, no caso de um aumento na pressão arterial, pode-se observar um acréscimo direto na taxa de filtração glomerular, promovendo um aumento na quantidade de urina produzida. A eliminação da urina diminui o volume total de fluido no sistema circulatório, que por sua vez culmina com a redução do débito cardíaco, trazendo a PA aos níveis basais, uma vez que, como visto anteriormente, a pressão arterial depende diretamente deste parâmetro. A variação no volume de líquido extracelular é visto como um dos mais potentes e importantes mecanismos de manutenção da PA nos níveis adequados (Guyton, 1989).

Por outro lado, uma queda na PA também promove sinais que promoverão a sua elevação aos níveis normais, de forma inversa à explicada anteriormente.

Já com relação ao controle hormonal o principal mecanismo de ação é o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Ele é o mais importante mecanismo de regulação das funções renais e cardiovasculares (Carey e Siragy, 2003; Schmieder, Hilgers *et al.*, 2007).

A ativação do SRAA tem início com um sinal desencadeado por uma diminuição momentânea da pressão arterial, que promove uma queda na perfusão sanguínea nas células justaglomerulares, localizadas nos rins. Esta queda de perfusão é traduzida como um sinal ativador destas células, que passam, então, a liberar a primeira enzima na cadeia do sistema SRAA, a renina, produzida e armazenada em grânulos nas próprias células justaglomerulares. Vale lembrar que a produção de renina também já foi detectada em tecidos não pertencentes ao sistema renal, como cérebro, tecido adiposo e coração (Atlas, 2007).

A renina liberada atua na conversão de um peptídeo considerado inerte, denominado angiotensinogênio (produzido e liberado pelo fígado), na angiotensina I (Atlas, 2007), que não possui uma ação efetiva sobre o controle da pressão arterial. Posteriormente a angiotensina I é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (liberada pelos endotélios renal e pulmonar), na sua forma ativa no controle da PA, a angiotensina II (Ferrario, 2006) (figura 1).

A angiotensina II (ANG II) atua de várias maneiras para a modificação dos parâmetros circulatórios. Ela pode agir diretamente no SNC, por um aumento da atividade simpática, ou provocar seus efeitos agindo periféricamente, provocando vasoconstrição de arteríolas renais e sistêmicas. Seus efeitos ainda são realizados pelo estímulo à ingestão de líquido, por indução da sede, promovendo um acréscimo no volume de líquido extracelular e conseqüente elevação na PA (Harrison-Bernard, 2009).

A ANGII promove, ainda, liberação do hormônio antidiurético ADH pelo lobo posterior da glândula pituitária, e a liberação da última enzima na cadeia

do sistema SRAA, a aldosterona, pelo córtex da medula adrenal (Harrison-Bernard, 2009).

O ADH liberado atua na elevação da PA aumentando a absorção de água pelos rins, diminuindo o volume urinário e aumentando o volume de líquido extracelular, além de possuir uma ação vasoconstritora muito conhecida por ser desencadeada nos casos de hemorragias e desidratação (Johnston, 1985).

A aldosterona, por sua vez, estimula a absorção de sódio e água pelos túbulos proximais, acréscimo na excreção de potássio, reduzindo sensivelmente o volume de urina produzido buscando um aumento do volume extracelular (Yoshimoto e Hirata, 2007).

Desta forma, o resultado final do processo é um aumento no volume do líquido extracelular, diminuição do calibre dos vasos e uma considerável queda na eliminação de líquido e sódio, promovendo uma elevação compensatória da pressão sanguínea até que sejam atingidos os níveis normais.

Assim, podemos ter uma visão geral do papel hemodinâmico e hormonal do sistema renal no ajuste da pressão arterial.

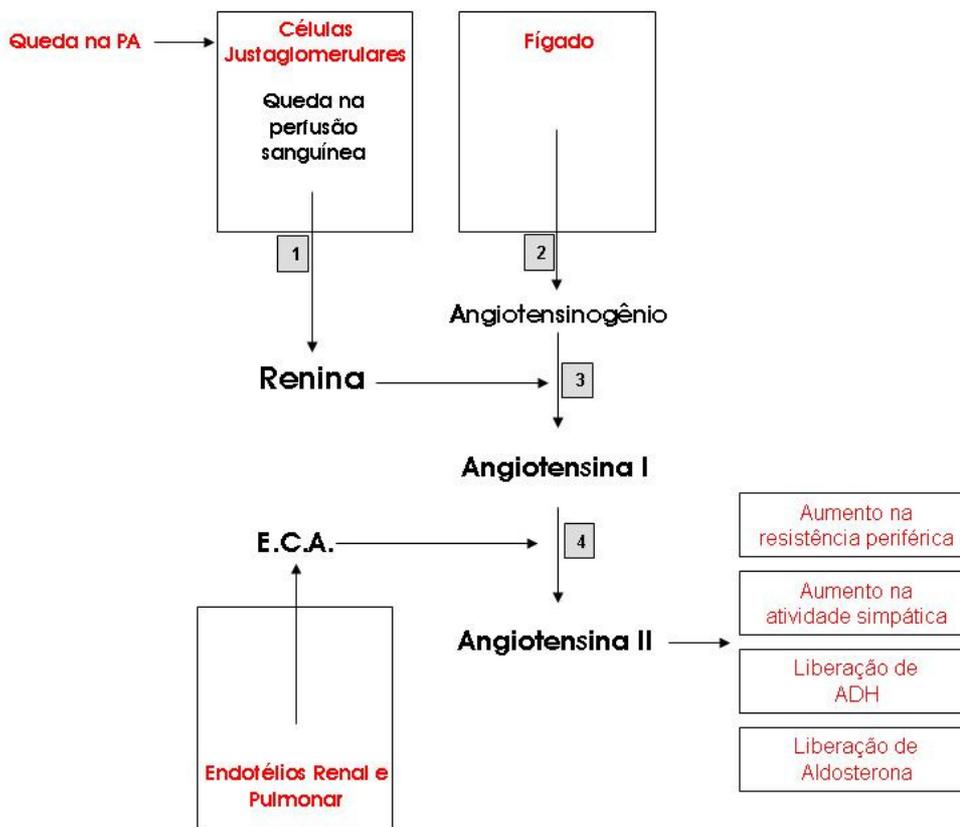


Figura 1: Esquema ilustrando a cascata de liberação da angiotensina II e seu modo de ação no mecanismo de elevação da PA: uma queda na perfusão sanguínea nas células justaglomerulares promove a liberação da renina; a renina atua então na clivagem do angiotensinogênio produzido pelo fígado na enzima angiotensina I; a enzima conversora de angiotensina (ECA) transforma então a angiotensina I em angiotensina II.

1.2- O controle da pressão arterial pelo

sistema nervoso central

O sistema nervoso central (SNC) atua no controle da pressão arterial basicamente pela modulação das funções dos sistemas simpático e parassimpático, buscando manter os parâmetros fisiológicos em seus níveis basais.

O controle da PA exercido pelo SNC tem a capacidade de atuar instantaneamente em seus efetores, promovendo mudanças rápidas nos parâmetros cardiovasculares de acordo com a necessidade momentânea. Por este motivo, os seus efeitos são classicamente conhecidos por terem uma atuação de curto período (Joyner, Charkoudian *et al.*, 2008).

No caso de aumento na pressão arterial, receptores sensíveis à pressão (barorreceptores) e quimioceptores, precisamente localizados no arco aórtico e seio carotídeo são ativados, enviando sinais a um importante núcleo bulbar denominado núcleo do trato solitário (NTS) que retransmite estes sinais a outros núcleos do bulbo, como o bulbo ventrolateral (BVL), além de centros localizados em outros locais do SNC. As duas regiões aqui citadas têm funções muito importantes no controle da PA realizado pelo sistema nervoso central, como será abordado a seguir.

O NTS está localizado na porção dorsal do bulbo, adjacente ao quarto ventrículo, desde a extremidade caudal do núcleo motor facial até a medula espinal.

Ele é conhecido por atuar em diversos mecanismos de controle como o sistema gustativo, no controle da frequência respiratória e aumento da sede. No caso da PA, o NTS possui um papel chave, atuando como principal centro de integração de sinais cardiovasculares oriundos de diversas partes da periferia, redirecionando-os a outras regiões do sistema nervoso central (Lawrence e Jarrott, 1996; Zanutto, Valentinuzzi *et al.*, 2010).

Além de receber informações periféricas dos baro e quimiorreceptores, este núcleo é tido como a única estrutura capaz de receber informações de regiões superiores do SNC, como o hipotálamo, direcionando-os aos centros responsáveis pelo controle das variáveis cardiovasculares, assim como a outros núcleos mesencefálicos (Zanutto, Valentinuzzi *et al.*, 2010).

A integração e redirecionamento de sinais a outros núcleos importantes do sistema nervoso central realizada pelo NTS, é que torna possível os rápidos ajustes dos parâmetros cardiovasculares às necessidades momentâneas citados anteriormente (Reis, Granata *et al.*, 1984; Van Giersbergen, Palkovits *et al.*, 1992).

No NTS podem ser encontrados mais de 21 diferentes tipos de neurotransmissores, como o glutamato, catecolaminas, neuropeptídeo Y, angiotensina, entre outros, os quais interagem entre si, (Fior, Yang *et al.*, 1994; Yang, Fior, Hedlund, Agnati *et al.*, 1994; Yang, Fior, Hedlund, Narvaez *et al.*, 1994; Fior e Fuxe, 1995; Fior-Chadi e Fuxe, 1998) demonstrando a complexidade das ações por ele mediadas.

Um aumento na PA estimula o NTS pela liberação, a partir das terminações dos baroreceptores, do neurotransmissor (predominantemente excitatório) glutamato. Então, o NTS passa a estimular a porção caudal do BVL

que, por meio de um aumento na liberação do neurotransmissor (predominantemente inibitório) GABA, diminui a função tônica da porção rostral do BVL sobre o sistema nervoso simpático. O resultado final desta inibição do simpático é uma redução da pressão arterial pela diminuição do tônus vascular (menor resistência periférica), além de uma redução da frequência cardíaca e da força de contração do músculo cardíaco.

Lesões do NTS em ratos podem causar hipertensão fulminante, como demonstrado por Ferrario e colaboradores em 1981 confirmando seu papel no controle pressórico. Em outras espécies lesões no mesmo núcleo causaram uma forma mais branda de hipertensão (Nathan e Reis, 1977; Laubie e Schmitt, 1979).

Pelas características citadas acima e pelo recebimento e envio de inúmeras projeções a diversas regiões do SNC como, por exemplo, o hipotálamo, é que podemos classificar o NTS como principal integrador no controle cardiovascular, agindo na resistência periférica e débito cardíaco, através da mobilização de núcleos de controle simpático e parassimpático (Guyenet, Koshiya *et al.*, 1996).

Uma outra região do SNC, também conhecida pela sua importância na regulação da PA, é a região do hipotálamo, onde se encontra, entre outros núcleos relacionados com o controle cardiovascular, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN).

O PVN se localiza bilateralmente ao lado do terceiro ventrículo e é tido como o maior dos integradores de sinais existentes na região hipotalâmica, participando ativamente, além do controle da PA, do controle da taxa metabólica, ingestão alimentar, termorregulação e resposta ao estresse. A sua

estimulação pode causar tanto o efeito pressor quanto depressor, sendo o efeito diferente de acordo com o órgão alvo (Schlenker, 2005; Zanutto, Valentinuzzi *et al.*, 2010).

Por enviar e receber projeções do NTS, além de modular diretamente o sistema nervoso autônomo por meio de projeções enviadas ao BVL e neurônios pré-ganglionares simpáticos da medula espinal (Onai, Saji *et al.*, 1987; Onai, Takayama *et al.*, 1987; Hardy, 2001), o PVN tem sido descrito como um importante núcleo regulador dos níveis pressóricos (Swanson e Sawchenko, 1980; Blessing, Jaeger *et al.*, 1982); (Kenney, Weiss e Haywood, 2003; Kenney, Weiss, Mendes *et al.*, 2003).

Ainda, o núcleo paraventricular é o maior produtor de hormônio antidiurético, também chamado de vasopressina, participando ativamente dos mecanismos de elevação da PA, conforme os mecanismos discutidos anteriormente (Swaab, Nijveldt *et al.*, 1975).

Desta forma ficam ilustrados os dois principais mecanismos de controle da PA: o renal e o neural.

Devido à importância dos níveis adequados na perfusão sanguínea, a complexidade existente na intercomunicação entre estes dois mecanismos e seus vários componentes (além das interferências externas que podem alterar a regulação), fica claro que disfunções nestas vias de controle podem ser muito danosas ao organismo.

Neste contexto, a hipertensão arterial é um dos mais importantes problemas gerados por disfunções na regulação da PA e suas causas e conseqüências serão melhor abordados nos próximos tópicos.

1.3 A Hipertensão

Distúrbios nos complexos mecanismos de regulação da pressão vistos anteriormente podem levar ao distúrbio conhecido como *hipertensão arterial* (Zanutto, Valentinuzzi et al., 2010), que é definido como uma elevação crônica na pressão arterial média, verificada após várias medições obtidas em diferentes períodos ao longo do dia.

Segundo a “V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial” divulgada na Revista Brasileira de Hipertensão Arterial (v.9, n.4, p. e35. 2006), um indivíduo é considerado hipertenso quando apresenta, após varias medições ao longo do dia, uma pressão sistólica acima de 140 mmHg e uma pressão diastólica acima de 90 mmHg. Ainda, segundo a mesma publicação, cerca de 30% dos óbitos no Brasil no ano de 2003 foram decorrentes de doenças cardiovasculares, sendo que este número sobe para 37% quando são excluídas as mortes relacionadas à violência e causas mal definidas. Se considerarmos somente as mortes por acidente vascular cerebral, cerca de 40% são relacionadas à hipertensão.

De acordo com os dados contidos no primeiro volume da “Cartilha do Hipertenso”, lançada pela Sociedade Brasileira de Hipertensão em 2001, uma em cada cinco pessoas nos dias de hoje é considerada hipertensa, sendo que

este número aumenta para uma em cada duas pessoas no caso dos idosos. Waki e colaboradores (2009) chegam a afirmar que a hipertensão afeta uma em cada três pessoas nos dias atuais.

Com base nestas informações, podemos ter uma idéia clara da seriedade dos problemas causados pela hipertensão na sociedade nos dias de hoje, podendo ser considerada como um problema de saúde pública. Por este motivo, os estudos enfocando as causas, o controle e a diminuição dos seus efeitos são fundamentais.

Muitos podem ser os motivos desencadeadores desta patologia, como, por exemplo, pré-disposição genética, o sedentarismo, o estresse, o fumo, a má alimentação, entre outros.

A hipertensão pode ser caracterizada como secundária ou neurogênica (também chamada de hipertensão essencial).

A hipertensão secundária é a presença de uma condição específica causadora do quadro hipertensivo. A presença desta condição pode causar diretamente a hipertensão, ou servir como um fator agravante em um indivíduo que já apresente um quadro de hipertensão primária. A disfunção renal crônica é geralmente citada como a causa mais comum da hipertensão secundária (Taler, 2008).

A hipertensão neurogênica ou essencial pode ser causada por uma anomalia no sistema nervoso autônomo, provavelmente causado por algum problema no sistema de ramos aferentes (baroceptrones, quimioceptores) ou na circuitaria central (Guyenet, 2006). Reja e colaboradores, em seus dois trabalhos publicados em 2002 formulam a hipótese do aumento da atividade na região rostral do BVL em decorrência de um aumento na expressão gênica

catecolaminérgica, nesta área de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), amplamente utilizados como modelo de hipertensão humana (Reis, 1981).

Waki e colaboradores em seu trabalho de 2009 afirmam que hipertensão neurogênica pode ser causada e mantida por uma hiperatividade do sistema nervoso simpático, tanto em humanos, quanto em modelos animais. Porém suas causas ainda não puderam ser completamente elucidadas.

O mesmo trabalho mostra, ainda, que 55% dos pacientes hipertensos, que fazem uso da vasta medicação disponível, não apresentam melhoras nos altos níveis de pressão arterial.

Sabendo que a hipertensão conta com vários componentes genéticos e, sabendo ainda da grande variedade de drogas disponíveis, agindo em diferentes vias e com diferentes modos de ação, podemos afirmar que existem mecanismos desencadeadores (ou uma combinação deles) que permanecem obscuros (Waki, Gouraud *et al.*, 2009). Este fato confere à doença a característica de ser multifatorial, o que dificulta muito o desenvolvimento de uma terapia definitiva para a sua cura.

Apesar das evidências que mostram alterações nos perfis de expressão de alguns genes em indivíduos hipertensos em relação aos sadios (Delva, Lechi *et al.*, 2002; Chon, Gaillard *et al.*, 2004; Ferrari, Reis *et al.*, 2009), genes definitivamente pró-hipertensivos ainda não foram estabelecidos. Porém, alguns candidatos têm surgido em diversos estudos importantes, servindo como subsídio a novas abordagens que visam futuras terapias e desenvolvimento de novas drogas.

Dois destes genes relacionados à hipertensão essencial ou neurogênica, um deles, o gene codificador da “proteína associada ao receptor AT1 de

angiotensina II” (ATRAP ou AGTRAP) e o outro denominado gene SAH, apresentaram características interessantes em estudos preliminares, tanto em trabalhos da literatura, quanto em estudos realizados pelo nosso grupo, e são alvo deste trabalho, como discutido a seguir.

1.4- O gene codificador da proteína ATRAP

Como visto anteriormente o sistema renina-angiotensina-aldosterona faz parte do mecanismo hormonal de controle da pressão arterial realizado pelos rins, sendo um dos mais poderosos sistemas de regulação da PA (Harrison-Bernard, 2009).

Neste sistema, a angiotensina II (ANGII) é um dos principais componentes.

Este peptídeo é conhecido por suas diversas ações pressoras, tanto em nível central como periférico (Reja, Goodchild *et al.*, 2006), promovendo vasoconstrição, aumento na sensibilidade de barorreceptores (Atlas, 2007), elevação da ingestão, reabsorção e retenção de sódio e água (Atlas, 2007), assim como mostrado no esquema da figura 1.

Desta forma, a ANGII tem um papel chave no controle circulatório, possibilitando que eficientes tratamentos anti-hipertensivos tenham seus mecanismos de ação baseados no SRAA. Estes tratamentos procuram controlar a PA pela administração de bloqueadores de receptores angiotensinérgicos, como é o caso das drogas valsartan (Mochizuki, Dahlof *et al.*, 2007) e candesartan (Rizzoni, Porteri *et al.*, 2005), ou pelo bloqueio da enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável pela transformação de

ANG I em ANG II, como é o caso do medicamento enalapril (Rizzoni, Porteri *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos afirmam que um desbalanço na produção e/ou liberação da ANG II circulante podem ser uma das causas da hipertensão essencial (Julius, 1988; Romero e Reckelhoff, 1999).

Experimentos comprovaram a ação central da Ang II no aumento da PA, por meio da administração de microinjeções de ANGII em varias áreas do sistema nervoso de ratos, como NTS (Casto e Phillips, 1984; Eshima, Hirooka *et al.*, 2000) e área postrema (Lowe, Mclean *et al.*, 1993). Da mesma forma, o bloqueio dos receptores angiotensinérgicos no BVL por antagonistas específicos provoca queda significativa da pressão arterial (Ito, Komatsu *et al.*, 2002), fato que comprova efetivamente a ação deste peptídeo nos mecanismos centrais de regulação cardiovascular.

Experimentos anteriores realizados por nosso grupo, por meio da técnica de microarranjos de DNA, verificaram diferenças nos níveis de expressão em um dos genes (NM_001007654.1) que traduz uma proteína denominada ATRAP (do inglês angiotensin II receptor AT1 associated protein) em ratos hipertensos em comparação à expressão em ratos normotensos, o que reforça a relação do receptor em mecanismos centrais que poderiam estar relacionados com a gênese da hipertensão.

As ações da ANGII são mediadas principalmente por meio de dois receptores: o AT1 e o AT2.

Apesar de ser encontrado em áreas determinadas em indivíduos adultos (Song, Zhuo *et al.*, 1991), o receptor AT2 é predominante em animais jovens, e

sua densidade decresce rapidamente após o nascimento (Nahmias, Cazaubon *et al.*, 1995).

Seus mecanismos de ação intracelular, diferente do que ocorre com os receptores AT1, não utilizam exclusivamente em suas vias de sinalização proteínas G, sendo que tais vias de sinalização variam de acordo com o tipo de célula estudada (Okuyama, Sakagawa *et al.*, 1999).

Apesar de não possuir funções estabelecidas, suas características e seus mecanismos de sinalização intracelular, além do fato de sua predominância em fetos e indivíduos jovens (com o decréscimo durante o desenvolvimento), sugerem que o receptor AT2 deve ter funções importantes relacionadas com o desenvolvimento e maturação do SNC nos estágios iniciais de vida, assim como na mediação da ação de fatores de crescimento celular (Millan, Jacobowitz *et al.*, 1991).

Já no indivíduo adulto, o receptor AT1 é mais abundante, sendo que a maioria das ações fisiológicas da ANGII é por ele mediada (Millan, Jacobowitz *et al.*, 1991). Além disso, ele é tido como o maior mediador das ações cardiovasculares desencadeadas pela ANGII (Cui, Nakagami *et al.*, 2000). Sua presença já foi detectada no coração, vasos sanguíneos, fígado, rins, útero glândula adrenal e cérebro (Pan, 2004).

O AT1 pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPR). Os receptores desta classe contêm sete domínios transmembrânicos e participam de inúmeros processos fisiológicos e patológicos, sendo, por este motivo, alvos de drogas utilizadas em várias terapias (Tikhonova e Costanzi, 2009).

Os GPR e, conseqüentemente, os AT1, possuem uma região específica localizada na terceira alça transmembrânica que é responsável pelo acoplamento do receptor ao complexo de proteínas G (Daviet, Lehtonen *et al.*, 1999), além de uma região N-terminal, voltada para o espaço extracelular, e uma região C-terminal, ou carboxiterminal, voltada para a o citoplasma (Tikhonova e Costanzi, 2009).

Especificamente, a região C-terminal dos receptores AT1 tem demonstrado ser importante nas funções de sinalização, dessensibilização e internalização dos mesmos. Assim, esta região pode ser considerada moduladora das ações da Ang II mediadas por estes receptores (Hunyady, Bor *et al.*, 1994).

Corroborando com a teoria de que a função moduladora dos AT1 deve se localizar na região C-terminal, Cui e colaboradores (2000) afirmam em seu estudo que é justamente nesta região que ocorre a interação destes receptores com a proteína ATRAP.

Ainda, o mesmo autor mostra que, provavelmente, essa interação pode ser um dos aspectos distintivos entre o papel dos receptores angiotensinérgicos AT1 e AT2, uma vez que não existe nenhuma interação da ATRAP com a mesma região dos receptores AT2 (Cui, Nakagami *et al.*, 2000).

Apesar das descobertas importantes sobre o funcionamento da ATRAP, Cui e colaboradores (2000) citam que a verdadeira função da proteína ainda não foi completamente desvendada.

De acordo com as afirmações acima, o presente trabalho tem por objetivo demonstrar a expressão da proteína ATRAP em regiões importantes

do SNC ligadas ao controle da PA em duas linhagens de ratos, correlacionando esta expressão com a gênese da hipertensão verificada em uma delas.

1.5- O gene SAH

Em um trabalho realizado pelos pesquisadores Iwai e Inagami (1991), cujo foco principal era provar a teoria de que certas disfunções renais poderiam estar entre as maiores causas da hipertensão, foram encontradas diferenças na expressão de vários genes provenientes de rins de ratos hipertensos (SHR) em relação aos normotensos Wistar Kyoto (WKY).

Em especial, três destes genes (S3, S2 e SA), foram considerados importantes para os mecanismos renais relacionados à hipertensão.

Dentre os três genes, o gene SA (também escrito SAH, modo adotado neste trabalho), apresentou uma expressão mais proeminente do que os demais, sendo esta cerca de dez vezes maior nos rins de ratos SHR do que nos WKY, ambos com 16 semanas de vida (Iwai e Inagami, 1991).

A expressão do mesmo gene ainda apresentou um grande acréscimo em animais SHR de 28 semanas quando comparados aos mesmos animais com 16 semanas, sugerindo, além da diferença no perfil de expressão entre as duas linhagens, uma modulação na sua transcrição ao longo do desenvolvimento destes animais (Iwai e Inagami, 1991).

As funções dos produtos do gene SAH ainda não foram totalmente descobertas (Iwai e Inagami, 1991; Iwai, Inagami *et al.*, 1994). Porém, algumas suposições têm sido feitas, sobre o gene e suas relações com a hipertensão

ligada à obesidade (Telgmann, Brand *et al.*, 2007; Jin, Kuznetsova *et al.*, 2009), altos níveis plasmáticos de colesterol (Haketa, Soma *et al.*, 2004) e neuropatias (Narita, Saito *et al.*, 2002). Sabe-se também que ele se localiza no cromossomo 1 do genoma dos ratos (Lindpaintner, Hilbert *et al.*, 1993).

No caso de humanos, até o momento, só existe um estudo demonstrando que o gene SAH é expresso nos rins de pacientes sem histórico de hipertensão, porém em níveis muito mais baixos em relação aos rins de ratos SHR e WKY (Samani, Whitmore *et al.*, 1994), sendo que estudos comparando os níveis de mRNA entre tecidos provenientes de humanos hipertensos e sadios são necessários para fornecer conclusões mais precisas.

Vassey e Kelley (1997) levantam pela primeira vez a interessante hipótese de que o produto do gene SAH pode estar ligado a mecanismos de desintoxicação responsáveis pela transformação de moléculas xenobióticas.

Os xenobióticos são moléculas de origem externa, estranhas ao organismo, que adentram, predominantemente, pela via digestiva. O metabolismo destas moléculas é muito difícil, somente sendo possível por meio de reações de biotransformação visando uma excreção facilitada do produto formado.

Os pesquisadores formulam a hipótese após extrair, do fígado bovino, dois fragmentos peptídicos de aproximadamente 10 e 12kDa cada, originados de uma enzima mitocondrial de 62kDa responsável por catalisar reações de conjugação de xenobióticos (particularmente, o ácido carboxílico) com aminoácidos.

Após o confronto das seqüências no GeneBank, os dois fragmentos mostram-se semelhantes à seqüência do produto protéico do gene SAH, sendo

que a seqüência do fragmento de 12kDa apresentou alta semelhança (73%) tanto com o produto humano como de rato. Este resultado sugeriu uma possível relação entre o metabolismo de ácido carboxílico e a regulação da pressão arterial.

Mesmo não sendo conclusivos, os resultados de Vassey e Kelley (1997) fizeram com que vários outros trabalhos fossem realizados associando enzimas mitocondriais de metabolização de xenobióticos a problemas cardiovasculares.

Existem vários relatos de detecção de metabólitos destas enzimas em tecidos cardiovasculares (Roman, 2002; Gottlieb, 2003; Spiecker e Liao, 2005) e, visto que algumas das moléculas metabolizadas, como, por exemplo, o ácido aracdônico, têm uma importância direta na regulação da pressão arterial, fica claro que uma alteração na dinâmica destas enzimas pode contribuir para a gênese da hipertensão (Elbekai e El-Kadi, 2006), corroborando com a hipótese inicial.

Além disso, estas relações reafirmam a complexidade dos sistemas envolvidos na regulação dos parâmetros vasculares e a diversidade de sistemas a eles associados, reforçando a dificuldade encontrada tanto na identificação dos fatores envolvidos na gênese da hipertensão, quanto no desenvolvimento de terapias.

Outro estudo constatou o efeito do genótipo SAH na PA de ratos da geração F2, oriundos de cruzamentos entre SHR e WKY, reforçando a relação do gene com o desenvolvimento da hipertensão nos SHR, uma vez que ficou demonstrado que ratos WKY portadores de dois alelos do gene SAH oriundos

de pais SHR tinham uma PA significativamente maior do que ratos portadores de dois alelos oriundos de WKY (Iwai e Inagami, 1992).

Iwai e colaboradores realizaram ainda outro trabalho onde uma nova linhagem de WKY, identificada pelo código WKY.SHR-D1Mit3/Rat57, foi criada com a substituição da região SAH do seu cromossomo 1 pela correspondente região proveniente de hipertensos SHR. Como resultado, foi verificada uma PA significativamente mais alta na nova linhagem em comparação aos seus progenitores, confirmando assim a hipótese da relação do gene SAH com a hipertensão (Iwai, Tsujita *et al.*, 1998).

Vários estudos apontam uma relação da expressão do gene SAH nos rins com uma elevação da PA, sendo possível observar uma clara concentração destes trabalhos no sistema renal, baseados no conceito estabelecido de que disfunções renais geneticamente determinadas são fontes importantes de problemas cardiovasculares.

Com exceção de poucos estudos (Iwai e Inagami, 1992; Kaiser, Lodwick *et al.*, 1994; Mishima, Shigematsu *et al.*, 2000) que apenas demonstram a expressão do gene SAH em algumas áreas do sistema nervoso central, não existem trabalhos de mapeamento enfocando quantitativamente o estudo da expressão do gene em áreas relacionadas ao controle da PA em linhagens hipertensas e normotensas. Tais estudos são de vital importância, principalmente no bulbo, onde, como visto anteriormente, encontram-se importantes centros integradores de sinais responsáveis pelo controle da pressão arterial, como é o caso do NTS.

Além disso, diferenças de expressão do gene SAH no bulbo de ratos SHR em relação ao de WKY já foram detectadas em experimentos de

microarranjos de DNA realizados pelo nosso grupo (Ferrari, Reis *et al.*, 2009), demonstrando a expressão e confirmando a importância do gene no sistema nervoso central. Foi observada uma alteração na expressão do gene SAH em cultura de células do bulbo de ratos SHR quando comparados aos normotensos WKY, o que sugere o envolvimento deste gene no desenvolvimento ou manutenção do quadro hipertensivo nos ratos SHR.

Desta forma, este estudo tem por objetivo demonstrar quantitativamente a expressão do gene SAH em áreas do SNC envolvidas com o controle cardiovascular.

2- Objetivos gerais

De acordo com os aspectos discutidos anteriormente e pelos resultados obtidos em experimentos anteriores realizados pelo nosso grupo, o presente trabalho se propôs analisar a expressão do gene SAH e do gene codificador da proteína ATRAP em áreas do sistema nervoso central relacionadas com o controle da pressão arterial, utilizando ratos como modelo experimental.

Desta forma buscamos correlacionar eventuais diferenças existentes na expressão desses genes entre a linhagem hipertensa SHR e a linhagem normotensa WKY, utilizada como controle.

Além disso, foi realizado o estudo dos perfis de expressão dentro da mesma linhagem, em diferentes idades. Este tipo de estudo permite a verificação do perfil transcricional ao longo do desenvolvimento dos mesmos, revelando uma possível ligação do perfil gênico observado com a gênese hipertensiva que ocorre por volta da décima segunda semana de vida dos indivíduos da linhagem SHR.

A análise foi realizada por meio da quantificação do RNA mensageiro transcrito, através da técnica do PCR em tempo real, com a utilização de sondas específicas.

O PCR em tempo real é uma ferramenta muito poderosa quando se procura determinar de forma precisa os níveis do material transcrito em um tipo celular ou no tecido de uma determinada região.

2.1- Objetivos específicos

- Demonstrar a expressão do gene SAH (NM_033231) e do gene da proteína associada ao receptor AT1 de ANG II (NM_001007654.1) por PCR em tempo real nas regiões dorsal e ventral do bulbo (que contêm o núcleo do trato solitário e o bulbo ventrolateral, respectivamente) e do hipotálamo (que contém o núcleo paraventricular) de ratos SHR e WKY (com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade)
- Caracterizar possíveis diferenças de expressão do gene SAH e do gene codificador da proteína ATRAP existentes entre as linhagens SHR e WKY, assim como possíveis diferenças ao longo do desenvolvimento destes animais, estabelecendo eventuais relações entre a expressão e a gênese da hipertensão verificada na cepa SHR.
- Demonstrar eventuais modificações na transcrição dos genes SAH e ATRAP nas mesmas regiões do SNC dos SHR relacionadas ao controle da pressão arterial após tratamento hipotensor com Olmesartan, buscando dados que correlacionem o perfil de expressão destes genes com alterações nos níveis pressóricos.

3- Material e métodos

3.1- Animais

Todos os procedimentos adotados foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEA-IBUSP).

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*), espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos Wistar Kyoto (WKY) como controle, ambos com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia do mesmo Instituto.

3.2- Obtenção e processamento do mRNA

Quatro animais de cada uma das duas linhagens estudadas (n=4), com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de vida (totalizando 32 animais) foram anestesiados com uma mistura de 62,5% ketamina, 25% xilazina e 12,5% de solução salina, sendo posteriormente decapitados.

Os estudos se concentram em três regiões diferentes do sistema nervoso central dos animais relatados:

- região ventrolateral do bulbo, que identificaremos neste trabalho pela sigla **BVL**;
- região do bulbo dorsal, que contém o núcleo do trato solitário, a qual chamaremos neste trabalho de **BD**;

- região do hipotálamo, contendo, entre outros sub-núcleos hipotalâmicos, o núcleo para-ventricular do hipotálamo, que será identificada pela sigla **HIP**.

Todo o ambiente de trabalho, assim como todo o material utilizado (além daqueles comercialmente disponíveis, já livres da enzima RNase) foram cuidadosamente limpos e descontaminados com solução adequada (RNase ZAP, Ambion, USA) para a eliminação da enzima.

O encéfalo foi então cuidadosamente aberto com a ajuda de instrumental adequado a cada idade. As regiões foram precisamente removidas e imediatamente colocadas em tubos plásticos, contendo 100µl de Trizol (Trizol Reagent - Invitrogen). Posteriormente, o tecido foi macerado com o auxílio de um pistilo plástico acoplado a um motor apropriado (Pellet Pestle Motor - Kontes, USA).

Após a maceração, a cada frasco foi adicionado mais 400µl de trisol e 100 µl de clorofórmio (Merck), deixando-os decantar à temperatura ambiente por 3 minutos. Centrifugou-se a 11000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C.

Posteriormente, retirou-se cuidadosamente a fase aquosa transparente superior, onde é encontrado o RNA, passando-a para novos tubos. Adicionou-se então 250 µl de isopropanol (Merck), agitando delicadamente e deixando as amostras descansar por 10 minutos, à temperatura ambiente.

Novamente centrifugou-se a 11000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C, vertendo os tubos posteriormente para o descarte do sobrenadante. A partir deste passo, todas as amostras foram mantidas em gelo até o final do processo.

Os precipitados formados foram então ressuspendidos em 500 µl de etanol 75% e então centrifugados a 7500 r.p.m. por 5 minutos, e novamente o sobrenadante foi descartado. Repetiu-se ainda mais uma vez a lavagem com o etanol e a última centrifugação.

Então, após o novo descarte do sobrenadante, o conteúdo foi ressuspendido em 100 µl de água livre de RNase, preparada previamente com dietil-pirocarbonato (DEPC) (Diethylpyrocarbonate - Invitrogen) e autoclavada. Acrescentou-se ainda 10 µl de NaOAc 3M pH 5,2 e 2 µl de etanol 100% (Merck). Incubou-se então por 3 horas em freezer a -80°C.

Passado o período da incubação, centrifugou-se a 14000 r.p.m. por 30 minutos a 4°C, descartando-se mais uma vez o sobrenadante. O material obtido foi então lavado com etanol 75% como descrito anteriormente e, então, após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, o mesmo foi deixado á temperatura ambiente, para a completa evaporação do etanol, por 7 minutos.

Finalmente, as amostras foram ressuspendidas em 12 µl de água livre de RNase e guardadas imediatamente em freezer a -80°C, até o momento da sua utilização.

Posteriormente, 1 µl de cada uma das amostras foi submetida ao espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop ND-1000 - Thermo Fisher Scientific Inc., USA) para a determinação precisa de sua concentração e relação de absorbância A260/A280. As amostras com razão em torno de 2 foram consideradas adequadas, conforme indicação do fabricante. Amostras com razão diferente de 2 foram descartadas.

Para a determinação da integridade do material extraído, 0,5 µl de cada amostra foi submetida a fracionamento em gel de agarose a 1% contendo

brometo de etídio na concentração de 0,1 µl/mL. O fracionamento em gel foi realizado durante 1 hora com uma voltagem de 100V em temperatura ambiente. Após este procedimento foram verificadas, com o auxílio de luz ultravioleta, as duas bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28S e 18S e a proporção de 2:1 entre as mesmas. Amostras que apresentaram problemas com as bandas foram descartadas.

Depois destas verificações, cada amostra foi submetida ao processo de transformação para DNA de fita simples (cDNA) catalisado pela enzima transcriptase reversa, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (TaqMan - Applied Biosystems, USA).

Em cada tubo tipo Eppendorf, foram colocados seguintes reagentes, totalizando 50 µl:

Reagente	Volume
Amostra	19,25 µl
10x RT Buffer	5 µl
MgCl ₂	11 µl
dNTP's 10mM	10 µl
Inibidor de RNase	1 µl
Multiscribe Reverse Transcriptase	1,25 µl
Hexômeros Randômicos	2,5 µl

Duas amostras extras foram preparadas para servir como controle de qualidade dos processos anteriores, sendo uma delas preparada sem a enzima

transcriptase reversa e outra sem a amostra de mRNA. Estas amostras foram submetidas juntamente com as demais ao experimento de PCR em tempo real.

Após a adição dos reagentes, as amostras foram colocadas em termociclador programado da seguinte forma:

- 10 minutos a 25 °C;
- 30 minutos a 48 °C (ação da enzima);
- 5 minutos a 98 °C (inativação da enzima).

Terminado o processo, as amostras foram imediatamente retiradas do aparelho e estocadas em freezer a -80 °C até o momento da sua utilização.

3.3- PCR em tempo real

Nos experimentos de PCR em tempo real, foram utilizadas sondas apropriadas a cada um dos genes, todas comercialmente disponíveis através da empresa Applied Biosystems. Estas sondas utilizam a molécula FAMTM como repórter fluorescente para a leitura no aparelho (Real Time 7300, ABI Prism, Applied Biosystems, USA).

Para o controle do experimento, foi escolhida a sonda para o RNA ribossômico 18S, produzida pela mesma empresa, a qual utiliza o repórter fluorescente VICTM.

Cada reação de PCR foi composta pelos seguintes reagentes:

RNA Ribossômico 18S

Reagente	Volume
2x Master Mix	12,5 µl
Probe	0,156 µl
Primer F	0,25 µl
Primer R	0,25 µl
cDNA (amostra)	5,00 µl
Água livre de RNase	6,84 µl

Genes ATRAP ou SAH

Reagente	Volume
2x Master Mix	12,5 µl
Primer	1,25 µl
cDNA (amostra)	5,00 µl
Água livre de RNase	6,25 µl

Para o experimento foram utilizadas placas de 96 poços apropriadas para o PCR em tempo real (ABI Prism, Applied Biosystems, USA). Em cada poço da placa foram adicionados 20µl dos reagentes e 5µl da amostra correspondente, totalizando um volume de 25 µl / poço. Posteriormente as placas foram lacradas com adesivo apropriado (ABR Prism, Applied Biosystems, USA) e inseridas no aparelho para o processo de amplificação e detecção e quantificação.

Os dados obtidos nas reações contendo as sondas para cada gene de estudo foram posteriormente subtraídos daqueles obtidos com os primers para o RNA ribossômico 18S e submetidos à normalização logarítmica ($2^{\Delta\Delta CT}$).

3.4- Tratamento com Olmesartan

Para verificar uma possível relação entre a modulação da expressão dos genes SAH e codificador da proteína ATRAP e a pressão arterial, um tratamento hipotensor foi realizado por meio da administração do bloqueador dos receptores AT1 de angiotensina II, a droga Olmesartan (Benicar - olmesartana medoxomila 40mg - Daiichi-Sankyo, Brasil) a ratos espontaneamente hipertensos SHR, com 3 meses de idade.

Para isto, 8 animais foram divididos em 2 grupos (n=4), sendo um deles considerado o grupo controle e o segundo, o tratado. Os animais tiveram seus pesos mensurados durante todo o tratamento para a dosagem correta da medicação.

Ambos os grupos foram mantidos em gaiolas com livre acesso à ração e água. Durante a primeira semana todos os animais receberam doses diárias de 1,5mL de água mineral por meio de uma seringa de gavagem, para adaptação ao procedimento de administração da droga.

Após a adaptação, ao grupo tratado foi administrado 10mg/Kg/dia do olmesartan dissolvido em volume adequado de água mineral, conforme descrito na literatura (Yokoyama, Averill *et al.*, 2005; Fernandes-Santos, De Souza Mendonca *et al.*, 2009); o grupo controle recebeu diariamente o volume

correspondente de água mineral, ambos por meio de uma seringa e agulha de gavagem.

A medida da pressão sistólica caudal foi obtida por meio de um aparelho de medição não invasiva (IITC Inc. Modelo 31, Califórnia, USA). Os animais foram acomodados conscientes em contensores de acrílico e mantidos durante a mensuração em câmara aquecida a 29°C. Os dados foram obtidos por meio da oclusão da artéria caudal por um manguito conectado ao aparelho.

Anteriormente à aquisição dos registros definitivos, os animais foram treinados a permanecer nos contensores e ter a cauda ocluída. Tal treinamento foi feito durante os 10 dias anteriores ao início do tratamento e visou à diminuição da interferência do estresse na obtenção dos dados.

Após 30 dias de tratamento os animais foram anestesiados com uma mistura de 62,5% ketamina, 25% xilazina e 12,5% de solução salina, sendo posteriormente decapitados.

Os tecidos das regiões dorsal e ventrolateral do bulbo e da região do hipotálamo (contendo, respectivamente o NTS, VLM e PVN) foram retirados e os procedimentos para a extração do mRNA, quantificação, teste da integridade das amostras, transformação em cDNA e PCR em tempo real foram realizados da forma descrita nos itens 3.2 e 3.3 desta seção.

3.5- Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do teste-t de Student ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, dependendo do caso, o que é relatado durante a apresentação dos resultados.

Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa GraphPad Prism, versão 3.00, de 1999 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Foram aceitas como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultou em valor de p menor do que 0,05.

4- Resultados

4.1- Avaliação da expressão do gene SAH e do gene codificador da ATRAP

4.1.1- Avaliação da expressão do gene codificador da proteína ATRAP

Foi avaliada a expressão do gene codificador da proteína ATRAP em ratos SHR e WKY em diferentes idades: 1 dia, 1, 2 e 3 meses de vida e em três diferentes regiões do sistema nervoso central (região dorsal do bulbo que contém o núcleo do trato solitário, região ventrolateral do bulbo que contém o bulbo ventrolateral e a região do hipotálamo, incluindo o núcleo paraventricular do hipotálamo). Segue abaixo os resultados obtidos nos experimentos, separados por região.

- Expressão do gene da proteína ATRAP no bulbo dorsal

Os experimentos de PCR em tempo real na região do bulbo dorsal (BD), onde se localiza o NTS, apresentaram uma maior expressão do mRNA codificador da proteína ATRAP nos animais SHR de 1 e 2 meses em comparação aos animais controle da linhagem WKY de mesma idade, como é mostrado na figura 2.

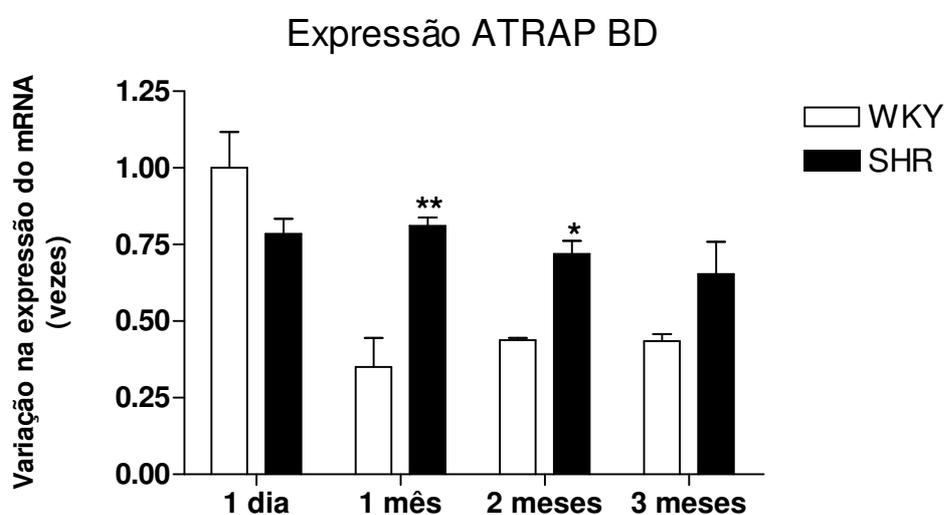


Figura 2. Variação na expressão do mRNA para a proteína ATRAP na região do bulbo dorsal, em ratos WKY e SHR com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade. Valores expressos como média aritmética \pm EPM. Foram encontradas diferenças significativas entre WKY e SHR com 1 mês de vida (** $p < 0,01$) e com 2 meses de vida (* $p < 0,05$), segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Quando a expressão do gene codificador da proteína ATRAP, da mesma região dorsal do bulbo, é comparada nas diferentes idades, porém dentro da mesma linhagem, não foi encontrada diferença nos animais SHR. Na linhagem WKY a expressão foi cerca de três vezes maior nos animais neonatos em relação aos animais de 1 mês, e quase duas vezes maior nos neonatos em comparação aos animais de 2 e 3 meses, como é mostrado na figura 3.

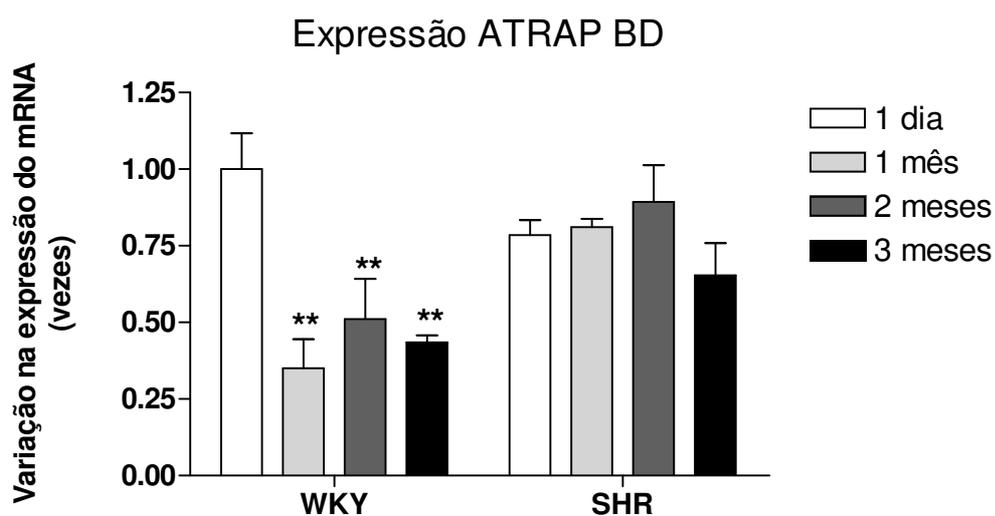


Figura 3. Variação na expressão do mRNA para a proteína ATRAP na região dorsal do bulbo, em ratos WKY e SHR com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade. Valores expressos como média aritmética \pm EPM. Foram encontradas diferenças significativas na linhagem WKY com 1, 2 e 3 meses de vida em relação aos animais WKY com 1 dia (** $p < 0,01$), segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni.

- Expressão do gene da ATRAP na região do bulbo ventrolateral

A expressão do mRNA do gene codificador da proteína ATRAP na região do bulbo ventrolateral (BVL) foi mais pronunciada nos animais SHR com 1 mês de vida quando comparados aos animais WKY de mesma idade. Não houve diferença significativa entre SHR e WKY nas outras idades analisadas. (figura 4).

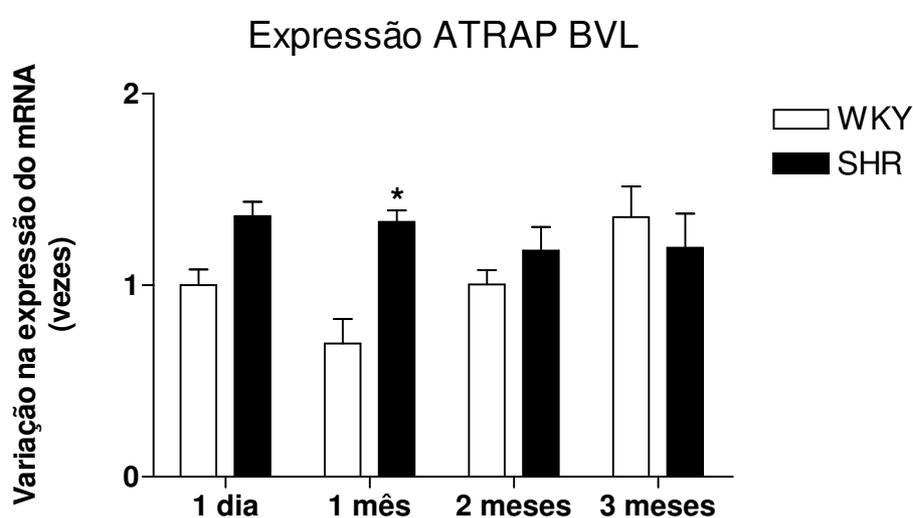


Figura 4. Variação na expressão do mRNA para a proteína ATRAP na região ventrolateral do bulbo, em ratos WKY e SHR com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade. Valores expressos como média aritmética \pm EPM. A expressão verificada na linhagem SHR com 1 mês de vida foi superior em relação à WKY de mesma idade (* $p < 0,05$), segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Quando verificamos os níveis de expressão do gene codificador da proteína ATRAP no bulbo ventrolateral, comparando as diferentes idades de uma mesma linhagem, verificamos uma diferença entre os animais WKY de 1 mês e os animais adultos de 3 meses (figura 5).

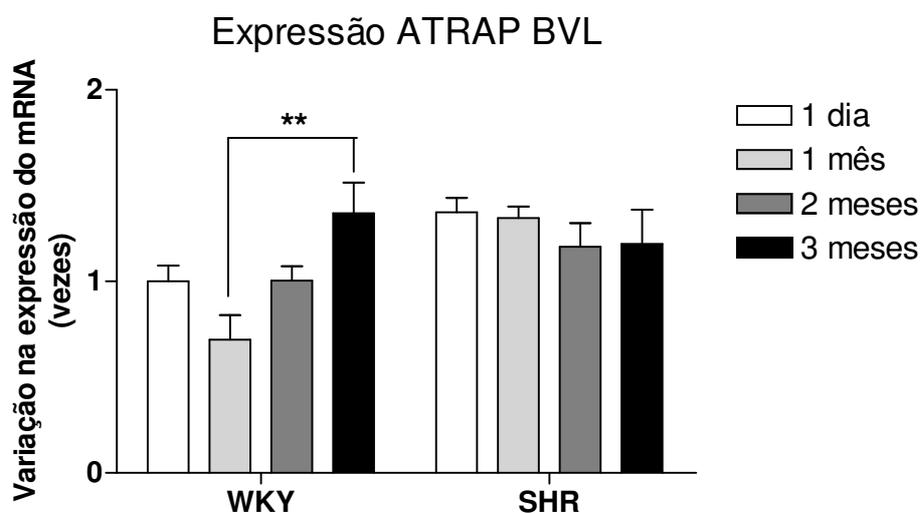


Figura 5. Variação na expressão do mRNA para a proteína ATRAP na região ventrolateral do bulbo, em ratos WKY e SHR com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade. Valores expressos como média aritmética \pm EPM. Os animais WKY com 3 meses de vida apresentaram uma expressão mais pronunciada do que os mesmos animais com 1 mês de vida (** $p < 0,01$), segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni.

- Expressão do gene da ATRAP na região do hipotálamo que contém o PVN

A expressão do gene da proteína ATRAP na região do hipotálamo (HIP) que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo foi menor nos animais SHR de 1 mês e 3 meses quando comparados aos animais controle WKY de mesma idade. As demais idades não apresentaram diferenças transcricionais para o gene da ATRAP nesta região (figura 6).

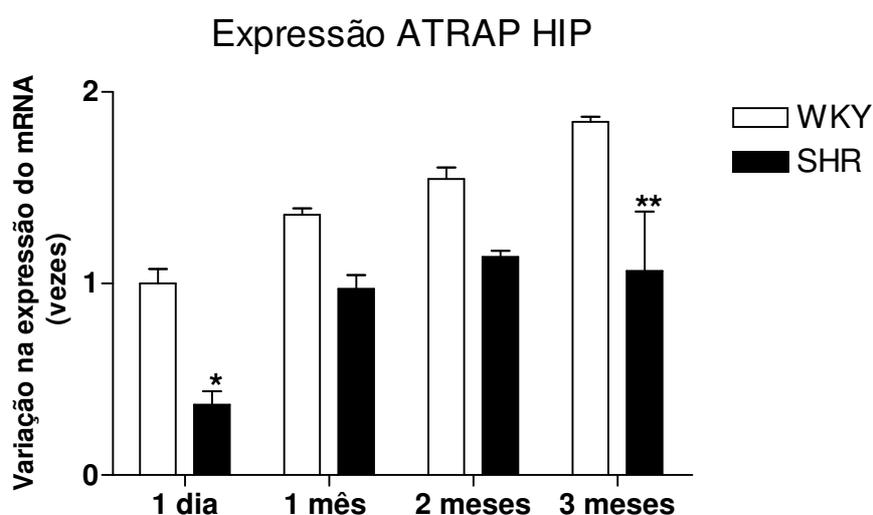


Figura 6. Variação na expressão do mRNA para a proteína ATRAP na região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos WKY e SHR com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade. Valores expressos como média aritmética \pm EPM. A expressão foi menor nos animais SHR com 1 dia (* $p < 0,05$) e com 3 meses de idade (** $p < 0,01$) em relação às mesmas idades na linhagem WKY, segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Quando comparamos a mesma região do hipotálamo nos animais de diferentes idades dentro da mesma linhagem, vemos que os animais SHR de 1, 2 e 3 meses têm expressão do gene da ATRAP maior do que os animais neonatos.

Na mesma região na linhagem WKY, os animais de 2 e 3 meses apresentam uma maior expressão de mRNA para a proteína ATRAP quando comparados aos animais da mesma linhagem com 1 dia de vida, não apresentando diferenças entre si (figura 7).

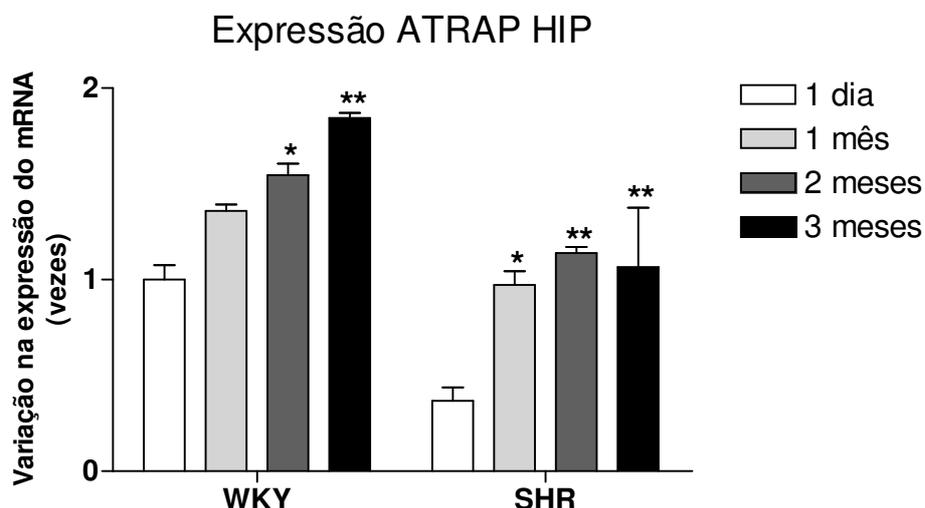


Figura 7. Variação na expressão do mRNA para a proteína ATRAP na região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo em ratos WKY e SHR com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade. Valores expressos como média aritmética \pm EPM. Os animais WKY com 2 meses ($*p < 0,01$) e 3 meses de vida ($*p < 0,05$) apresentaram maior expressão em relação aos animais com 1 dia e 1 mês de vida. Na linhagem SHR os animais com 1 mês ($*p < 0,01$), 2 e 3 meses ($*p < 0,05$) apresentaram uma maior expressão em relação aos animais da mesma linhagem com 1 dia de vida, segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni.

4.1.2- Avaliação da expressão do gene SAH

Foi avaliada a expressão do gene SAH em ratos SHR e WKY, em quatro idades diferentes (1 dia, 1, 2 e 3 meses de vida) e em três regiões do sistema nervoso central (região do bulbo dorsal (BD) que contém o núcleo do trato solitário (NTS), do bulbo ventrolateral (BVL) e a região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo (HIP)). Abaixo podemos observar os resultados obtidos nos experimentos realizados.

- Expressão do gene SAH na região do bulbo dorsal

Os experimentos de PCR em tempo real na região do bulbo dorsal (BD), que contém o NTS, mostraram uma menor expressão do gene SAH nos animais SHR com 1 dia e três meses de vida em comparação aos WKY de mesma idade (figura 8).

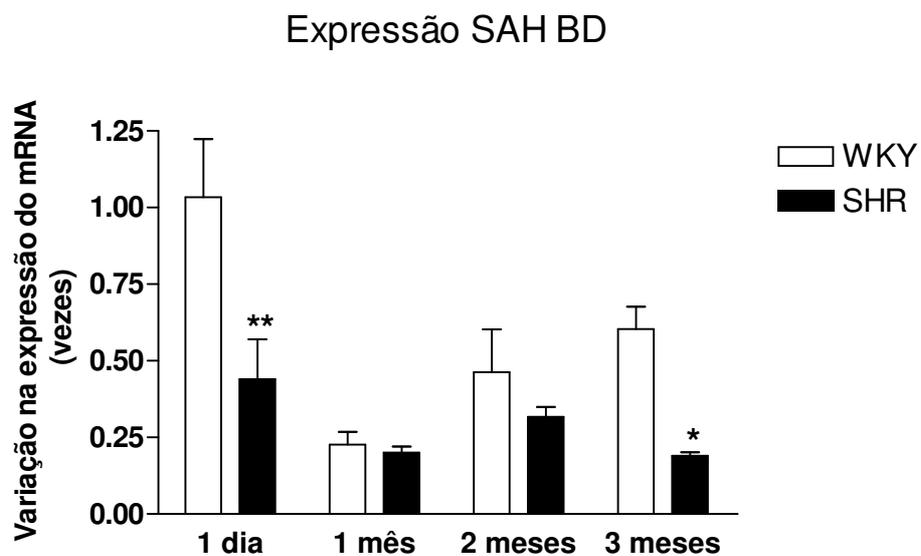


Figura 8. Variação na expressão do mRNA do gene SAH na região dorsal do bulbo que contém o NTS em ratos WKY e SHR com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade. Valores expressos como média aritmética \pm EPM. A expressão foi menor nos animais SHR com 1 dia (** $p < 0,01$) e com 3 meses de idade (* $p < 0,05$) em relação às mesmas idades na linhagem WKY, segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Já na comparação dos níveis de expressão do gene SAH na mesma região do bulbo dorsal dentre as diferentes idades da mesma linhagem foi verificado que os animais WKY de 1, 2 e 3 meses de vida apresentam uma expressão do gene SAH inferior à expressão nos animais de 1 dia da mesma linhagem. A linhagem SHR não apresentou diferença dentre os animais de idades diferentes (figura 9).

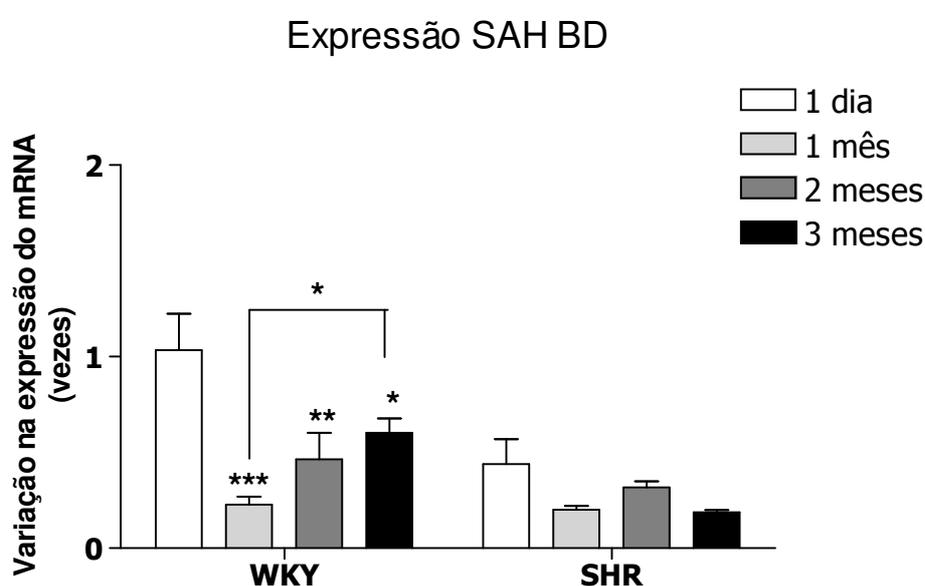


Figura 9. Variação na expressão do mRNA para o gene SAH região do bulbo dorsal em ratos WKY e SHR com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade. Valores expressos como média aritmética \pm EPM. Na linhagem WKY os animais com 1 mês ($***p < 0,005$), 2 meses ($**p < 0,01$) e 3 meses de vida ($*p < 0,05$) apresentaram uma menor expressão do que os animais com 1 dia de vida. Ainda os WKY com 3 meses, apresentaram uma maior expressão do gene SAH do que os mesmos animais com 1 mês de vida ($*p < 0,05$), segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni.

- Expressão do gene SAH na região do bulbo ventrolateral

Os experimentos de PCR Real Time na região do bulbo ventrolateral (BVL) não apresentaram diferenças entre as duas linhagens quando comparadas nas diversas idades propostas (figura 10).

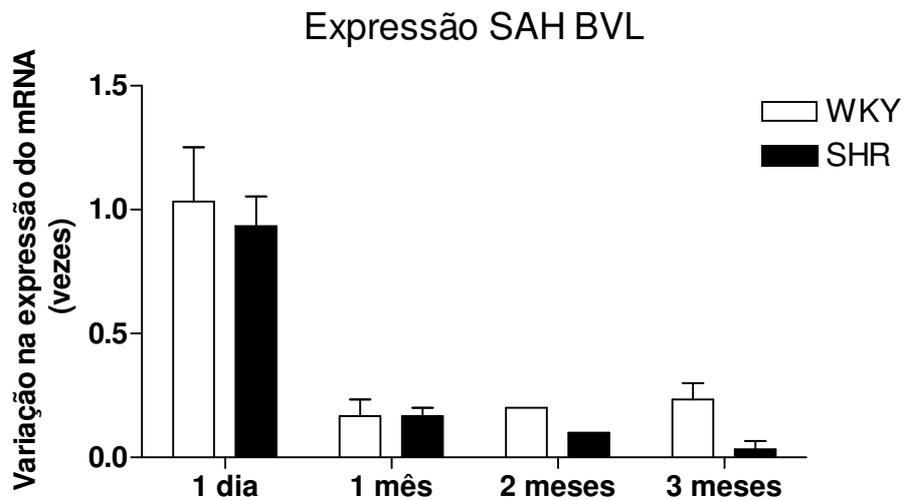


Figura 10. Variação na expressão do mRNA do gene SAH na região do bulbo ventrolateral, em ratos WKY e SHR com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade. Valores expressos como média aritmética \pm EPM. Segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni, não houve diferença na expressão do gene SAH na comparação entre as duas linhagens nesta região.

A análise das alterações transcricionais nas diferentes idades de uma mesma linhagem mostrou uma menor expressão do gene SAH na região do bulbo ventrolateral nas idades de 1, 2 e 3 meses em relação aos animais de 1 dia de vida em ambas as cepas, como pode ser observado na figura 11.

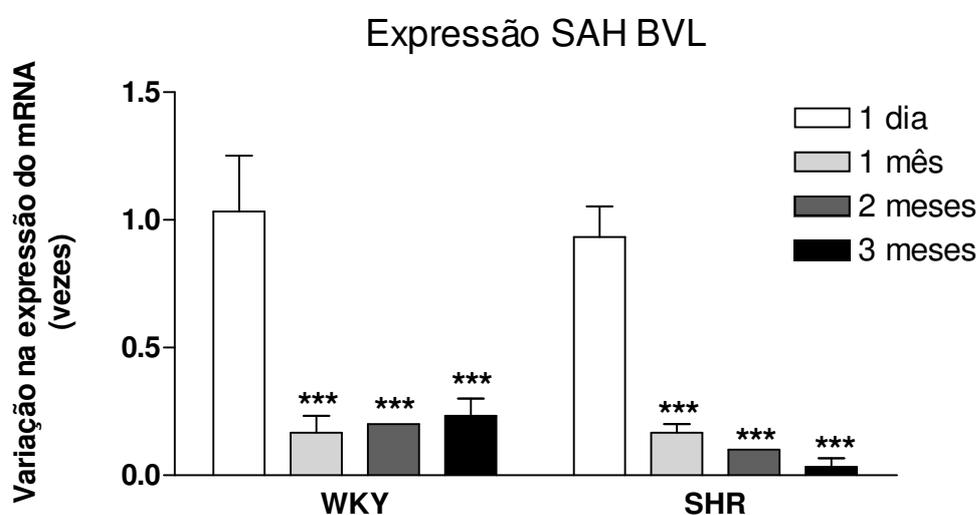


Figura 11. Variação na expressão do mRNA para o gene SAH região ventrolateral do bulbo, em ratos WKY e SHR com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade. Valores expressos como média aritmética \pm EPM. Na linhagem WKY os animais com 1, 2 e 3 meses de vida apresentaram uma menor expressão do que os animais com 1 dia de vida ($***p < 0,001$). Semelhantemente, na linhagem SHR os animais com 1, 2 e 3 meses de vida apresentaram uma expressão menor do que os animais com 1 dia de vida ($***p < 0,001$), segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni.

- Expressão do gene SAH na região do hipotálamo que inclui o núcleo paraventricular do hipotálamo (HIP)

Os experimentos de PCR em tempo real para a análise da expressão do gene SAH na região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo mostraram uma maior expressão nos animais hipertensos SHR de 1 dia em relação aos WKY de mesma idade. A diferença entre as linhagens não foi observada nas outras idades estudadas (figura 12).

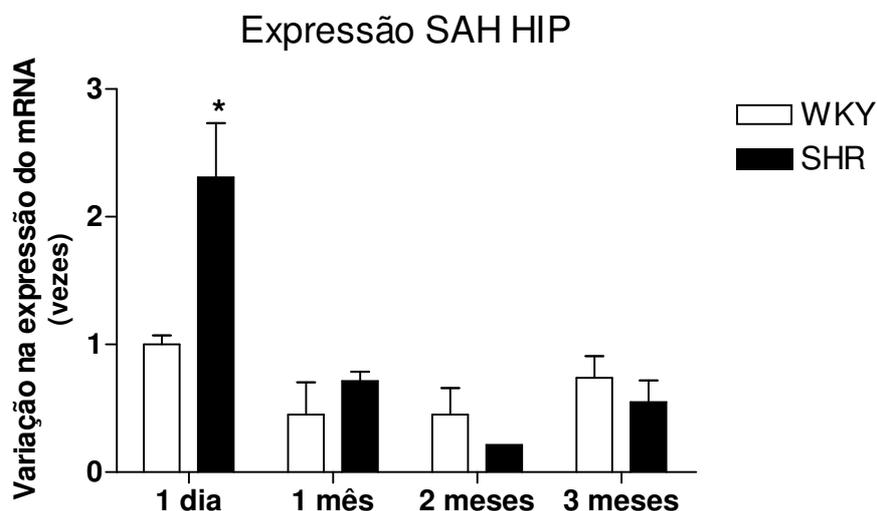


Figura 12. Variação na expressão do mRNA do gene SAH na região do hipotálamo que inclui o núcleo paraventricular do hipotálamo em ratos WKY e SHR com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade. Valores expressos como média aritmética \pm EPM. Segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni, os animais da linhagem SHR com 1 dia de vida apresentam uma expressão maior do que os animais WKY de mesma idade.

Na comparação da expressão do gene SAH na mesma região do hipotálamo entre as diferentes idades, foi observada diferença estatística nos animais SHR de 1, 2 e 3 meses em relação aos animais da mesma linhagem com 1 dia de vida. No grupo WKY não foi observada diferença estatística na transcrição do gene SAH na região para as idades estudadas (figura 13).

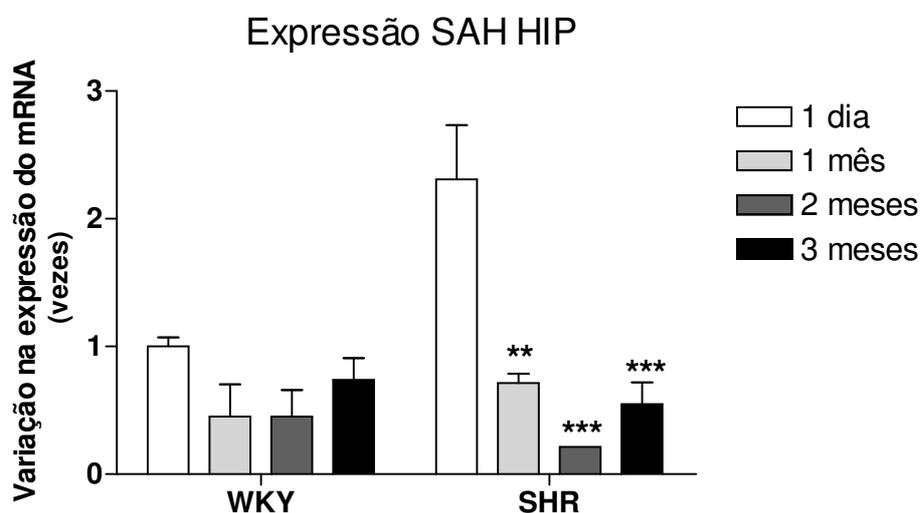


Figura 13. Variação na expressão do mRNA para o gene SAH região do hipotálamo que inclui o núcleo paraventricular do hipotálamo, em ratos WKY e SHR com 1 dia, 1, 2 e 3 meses de idade. Valores expressos como média aritmética \pm EPM. Na linhagem SHR os animais com 1 mês (** $p < 0,01$), 2 e 3 meses de vida (***) $p < 0,001$) apresentaram uma menor expressão do gene SAH em relação aos animais com 1 dia de vida, segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni.

4.2- Verificação da modulação da expressão do gene codificador da ATRAP e do gene SAH pelo tratamento com Olmesartan

Durante o tratamento dos ratos hipertensos SHR com o Olmesartan, a pressão arterial sistólica (PAS) foi monitorada para a certificação do efeito hipotensor da droga. De acordo com a análise de variância de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni, a PAS foi significativamente reduzida no grupo tratado quando comparado ao controle, com exceção de 2 dos pontos de monitoramento (figura 14).

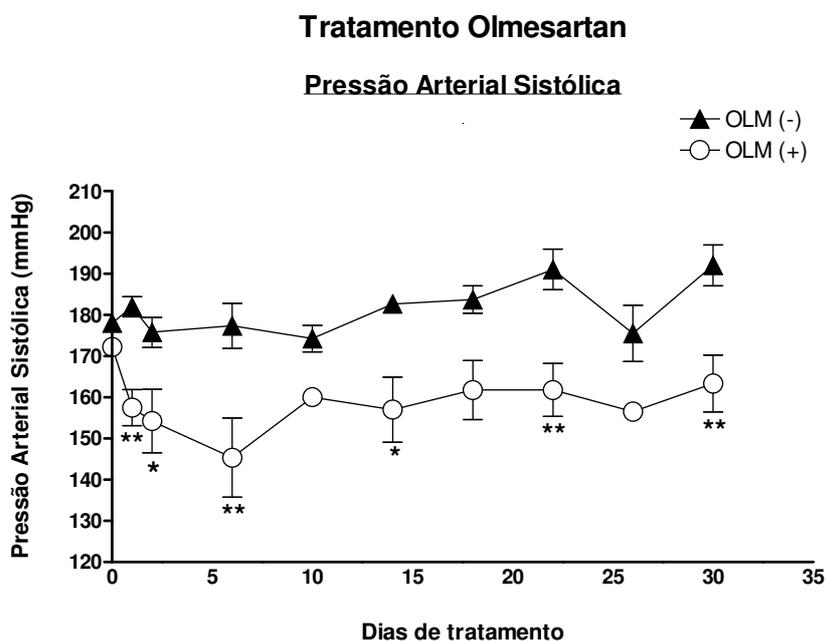


Figura 14. Pressão arterial sistólica dos grupos controle (OLM(-)) e tratado (OLM(+)) durante o tratamento com Olmesartan. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Dos 9 pontos monitorados após o início do tratamento, 6 apresentaram diferença estatística entre os grupos, segundo a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Após o tratamento com o Olmesartan foram realizados os experimentos PCR real time para as regiões dorsal e ventrolateral do bulbo, assim como a região do núcleo paraventricular do hipotálamo, e os resultados obtidos são apresentados a seguir.

- *Expressão do gene codificador da proteína ATRAP na região dorsal do bulbo que contém o NTS de ratos SHR após tratamento com Olmesartan*

De acordo com o teste-t de Student, não houve diferença na expressão do mRNA da proteína ATRAP no bulbo dorsal (BD) entre o grupo tratado e o grupo controle após o tratamento com o bloqueador do receptor AT1 de Angiotensina II, conforme mostra a figura 15.

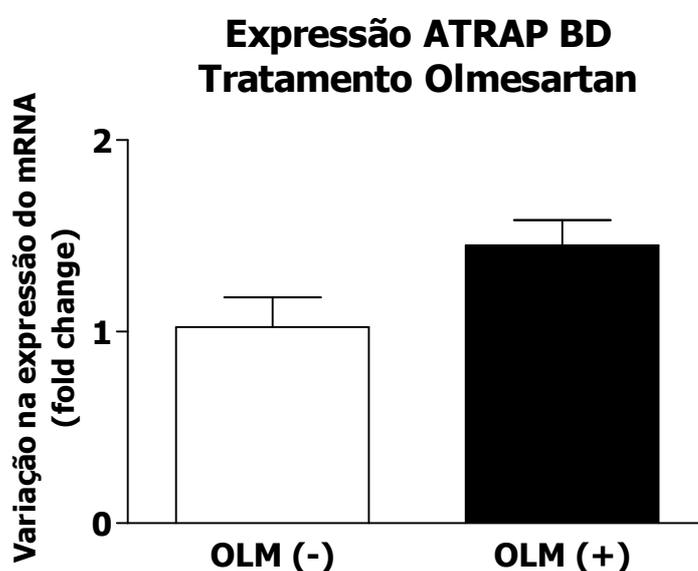


Figura 15. Expressão do gene da proteína ATRAP na região dorsal do bulbo em ratos SHR dos grupos controle (OLM(-)) e tratado (OLM(+)). Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Segundo o test-t de Student, não houve diferença entre os grupos.

- Expressão do gene codificador da proteína ATRAP na região do bulbo ventrolateral em ratos SHR após tratamento com Olmesartan

A região do bulbo ventrolateral (BVL) não apresentou diferenças de transcrição para o gene ATRAP entre os grupos tratado e controle, conforme ilustra a figura 16.

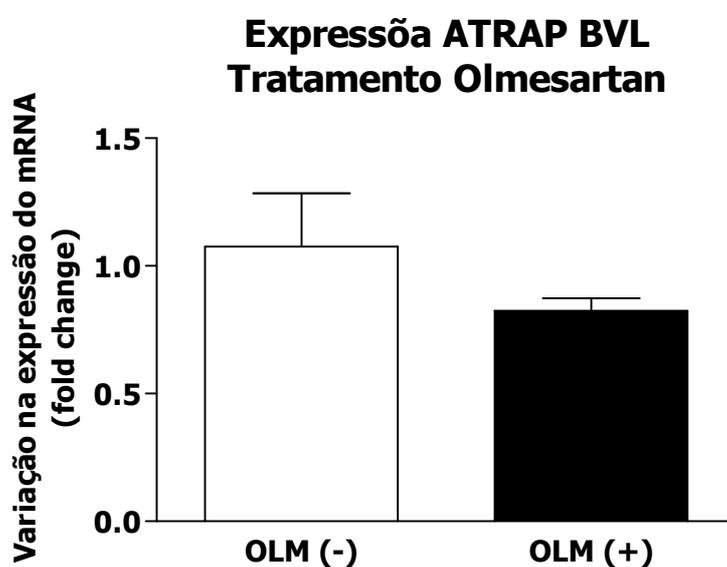


Figura 16. Análise de expressão do gene da proteína ATRAP na região ventrolateral do bulbo em ratos SHR dos grupos controle (OLM(-)) e tratado (OLM(+)). Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Segundo o test-t de Student, não houve diferença entre os grupos.

- *Expressão do gene codificador da proteína ATRAP na região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos SHR após tratamento com Olmesartan*

O tratamento com o bloqueador dos receptores do tipo 1 de angiotensina II, Olmesartan, na região do hipotálamo (HIP) que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos hipertensos não apresentou diferenças nos níveis do mRNA entre os grupos tratado e controle, segundo o teste-t de Student, conforme ilustra a figura 17.

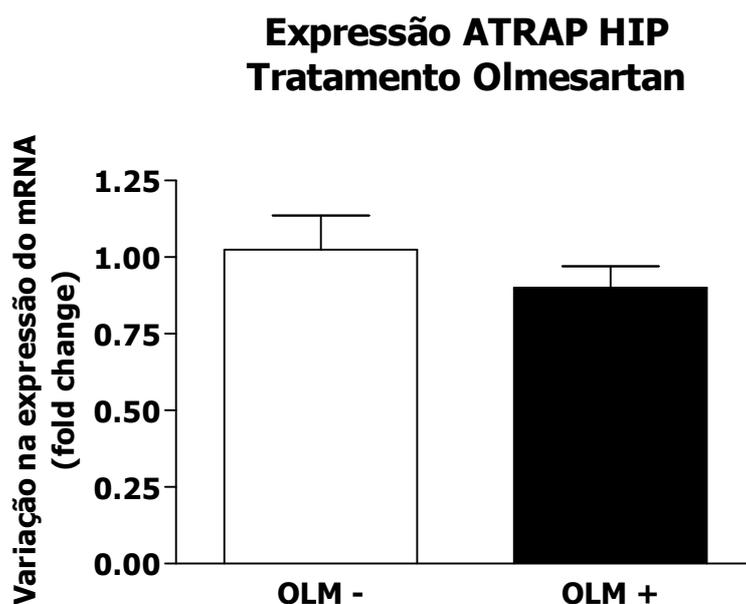


Figura 17. Análise de expressão do gene da proteína ATRAP na região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo em ratos SHR dos grupos controle (OLM (-)) e tratado (OLM (+)). Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Segundo o teste-t de Student, não houve diferença entre os grupos.

- Comparação entre a expressão do gene da ATRAP nas diferentes regiões do SNC de ratos SHR frente ao tratamento com Olmesartan

Na comparação da expressão do gene codificador da proteína ATRAP dentro de cada um dos grupos estudados, não houve diferença significativa dentre os animais do grupo controle. Dentre os animais tratados, a região do hipotálamo (HIP) que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo e a região ventrolateral do bulbo (BVL) apresentou uma expressão do gene da ATRAP menor do que a região do bulbo dorsal (BD), segundo o teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni (figura 18).

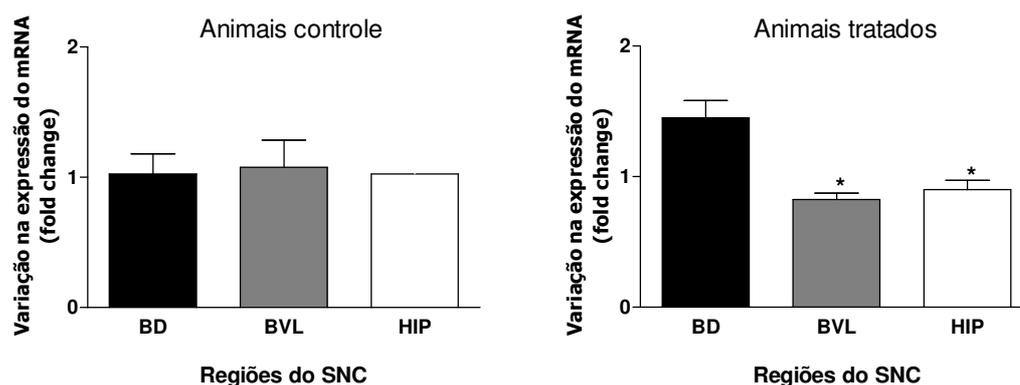


Figura 18. Comparação da expressão do gene da proteína ATRAP nas três regiões do SNC de ratos SHR dentro de cada um dos grupos controle e tratado. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Segundo o teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni, no grupo tratado com o Olmesartan a expressão do gene ATRAP na região do bulbo ventrolateral e na região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo foi menor do que a expressão verificada na região do bulbo dorsal (** $p < 0,01$). No grupo tratado não houve diferenças significativas entre as regiões estudadas.

- Expressão do gene SAH na região dorsal do bulbo de ratos SHR após tratamento com Olmesartan

Após o tratamento com a droga Olmesartan foram realizados experimentos de PCR em tempo real para a comparação da expressão do gene SAH na região do bulbo dorsal (BD) de ratos hipertensos da linhagem SHR tratados e controle (figura 19).

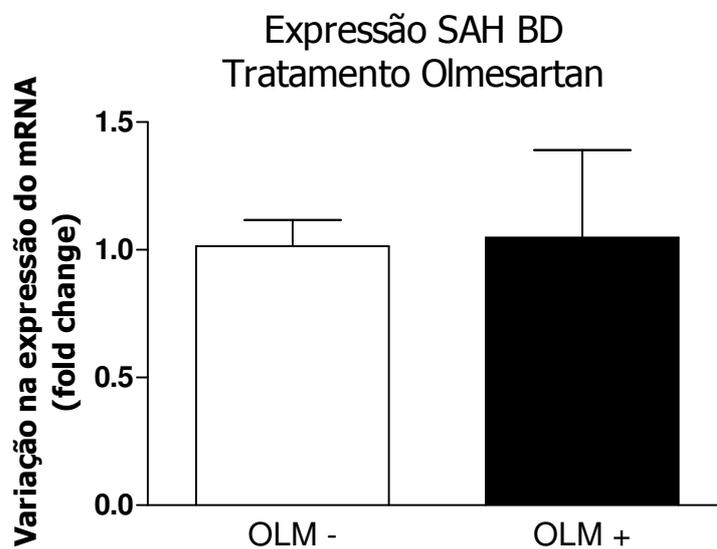


Figura 19. Expressão do gene SAH na região do bulbo dorsal de ratos SHR dos grupos controle (OLM (-)) e tratado com a droga Olmesartan (OLM (+)). Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Segundo o test-t de Student, não houve diferença entre os dois grupos.

- *Expressão do gene SAH na região ventrolateral do bulbo de ratos SHR após tratamento com Olmesartan*

Foram realizados experimentos de PCR em tempo real para a verificação da expressão do gene SAH na região do bulbo ventrolateral (BVL) de ratos hipertensos da linhagem SHR após o tratamento com a droga Olmesartan. Segundo o teste-T de Student, não houve diferença significativa entre o grupo tratado e o grupo controle (figura 20).

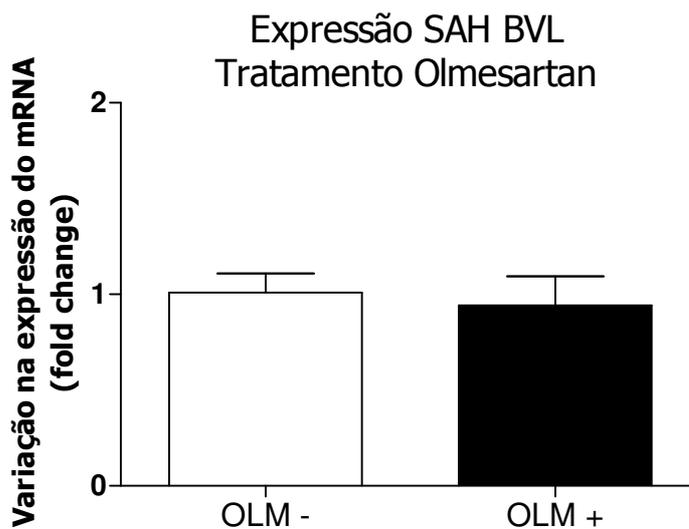


Figura 20. Expressão do gene SAH na região ventrolateral do bulbo de ratos SHR dos grupos controle (OLM (-)) e tratado com Olmesartan (OLM (+)). Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Segundo o teste-t de Student, não houve diferença entre os dois grupos.

- *Expressão do gene SAH na região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos SHR após tratamento com Olmesartan*

A expressão do gene SAH na região do hipotálamo de ratos hipertensos da linhagem SHR após o tratamento com Olmesartan foi verificada por PCR em tempo real e comparada aos animais pertencentes ao grupo controle. Segundo o teste-T de student, não foi verificada diferença estatística entre os animais dos dois grupos (figura 21).

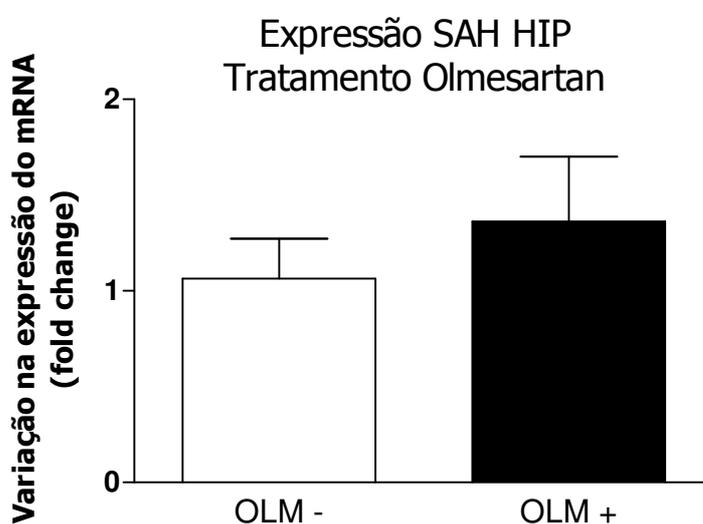


Figura 21. Expressão do gene SAH na região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos SHR dos grupos controle (OLM (-)) e tratado com a droga Olmesartan (OLM (+)). Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Segundo o teste-t de Student, não houve diferença entre os dois grupos.

- Comparação entre a expressão do gene SAH nas diferentes regiões do SNC de ratos SHR frente ao tratamento com Olmesartan

Após a realização dos experimentos de PCR em tempo real, foi feita a comparação da expressão do gene SAH nas diferentes regiões estudadas do sistema nervoso central de ratos hipertensos da linhagem SHR após o tratamento com o Olmesartan. De acordo com a análise estatística utilizada ANOVA de uma via, não houve diferenças significativas na expressão do gene SAH no grupo tratado ou no controle (figura 22).

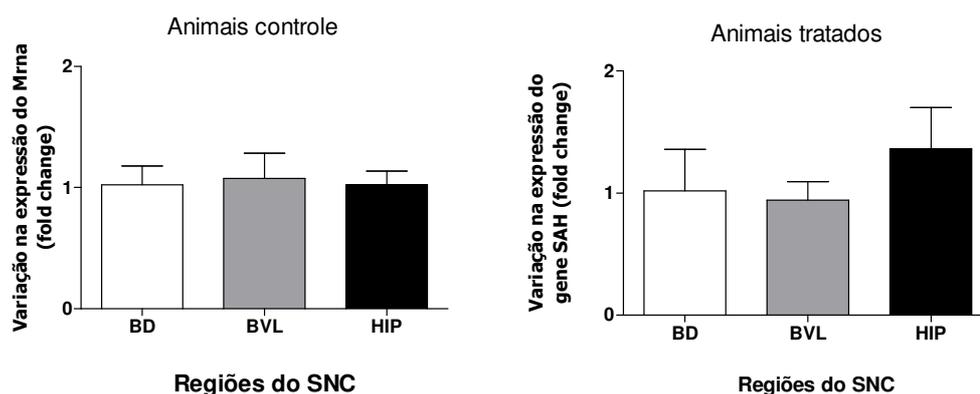


Figura 22. Comparação da expressão do gene SAH nas três regiões do SNC de ratos SHR dentro dos grupos tratado e controle. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Segundo o teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni, não houve diferença significativa entre as regiões estudadas em nenhum dos grupos.

5- Discussão

Considerações preliminares

Dados mostram que cerca de um terço das mortes em nosso país são causadas pela hipertensão. Se levarmos em conta somente as mortes decorrentes de acidente vascular cerebral, cerca de 40% ocorrem em indivíduos hipertensos. Ainda, segundo alguns autores, uma em cada três pessoas da população mundial sofre da doença nos dias atuais (Waki, Gouraud *et al.*, 2009), sendo que entre os idosos um em cada dois apresenta o quadro.

Sendo a hipertensão uma doença multifatorial, torna-se muito difícil o desenvolvimento de uma terapia única ou de formas de prevenção efetivas, como ocorre em muitos outros problemas de saúde. Por este motivo, estudos com enfoque na gênese hipertensiva podem ser ferramentas importantes na busca do controle deste problema, principalmente se o enfoque estiver nas causas e fases iniciais da doença.

Neste contexto, o rato SHR, modelo experimental para a hipertensão essencial, cuja gênese hipertensiva se assemelha muito com o desenvolvimento da hipertensão humana (Limas, Westrum *et al.*, 1980), se mostra bastante adequado para estes estudos e tem fornecido respostas interessantes, além de levantar outras tantas questões a serem elucidadas. Da mesma forma, os animais da linhagem Wistar Kyoto têm sido amplamente utilizados como cepa normotensa controle nos estudos que empregam os SHR (Doggrell e Brown, 1998).

A linhagem SHR é oriunda do cruzamento de ratos machos da linhagem Wistar, que espontaneamente desenvolveram a hipertensão ao longo do seu desenvolvimento, com fêmeas da mesma linhagem que também apresentavam uma pressão arterial mais elevada do que o normal (Okamoto e Aoki, 1963; Kurtz e Morris, 1987).

Desde então os ratos hipertensos SHR têm sido amplamente utilizados para estudos de hipertensão propriamente ditos ou de doenças relacionadas ao quadro hipertensivo (Doggrell e Brown, 1998).

Estes ratos são conhecidos por nascerem normotensos e, já na quarta semana de vida, apresentar uma pressão arterial sistólica cerca de 20mmHg mais alta do que os normotensos WKY, que apresentam P.A.S. perto de 100mmHg. A estabilização da hipertensão se dá por volta da 20ª semana entre 150 e 200 mmHg, porém os ganhos pressóricos desaceleram em torno da 12ª, enquanto a estabilização nos WKY ocorre em torno da 10ª semana em torno dos 126 mmHg (Limas, Westrum *et al.*, 1980).

Vários trabalhos realizados por nosso grupo empregando as linhagens SHR e WKY já demonstraram resultados interessantes. Em um estudo recente, foram identificadas diferenças na expressão de mais de 360 genes entre as linhagens SHR e WKY (Ferrari, Reis *et al.*, 2009), sendo dois deles eleitos como os alvos do presente trabalho. Tais resultados comprovam a existência de fatores diferenciais entre as cepas, sendo que possivelmente estes estão ligados à gênese hipertensiva nos SHR.

Outro trabalho, também realizado por nosso grupo, demonstrou diferenças na sensibilidade à nicotina entre as duas linhagens (Ferrari e Fior-Chadi, 2007; Ferrari, Raizada *et al.*, 2007; 2008), indicando que estas

respondem de maneira desigual às substâncias que atuam no sistema cardiovascular, o que, mais uma vez, comprova a existência de fatores diferenciais entre SHR e WKY que poderiam estar envolvidos na gênese e manutenção da hipertensão.

Muitos artigos científicos relacionados à hipertensão avaliam as diferenças entre SHR e WKY, como discutido anteriormente. Porém, é necessário citar que eventuais diferenças encontradas entre as duas linhagens podem não ser necessariamente as causas da patologia verificada na linhagem SHR (Iwai e Inagami, 1991), uma vez que estas diferenças podem ser consequência do quadro hipertensivo, ou mesmo não guardar ligação com o mesmo (Kurtz e Morris, 1987).

Estudos têm atribuído as causas da gênese hipertensiva a disfunções em núcleos específicos, relacionados ao controle cardiovascular (Cravo, Morrison *et al.*, 1991; Guyenet, 2006). Porém, nenhum destes trabalhos verifica as diferenças transcricionais dos dois genes abordados da mesma maneira adotada no presente estudo.

Entre importantes centros relacionados com as funções cardiovasculares, está o núcleo do trato solitário do trato solitário, o bulbo ventrolateral (BVL) e o núcleo paraventricular do hipotálamo, todos eles localizados nas regiões do SNC aqui estudadas.

O NTS é um dos mais conhecidos centros integradores de informações dos parâmetros cardiovasculares oriundos da periferia. Ele é responsável por coordenar as informações enviadas pelos baroreceptores localizados no arco aórtico e seio carotídeo, reenviando-os a outras regiões do cérebro (Reis, Granata *et al.*, 1984; Van Giersbergen, Palkovits *et al.*, 1992).

Já o BVL, é dividido em duas regiões com diferentes funções, sendo uma rostral e uma ventral. Estas regiões trabalham em conjunto modulando a resistência periférica, o volume e a composição do líquido extracelular.

Além dessas duas regiões, outra área tem sido proposta como integrante do BVL e é chamada de área pressora caudal. Esta área específica tem como função a manutenção da atividade pressora basal, sendo seu funcionamento modulado diretamente pela porção caudal do bulbo ventrolateral (Cravo, Campos *et al.*, 2009).

A terceira região do SNC abordada neste trabalho é a região do hipotálamo que contém, entre outros núcleos, o núcleo paraventricular do hipotálamo, que também é conhecido por ter um papel importante nos mecanismos reguladores dos níveis pressóricos (Swanson e Sawchenko, 1980; Blessing, Jaeger *et al.*, 1982; Kenney, Weiss e Haywood, 2003; Kenney, Weiss, Mendes *et al.*, 2003).

O núcleo paraventricular também é tido como o maior centro produtor de hormônio antidiurético, também chamado de vasopressina (Swaab, Nijveldt *et al.*, 1975), que é importante na regulação do volume extracelular e conseqüentemente no ajuste da PA.

Como pudemos perceber até aqui, a importância destas regiões para a regulação da PA faz com que os dados obtidos a respeito dos fatores que nelas atuem sejam de extrema importância para o entendimento da hipertensão.

Neste contexto encontramos o gene SAH e o gene codificador da ATRAP, vistos inicialmente como elementos relacionados aos mecanismos de controle cardiovascular no sistema renal, mas que cada vez mais devem ser estudados também em nível central, dado a interconexão dos dois sistemas.

A proteína ATRAP tem a capacidade de interagir com a porção carboxiterminal do domínio citoplasmático do receptor AT1 de angiotensina II (porção importante na regulação da sensibilidade deste receptor às ações da ANGII) afetando a sua sinalização (Daviet, Lehtonen *et al.*, 1999) e, por isso, parece atuar na dessensibilização e internalização destes receptores, fundamentais para os efeitos desencadeados pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (Cui, Nakagami *et al.*, 2000).

A relação da ATRAP com o sistema renal, um dos mais importantes sistemas de regulação da pressão arterial, já foi bem estabelecida. Porém, como dito anteriormente, o entendimento da sua atuação no SNC é fundamental, sendo que muito pouco sobre a ATRAP neste sistema é conhecido, dado o pequeno número de estudos realizados (Daviet, Lehtonen *et al.*, 1999).

Daviet e colaboradores (1999) relataram a expressão da ATRAP em baixos níveis em tecidos cerebrais por meio da técnica northern blotting para a detecção de mRNA, porém, este trabalho não deixa claro de qual a região do SNC foram extraídos tais tecidos. Semelhante a este estudo, nossos resultados demonstraram a expressão da ATRAP no SNC, porém fomos bem sucedidos em demonstrar a expressão especificamente em três das regiões mais importantes para o controle da PA.

Pudemos constatar a sua expressão na região dorsal do bulbo onde se encontra o núcleo do trato solitário, na região ventrolateral do bulbo, além da região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo, sendo que a implicação destes resultados é discutida adiante.

As características da expressão do gene SAH levam a crer que ele está relacionado à metabolização de xenobióticos, embora ainda não tenhamos certeza sobre as suas funções (Vessey e Kelley, 1997; Iwai, Katsuya *et al.*, 2002).

Desde a sua primeira descrição, vários estudos têm relacionado a expressão do gene SAH com problemas de saúde diferentes da hipertensão, como por exemplo, a obesidade (Telgmann, Brand *et al.*, 2007), altos níveis de triglicérides (Iwai, Katsuya *et al.*, 2002), falência renal (Narita, Saito *et al.*, 2002) e altos níveis de colesterol (Haketa, Soma *et al.*, 2004).

Devido à grande importância do sistema renal no controle da PA (além da teoria de que disfunções geneticamente determinadas nos rins estão diretamente ligadas aos níveis de PA), quase que a totalidade dos trabalhos publicados sobre o gene SAH foi realizada com a utilização de células renais, deixando uma lacuna sobre a sua atuação no sistema nervoso central.

A expressão do gene SAH havia anteriormente sido descrita no SNC por Kaiser e colaboradores (1994), porém este trabalho apenas relata a expressão do gene em tecido extraído do cérebro, não revelando a área precisa da qual este tecido foi extraído.

Mishima e colaboradores (2000) realizaram um estudo, comparando por northern blotting e hibridização *in situ*, a expressão do gene SAH em regiões do sistema renal e do SNC de ratos SHR e WKY. Neste trabalho foi constatada a

expressão do gene em diversas áreas cerebrais (plexo coróide, giro denteado do hipocampo, células de Purkinje do cerebelo, núcleo do trato solitário e núcleo motor dorsal do vago). Porém, não houve diferenças nas taxas de expressão do gene nestas regiões, com exceção do plexo coróide que apresentou uma expressão mais alta do que as demais regiões em uma das linhagens WKY estudadas.

Como será melhor discutido adiante, os resultados de Mishima e colaboradores (2000) corroboram com os nossos uma vez que ambos, além de demonstrar a expressão do gene SAH no SNC, não encontraram grandes diferenças no perfil geral de expressão do gene entre SHR e WKY.

Porém, diferente dos trabalhos existentes, conseguimos, pela primeira vez, demonstrar a expressão do SAH em regiões específicas do SNC relacionadas com a regulação da PA, como a região ventrolateral do bulbo, região do núcleo paraventricular do hipotálamo, além da região do bulbo dorsal, onde a expressão do gene já havia sido relatada anteriormente por Kaiser e colaboradores (1994).

Desta forma, estes resultados trazem uma grande contribuição na reafirmação da relação do gene SAH e do gene codificador da proteína ATRAP com o controle da PA.

5.1- Avaliação da expressão do gene codificador da proteína ATRAP ao longo do desenvolvimento de ratos SHR e WKY

- Expressão do gene codificador da proteína ATRAP na região do bulbo dorsal que contém o núcleo do trato solitário

Na região dorsal do bulbo que contém o NTS, os animais hipertensos apresentaram uma taxa de expressão do gene codificador da ATRAP superior aos normotensos WKY nas idades de 1 e 2 meses. Como dito, é por volta deste período que surgem os primeiros sinais da hipertensão na linhagem SHR (Limas, Westrum *et al.*, 1980).

Na comparação entre as idades de cada linhagem, no caso dos ratos SHR, não foram observadas diferenças na expressão do gene. Já a cepa normotensa WKY apresentou uma taxa de expressão para o gene codificador da proteína ATRAP muito mais pronunciada nos animais com 1 dia de vida em relação às demais idades verificadas.

Sendo a proteína ATRAP uma molécula capaz de promover a dessensibilização e internalização dos receptores AT1 de angiotensina II (Cui, Nakagami *et al.*, 2000), pode-se dizer, de modo simplista, que ela seria capaz de promover um efeito hipotensor no organismo semelhante ao efeito atenuador que têm as drogas bloqueadoras dos receptores angiotensinérgicos.

Desta forma podemos traçar um paralelo entre nossos resultados para a expressão da ATRAP com os resultados obtidos por Reja e colaboradores (2006).

Assim como o presente trabalho, o estudo de 2006 tinha como objetivo a verificação de fatores possivelmente envolvidos com as características da linhagem SHR. Seus resultados mostraram uma maior expressão de receptores AT1 em animais SHR adultos em comparação aos WKY de mesma idade, em várias regiões do SNC, assim como em algumas regiões periféricas, como a medula da glândula adrenal. Tal resultado levou os autores a elaborar a hipótese de que um defeito na expressão dos receptores AT1 neste período de vida e, portanto, no sistema renina-angiotensina-aldosterona, poderia estar diretamente envolvido no fenótipo hipertenso observado na cepa SHR.

Apesar dos nossos resultados não nos permitirem afirmar que as diferenças na quantidade de mRNA da ATRAP entre SHR e WKY verificadas no BD dos animais com 1 e 2 meses de vida estejam diretamente ligadas ao fenótipo hipertenso, é possível que a maior quantidade de mRNA da ATRAP esteja relacionado com o aumento simultâneo da densidade dos receptores AT1.

Se esta afirmação for verdadeira, a maior expressão da proteína ATRAP nos SHR pode estar diretamente relacionada com o aumento do número de receptores AT1 na cepa SHR, e ambas as características relacionadas à gênese da hipertensão.

Porém, algumas questões ainda permanecem sem respostas, como, por exemplo, quais os mecanismos responsáveis por desencadear o aumento

transcricional da ATRAP no período; e se o aumento na expressão da ATRAP é realmente uma consequência do acréscimo do número de receptores AT1.

Outros trabalhos também relatam diferenças ou “defeitos” (Reja, Goodchild *et al.*, 2006) no funcionamento do sistema renina-angiotensina-aldosterona na comparação entre as duas cepas, relacionando-as com o surgimento da hipertensão em SHR (Raizada, Lu *et al.*, 1993; Correa, Viswanathan *et al.*, 1995).

Ainda, existem muitos estudos relatando diferenças nos perfis transcricionais dos dois principais receptores angiotensinérgicos ao longo do desenvolvimento, não só entre as duas linhagens aqui abordadas como em outros modelos experimentais (Tsutsumi e Saavedra, 1991; Viswanathan, Tsutsumi *et al.*, 1991; Hunt, Ciuffo *et al.*, 1995; Tonelli, Jöhren *et al.*, 2000).

Vistos em conjunto, estes estudos revelam a existência de uma complexa regulação dos componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona, cujos desbalanços poderiam contribuir diretamente com a hipertensão.

Os aumentos na quantidade de mRNA da proteína ATRAP em períodos considerados chave no desenvolvimento da doença na linhagem SHR verificados em nossos resultados poderiam sinalizar para mais um dos componentes deste mecanismo cujo perfil parece estar alterado na cepa hipertensa. Novamente, resta estabelecermos de que forma a expressão da ATRAP participa deste mecanismo e se as diferenças encontradas entre as linhagens seriam causa ou consequência do fenótipo verificado em SHR.

- Expressão do gene codificador da proteína ATRAP na região do bulbo ventrolateral

Na região do bulbo ventrolateral, a linhagem SHR novamente apresentou uma taxa de expressão do gene da proteína ATRAP mais alta na idade de 1 mês em relação aos animais WKY.

Este resultado reforça a teoria anterior sobre o aumento da expressão da proteína neste período (tido como um ponto chave na gênese hipertensiva dos SHR) concomitante ao conhecido aumento na expressão do principal receptor do SRAA, o AT1.

A taxa de expressão manteve-se constante dentre todas as idades verificadas na cepa SHR, resultado que também foi semelhante ao verificado no BD. Já o resultado observado nos animais WKY apontou para um aumento na expressão o gene da ATRAP na idade de 3 meses em relação aos mesmos WKY com 1 mês.

Sabendo da interação existente entre o BVL e o BD na modulação da PA realizada em nível central, é provável que as duas regiões bulbares também compartilhem os mecanismos desencadeadores tanto do aumento no número de receptores AT1, quanto na expressão da proteína ATRAP propostos na discussão anterior sobre os resultados no BD.

Além do aumento na expressão dos receptores AT1 verificada nos indivíduos hipertensos e relatado em trabalhos anteriores, é interessante ressaltar que diversas outras mudanças ocorrem próximas ao período em que foram observadas diferenças de expressão da ATRAP entre SHR e WKY.

Desde o nascimento os animais sofrem inúmeras mudanças fisiológicas advindas da vida pós-fetal a qual são submetidos. Respiração, alimentação,

temperatura e interação com os demais indivíduos são alguns dos fatores que compõem a vida extra-uterina, fazendo com que mudanças fisiológicas ocorram possibilitando as adaptações necessárias ao organismo.

Ainda, por volta dos 30 dias de vida os animais deixam de mamar e, muitas vezes, são separados da mãe e agrupados de acordo com o sexo. Este fato também exige dos animais enormes adaptações de comportamento além de novas mudanças na alimentação, já que estes passam a utilizar ração e água em substituição ao leite da mãe, buscando-os na gaiola independentemente da ajuda materna. Este comportamento certamente contribui com as mudanças fisiológicas verificadas no período de transição para a fase jovem no organismo destes indivíduos.

Dentre estas mudanças fisiológicas podemos citar alterações na síntese da enzima óxido nítrico sintase (Ferrari e Fior-Chadi, 2005), alterações nas funções renais (Vaneckova, 2002) e no volume de fluído corporal e extracelular (Toal e Leenen, 1983), todas elas associadas com os fatores controladores da PA.

A variação na expressão da ATRAP no SNC, verificada em nossos resultados, poderia também fazer parte deste conjunto de transformações que ocorrem neste período de vida dos animais. Neste caso a relação do aumento do mRNA da ATRAP poderia ainda estar relacionada com o conjunto de mudanças fisiológicas adaptativas ao desenvolvimento dos indivíduos, conferindo uma complexidade ainda maior aos mecanismos de controle da PA aqui discutidos.

Frente aos resultados e às informações aqui relatadas, podemos dizer com certeza que o período compreendido entre 1 e 2 meses é, além do período

em que se encontra a gênese hipertensiva na linhagem SHR, um período importante e repleto de mudanças fisiológicas (onde se inclui a expressão da ATRAP aqui estudada) que podem estar relacionadas com o fenótipo hipertenso característico da cepa.

- *Expressão do gene codificador da proteína ATRAP na região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo*

Na comparação entre SHR e WKY, a expressão do gene da ATRAP na região do hipotálamo, os animais hipertensos com 1 dia e 3 meses de vida apresentaram uma expressão menor do que as idades correspondentes em WKY.

Já na comparação entre as idades nesta região, o perfil de expressão pode ser considerado semelhante entre as duas cepas, uma vez que ambas apresentaram uma quantidade maior do RNA mensageiro da ATRAP nas idades mais avançadas em relação aos animais com 1 dia de vida. Desta forma, nossos resultados revelam a existência de um aumento de expressão do gene da ATRAP ao longo do desenvolvimento de ambas as cepas.

Sabe-se que também existem diferenças nos níveis de mRNA dos receptores AT1 na linhagem SHR em relação aos WKY na região do PVN (Reja, Goodchild *et al.*, 2006). Possivelmente, o acréscimo nos receptores AT1 tenha também nesta região alguma influência no aumento da expressão da ATRAP ao longo do desenvolvimento.

Mesmo nossos resultados não sendo suficientes para afirmarmos que a expressão do gene da ATRAP no hipotálamo guarda relação com a hipertensão verificada na linhagem SHR e, apesar de semelhança entre os perfis de expressão entre SHR e WKY, um dado interessante chama a atenção na análise dos resultados obtidos.

Apesar da ausência de diferenças estatísticas entre SHR e WKY com 1 e 2 meses de idade, parece existir uma tendência de menor expressão na cepa

hipertensa, ao contrário do que foi observado no bulbo, onde foi verificada uma expressão mais alta nos animais SHR no período entre 1 e 2 meses de vida.

Por este motivo, o resultado para o perfil de expressão da ATRAP na região do hipotálamo, que contém o núcleo paraventricular, parece não seguir os mesmos mecanismos de controle propostos para as regiões do bulbo.

Se a afirmação de que a ATRAP pode ser vista como um modulador dos efeitos pressóricos desencadeados pela ANGII (por promover, tanto a internalização quanto a dessensibilização dos seus principais receptores) estiver correta, possivelmente temos, na região do hipotálamo, um indício de que a ATRAP pode ser um dos fatores diferenciais entre as cepas estudadas, contribuindo para o fenótipo hipertenso no SHR.

Uma vez que o aumento do número de receptores AT1 no período de gênese da hipertensão em SHR, citado anteriormente, é um dos fatores que contribuem para os ganhos pressóricos característicos da cepa SHR, intensificando os efeitos da ANGII circulante, e, se o aumento da ATRAP pode, por mecanismos ainda não caracterizados, ser influenciada pelo aumento do número destes receptores, surge a hipótese de que a menor quantidade de mRNA da ATRAP verificada no hipotálamo dos animais hipertensos, aliada à maior quantidades dos receptores AT1 poderia contribuir para os níveis pressóricos elevados na linhagem.

Apesar de ser apenas uma hipótese, a afirmação acima confirma a importância das alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona levantada por Reja e colaboradores (2006), além da sua relação com o estabelecimento do fenótipo hipertenso, proposto no mesmo estudo.

Vistos em conjunto, os resultados obtidos nas três regiões, demonstram que a expressão do gene codificador da proteína ATRAP parece ter um papel diferencial de acordo com a região e fase de vida abordada.

Ainda, Oppermann e colaboradores (2010) postulam que, pelo fato de promover efeitos diversos em diferentes tecidos-alvo, a cascata do sistema renina-angiotensina-aldosterona deve ter mecanismos precisos de controle locais, agindo por meio dos receptores AT1, fortalecendo o possível papel diferencial do gene da ATRAP nas diversas regiões do SNC aqui verificado.

Os resultados aqui apresentados concordam ainda com outras afirmações do trabalho de Oppermann e colaboradores (2010). Este estudo também afirma, entre outras coisas, que a ausência induzida da ATRAP é capaz de produzir um efeito hipertensor, além de um aumento de volume plasmático (em camundongos). Como discutido anteriormente, nossos resultados também apontaram para uma redução dos níveis de expressão da ATRAP na região do hipotálamo em que se encontra o PVN da linhagem hipertensa SHR quando comparados aos WKY.

Desta forma, é provável que a ATRAP tenha um papel mais efetivo na modulação dos receptores AT1 neste núcleo, descrito como o maior centro integrador de informações da região hipotalâmica, intimamente envolvido na manutenção da homeostase (Schlenker, 2005).

Nossos resultados juntamente com dados contidos na literatura demonstram que muitas questões ainda permanecem sobre a verdadeira função da ATRAP na modulação da PA, e novas abordagens devem ser propostas para a formulação de uma teoria sólida que traga novas explicações sobre as ações desta proteína.

5.2- Avaliação da expressão do gene SAH ao longo do desenvolvimento de ratos SHR e WKY

O gene SAH (sigla para spontaneously hypertensive rat-clone A hypertension-associated gene) não possui, até o presente momento, nenhuma função definida para seu produto protéico. Porém, diversos estudos têm associado sua expressão ao desenvolvimento da hipertensão essencial em humanos e modelos animais para a hipertensão.

Quase a totalidade dos trabalhos (com exceção de Kaiser e colaboradores (1994) e Mishima e colaboradores (2000)), concentram seus estudos de associação da hipertensão com a expressão do gene SAH no sistema renal.

O presente estudo foi bem sucedido em detectar a presença do mRNA deste gene em três áreas do SNC importantes para a regulação da PA, a saber: a região do bulbo dorsal, que contém o NTS; a região do bulbo ventrolateral, também chamada de medula ventrolateral; e a região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo, tanto em animais hipertensos SHR, quanto nos animais normotensos WKY.

Os detalhes da expressão do gene SAH em cada uma destas regiões, além da verificação desta ao longo de diferentes idades nestes animais nas duas cepas serão discutidos a seguir.

- *Expressão do gene SAH na região do bulbo dorsal que contém o núcleo do trato solitário*

No trabalho de Iwai e colaboradores (1991), que descreveu o gene SAH pela primeira vez, foi observada uma expressão quase 10 vezes maior do gene SAH em rins de ratos SHR e relação aos WKY, sendo que esta diferença se acentuou ainda mais com o avanço da idade dos animais.

De acordo com estas observações e com outras que surgiram em trabalhos posteriores, os resultados esperados neste estudo apontariam para uma expressão mais pronunciada no SNC dos animais da linhagem hipertensa, possivelmente aumentando ainda mais com o desenvolvimento.

Porém, os resultados obtidos na região dorsal do bulbo demonstraram uma expressão mais baixa do gene SAH nos animais hipertensos em relação aos animais normotensos controle.

Na comparação entre as duas linhagens, os animais hipertensos SHR com 1 dia e 3 meses de vida apresentaram uma menor expressão do gene SAH em relação aos animais normotensos controle.

Já na comparação entre as diferentes idades de cada linhagem os SHR não apresentaram diferenças, enquanto a cepa normotensa WKY apresentou uma expressão do gene SAH na região do BD pelo menos 2 vezes mais alta nos indivíduos com 1 dia em relação às outras idades. Ainda, na mesma linhagem, foi verificada uma menor expressão do gene nos animais de 3 meses em relação aos mesmos animais com 1 mês de vida.

Pelo fato de não haver ainda estudos descrevendo o perfil de expressão do gene ao longo do desenvolvimento dos animais e nem mesmo as funções dos seus produtos ao organismo, não podemos afirmar com certeza qual a real

explicação para a expressão mais baixa verificada nos animais hipertensos, porém algumas hipóteses podem ser levantadas.

Pela discordância entre os resultados observados no sistema renal por Iwai e colaboradores (1991) e os nossos, relativos ao SNC, inicialmente podemos afirmar que existe uma diferença de perfil e, possivelmente, na função que o gene desempenha nos dois sistemas.

Como dito, ainda não foram realizados estudos descrevendo o perfil de expressão do gene SAH em nenhum dos sistemas nos quais ele foi encontrado. Porém, trabalhos anteriores descreveram uma variação na expressão dos componentes envolvidos no metabolismo de xenobióticos (função atribuída ao produto do gene SAH) de modo linhagem e idade-dependente (Yoon, Madden *et al.*, 2006; Lee, Ward *et al.*, 2008).

Yoon e colaboradores (2006) citam em seu trabalho que crianças e ratos jovens têm uma maior susceptibilidade à exposição a alguns xenobióticos, como o formoldeído.

Neste mesmo estudo, os pesquisadores comprovam que esta maior susceptibilidade se deve à menor produção de algumas das enzimas metabolizadoras de xenobióticos, classe a qual pertence o formoldeído. Desta forma, os resultados puderam comprovar que, neste caso, a produção da enzima aldeído-desidrogenase aumenta de uma forma concomitante ao desenvolvimento de ratos WKY.

Lee e colaboradores (2008) também demonstram, por meio de experimentos de microarranjos de DNA, que existe uma variação (tanto para mais quanto para menos) na produção e liberação de diversas enzimas

pertencentes às vias de eliminação de xenobióticos, de acordo com o estágio de desenvolvimento em que se encontram os animais estudados.

Isto demonstra que há uma diferença nos mecanismos de controle destas enzimas, sendo que o aumento na produção conforme o estágio de desenvolvimento não é uma regra e depende da enzima em questão.

Guardadas as devidas proporções sobre as diferenças entre a metodologia empregada neste e nos outros trabalhos, nossos resultados também mostraram diferenças linhagem-dependentes em um dos componentes envolvidos na metabolização de xenobióticos, uma vez que esta característica é atribuída ao gene SAH.

No entanto, novas abordagens são necessárias para a elaboração de uma hipótese a respeito do mecanismo de controle da expressão do gene em SHR e o motivo pelo qual estes animais hipertensos exibem níveis mais baixos de expressão nesta região do SNC em relação à cepa normotensa, contrariando os resultados anteriores que ligavam a sua expressão mais alta à hipertensão verificada na cepa.

- Expressão do gene SAH na região do bulbo ventrolateral

Na região ventrolateral do bulbo não foi encontrada nenhuma diferença na comparação entre as duas linhagens em nenhuma das idades verificadas.

Já na comparação entre as diferentes idades dentro de cada linhagem, o resultado foi semelhante entre as cepas, revelando uma expressão muito mais acentuada nos animais de 1 dia do que nas demais idades. Este resultado se assemelha inclusive com aquele verificado para o BD, onde os animais neonatos também apresentaram uma taxa de expressão mais acentuada do que as demais idades.

Estes resultados, em conjunto com aqueles verificados na região do BD da cepa normotensa, sugerem que o gene SAH no SNC possa ter um papel importante nos estágios iniciais do desenvolvimento dos animais aqui estudados. No entanto, apesar de estarem sendo expressos em regiões importantes para os mecanismos de controle da PA, não é possível determinar qual a função precisa do gene nestes núcleos.

Ainda, de acordo com os resultados aqui apresentados, não foi verificada nenhuma ligação do gene nas duas regiões do tronco com a gênese da hipertensão essencial verificada nos animais SHR, uma vez que em uma delas a expressão foi menor na cepa hipertensa e em outra não houve diferença entre as duas linhagens.

- Expressão do gene SAH na região do hipotálamo que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo

A região do hipotálamo, ao contrário das regiões anteriores, foi a única a apresentar um ponto de maior expressão do gene SAH na linhagem hipertensa. Nesta cepa, os animais de 1 dia apresentaram uma taxa de expressão mais de duas vezes maior do que os animais da cepa normotensa WKY. Não foram verificadas diferenças entre as linhagens nas demais idades.

Na comparação entre as idades dentro de cada uma das linhagens, novamente a expressão do gene SAH nos animais hipertensos com 1 dia de vida superou as outras idades, não havendo diferenças dentre as idades nos animais WKY. Este resultado mais uma vez corrobora com a hipótese anteriormente proposta de que, no caso destas regiões do sistema nervoso central, o gene SAH parece ter um papel mais importante nos estágios iniciais da vida dos animais.

Porém, diferente das outras áreas analisadas, no hipotálamo, o gene pode estar ligado aos mecanismos desencadeadores da hipertensão verificada em SHR devido à diferença verificada em relação à cepa WKY. Mas como a diferença não se manteve nas idades subseqüentes, conclusões precisas ainda não podem ser tiradas.

É provável que a relação do gene com a hipertensão exista efetivamente nos mecanismos de controle da PA realizados pelo sistema renal nas idades adultas, confirmando os dados dos estudos anteriores.

Outros estudos já demonstraram uma menor expressão deste gene na linhagem hipertensa. Mishima e colaboradores (2000) encontraram menor quantidade de mRNA do SAH em ratos SHR em experimentos utilizando o

cérebro inteiro. Porém, ao comparar áreas específicas, foram encontradas diferenças de expressão dentro das regiões do SNC da linhagem SHR, onde a maior quantidade de mRNA foi encontrada em células epiteliais do plexo coróide; o NTS e núcleo dorsal motor do vago foram apontados como locais de muito baixa expressão do gene (Mishima, Shigematsu *et al.*, 2000).

De acordo com estes resultados, os autores inferiram que o papel do gene SAH no SNC deve, possivelmente, estar relacionado com o balanço de água e eletrólitos entre o sangue e o fluído cerebrospinal, dado o papel das células epiteliais do plexo coróide.

De certa forma, nossos resultados podem ser explicados de acordo com o trabalho de Mishima e colaboradores, pois este estudo, além de demonstrar que em alguns casos a expressão do gene pode ser menor nos ratos hipertensos, colocando em dúvida a relação deste com a hipertensão verificada em SHR, ele também verificou uma quantidade muito baixa de mRNA na região do BD de ratos hipertensos, especificamente no NTS, o que é semelhante aos nossos resultados.

Outro trabalho, estudando o perfil do gene em rins de várias linhagens de ratos SHR e WKY, vindos de diferentes locais de criação, verificou que diferenças entre a transcrição da SAH nos ratos hipertensos e normotensos nem sempre é uma regra. Ainda, foram encontradas diferenças transcricionais dentro das diferentes linhagens WKY (Ishinaga, Nabika *et al.*, 1997). A conclusão que chegam os pesquisadores frente a estes resultados é que diferenças simples entre a transcrição do gene nos rins de ratos hipertensos e normotensos não devem ser a causa da diferença fenotípica encontrada entre SHR e WKY.

Outros trabalhos mais recentes sobre os efeitos do gene SAH têm sugerido teorias que também vão contra a relação do gene SAH com a hipertensão.

Benjafield e colaboradores (2003), por exemplo, não encontraram relação de nenhum dos polimorfismos estudados do gene SAH com a hipertensão essencial em humanos, relacionado, portanto, a sua expressão, somente com a obesidade em indivíduos hipertensos, descartando qualquer relação direta com a hipertensão propriamente dita.

Haketa e colaboradores (2004) também só encontraram em seu trabalho relação entre o gene e a regulação dos níveis plasmáticos de colesterol de alta densidade, não verificando nenhuma ligação entre o gene SAH e a hipertensão essencial.

Por fim, Tikhonoff e colaboradores (2008), também não encontrando relação do gene SAH com a hipertensão, ou mesmo com fenótipos relacionados com a hipertensão em humanos, afirmam que as relações observadas nos trabalhos anteriores somente podem ser feitas quando se tratam de modelos animais, postulando, assim, que os resultados anteriores que apontaram a relação do gene com a patologia estariam equivocados.

De qualquer forma, pudemos detectar a expressão do gene em centros importantes, relacionados com o controle cardiovascular no sistema nervoso destes animais.

Os três trabalhos citados acima obtiveram seus resultados a partir de amostras humanas. Apesar da diferença do modelo experimental empregado, os resultados encontrados no presente trabalho parecem seguir a mesma linha, uma vez que não foi encontrada nenhuma relação direta da expressão do gene

SAH na maioria das regiões do sistema nervoso central com a gênese da hipertensão verificada nos animais adultos da linhagem SHR.

Resta saber se o perfil de expressão reflete o perfil protéico para os produtos do gene SAH nestas regiões do SNC, ou se nossos resultados aplicam-se apenas às regiões aqui estudadas ou em outras descritas como integrantes dos mecanismos de controle da PA. Estas respostas confirmariam ou não que a modulação da PA realizada pelo gene ocorreria predominantemente no nível renal, apoiando a grande concentração dos artigos publicados a respeito do SAH no sistema renal e os trabalhos que descartam a relação do gene com a hipertensão.

É possível ainda que, mesmo não guardando relação direta com a hipertensão, o gene SAH esteja envolvido com problemas de saúde relacionados com a doença. Ainda, outra possibilidade para a explicação dos resultados aqui verificados seria que a expressão do gene nestas áreas do SNC estaria restrito à vida pós nascimento, ou mesmo ao cuidado materno-fetal, uma vez que a expressão tende a cair com o desenvolvimento e mudanças de hábitos dos animais, como discutido no caso do gene codificador da ATRAP, podem estar envolvidas.

Muitas dúvidas ainda permanecem a cerca das funções deste gene e, infelizmente, publicações a seu respeito tornam-se cada vez mais escassas. Novos experimentos e abordagens devem ser realizados a fim de se obter conclusões mais precisas sobre o papel deste promissor gene nas regiões envolvidas com o controle da PA no sistema nervoso central.

5.3- A influência do tratamento de ratos SHR com bloqueador dos receptores AT₁, Olmesartan, na expressão dos genes SAH e da proteína ATRAP

As drogas que agem no sistema renina-angiotensina-aldosterona têm sido apontadas como as mais eficientes no tratamento da hipertensão em relação às outras classes de anti-hipertensivos, por apresentar melhoras das alterações estruturais e fisiológicas encontradas em animais e humanos hipertensos.

Neste contexto, o Olmesartan, medoxomila, é a mais nova integrante da classe dos bloqueadores dos receptores AT₁ de angiotensina, apresentando uma ação potente e agindo de maneira dose-dependente na redução da PA (Fernandes-Santos, De Souza Mendonca *et al.*, 2009).

Diferente da classe de drogas hipotensoras que agem inibindo a enzima conversora de angiotensina I em angiotensina II, os bloqueadores dos AT₁r apresentam a vantagem de não interferir na cascata do sistema renina-angiotensina-aldosterona, além de não alterar os efeitos dos receptores AT₂ devido sua grande especificidade (Fernandes-Santos, De Souza Mendonca *et al.*, 2009).

O Olmesartan possui grande afinidade pelos receptores AT₁, chegando a ser quase 10.000 vezes maior do que a afinidade verificada pelos receptores AT₂ (Brousil e Burke, 2003), justificando a sua utilização terapêutica e neste trabalho.

Em nossos experimentos, o tratamento dos ratos hipertensos da linhagem SHR com o Olmesartan foi eficiente em reduzir a pressão arterial sistólica (PAS), apresentando diferenças em relação ao grupo SHR controle. A influência da queda da PAS na expressão do gene codificador da proteína ATRAP e do gene SAH serão abordadas nos próximos tópicos.

- Influência do tratamento com Olmesartan na expressão do gene codificador da proteína ATRAP

Apesar do efeito hipotensor verificado após o tratamento com a droga, não foram observadas diferenças na expressão do gene codificador da proteína ATRAP entre os grupos tratado e controle em nenhuma das três regiões estudadas.

Porém, uma das conclusões a que pudemos chegar após o tratamento com o Olmesartan foi que a sua ação hipotensora no SNC parece influenciar a expressão do gene da proteína ATRAP de maneira região-específica.

Na comparação entre as três áreas dentro do grupo tratado, não foi verificada nenhuma diferença significativa entre as mesmas. Quando este mesmo fator é analisado dentre as mesmas regiões do grupo tratado, pode-se perceber que a região do BD apresenta uma expressão cerca de 50% maior do que as demais áreas verificadas.

Possivelmente esses resultados apontam uma maior sensibilidade desta região ao bloqueio dos receptores AT1, o que levaria a uma variação induzida da pressão arterial sistólica. No entanto, esta é apenas uma suposição, uma vez que novas abordagens são necessárias para a determinação de qual fator estaria relacionado à diferença observada.

Também não podemos aqui afirmar com certeza que a expressão deste gene na região dorsal do bulbo tenha um papel mais importante do que as demais áreas no controle da pressão arterial, pois os resultados de comparação entre as cepas, mostrados anteriormente (figura 2), não apresentaram diferenças nos animais com a idade daqueles utilizados no tratamento com o Olmesartan.

Dados de trabalhos anteriores mostraram uma taxa de expressão mais alta dos receptores AT1 (do subtipo AT1a) na região do NTS de ratos. Esta expressão foi maior inclusive do que na região hipotalâmica do PVN (Lenkei, Palkovits *et al.*, 1998). Estes dados poderiam explicar os resultados acima, uma vez que a maior expressão do receptor na região seria responsável também pela maior quantidade de mRNA verificada, porém não existem trabalhos avaliando as diferenças de ligação da ATRAP com os dois subtipos do receptor AT1 (AT1a e AT1b)

Já foi descrito que a ATRAP tem a capacidade de regular a ação dos receptores AT1 se ligando à sua porção carboxiterminal (Cui, Nakagami *et al.*, 2000). A regulação destes receptores pela ATRAP pode ainda ocorrer por outros mecanismos, no nível intracelular, como, por exemplo, via mobilização da molécula sinalizadora p38 MAPK (Shigenaga, Tamura *et al.*, 2008).

Porém, o efeito inverso, de alteração da expressão do gene da ATRAP pelo bloqueio dos receptores AT1 com o Olmesartan, ou mesmo por uma variação da pressão arterial sistólica, parece não ocorrer, como sugerem nossos resultados.

Shigenaga e colaboradores (2008) puderam observar diferenças na expressão da ATRAP no rim de ratos SHR tratados com uma dose hipotensora (6mg/kg/dia) e sub-hipotensora (0,6mg/kg/dia) de Olmesartan, mostrando, desta forma, que o tratamento foi capaz de reduzir a expressão do gene nestes tecidos independentemente do efeito hipotensor da droga, além de promover uma diminuição na população dos AT1r.

Vistos em conjunto, os resultados obtidos com a administração do Olmesartan no estudo de Shigenaga e neste trabalho parecem apontar para

um papel mais efetivo do gene codificador da proteína ATRAP na modulação da PA no nível renal do que nas regiões do relacionados com o controle da PA aqui abordadas.

- Influência do tratamento com Olmesartan na expressão do gene SAH

A queda da pressão arterial sistólica, obtida com a administração da droga Olmesartan, não provocou nenhuma alteração na expressão do gene SAH entre o grupo tratado e controle, em nenhuma das 3 regiões do sistema nervoso central aqui estudadas.

A comparação entre a expressão do mesmo gene dentre as regiões BD, BVL e HIP, como foi realizada para o gene da proteína ATRAP dentro de cada um dos grupos também não apresentou diferença significativa.

Apesar de estudos apontarem que a expressão do gene não guarda uma relação com os altos níveis de pressão arterial, os resultados obtidos nesta abordagem apontam que o mecanismo inverso de queda induzida na pressão arterial nestes animais não foi capaz de alterar a expressão do gene.

Uma provável explicação para este fato seria a maior relação dos produtos do gene SAH com a hipertensão quando eles são formados no nível do sistema renal, uma vez que a maioria dos trabalhos realizados se concentra neste sistema. Experimentos verificando uma possível modulação da expressão do gene nos rins após um desafio hipotensor diferente poderiam confirmar esta teoria.

Como discutido anteriormente, se realmente existe uma ligação realizada pelo gene SAH entre a hipertensão e os mecanismos de metabolização de xenobióticos, a verificação destes mecanismos também deve ser realizada após o tratamento hipotensor, o que ilustra a quantidade de questões que ainda permanecem e a quantidade de trabalhos que devem ser realizados para determinarmos a verdadeira função do gene e suas relações com outros sistemas de controle fisiológico.

Como se pode perceber, muitas são as dúvidas que permanecem a respeito dos dois genes abordados neste estudo e muito trabalho ainda deve ser feito para determinarmos as suas reais funções no sistema nervoso central, além das suas implicações na modulação neural da pressão arterial.

No entanto, nossos resultados trazem uma grande contribuição para os trabalhos futuros abordando os mecanismos existentes no sistema nervoso central envolvidos na gênese e manutenção da hipertensão.

Eles determinaram a expressão de ambos os genes em regiões importantes para o controle da PA, as reais relações desta expressão com a hipertensão verificada nos ratos SHR, além de provar que a modulação terapêutica da pressão arterial não é capaz de alterar a expressão dos genes.

6- Conclusões

- Foi constatada a expressão do gene codificador da proteína ATRAP e do gene SAH no bulbo ventrolateral, bulbo dorsal e no hipotálamo (que contém o núcleo paraventricular do hipotálamo) tanto em ratos hipertensos SHR, como em ratos Wistar Kyoto, normotensos. Estas áreas são conhecidas por relacionar-se ao controle da pressão arterial realizado pelo sistema nervoso central.
- A expressão do gene codificador da proteína ATRAP e do gene SAH no sistema nervoso central, ocorrem de modo região e idade-dependente, sugerindo que os produtos de cada um deles devem desempenhar papéis diferentes no controle da pressão arterial de acordo com a região, a fase do desenvolvimento dos animais e da gênese hipertensiva verificada nos SHR.
- Ainda não foi possível estabelecer uma relação da expressão do gene SAH nas regiões estudadas com o fenótipo hipertenso verificado na cepa SHR, principalmente no que diz respeito às regiões bulbares aqui abordadas.
- O tratamento de ratos hipertensos SHR com a droga Olmesartan, em dose hipotensora, não foi capaz de alterar a transcrição de nenhum dos dois genes estudados na comparação entre os grupos tratado e controle. Porém, este tratamento influenciou de maneira diferente a transcrição do gene codificador da proteína ATRAP nas regiões estudadas, sugerindo efeitos diferentes da droga de acordo com o núcleo estudado.

7- Referências Bibliográficas

- Atlas, S. A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. J Manag Care Pharm, v.13, n.8 Suppl B, Oct, p.9-20. 2007.
- Blessing, W. W., C. B. Jaeger, *et al.* Hypothalamic projections of medullary catecholamine neurons in the rabbit: a combined catecholamine fluorescence and HRP transport study. Brain Res Bull, v.9, n.1-6, Jul-Dec, p.279-86. 1982.
- Brousil, J. A. e J. M. Burke. Olmesartan medoxomil: an angiotensin II-receptor blocker. Clin Ther, v.25, n.4, Apr, p.1041-55. 2003.
- Carey, R. M. e H. M. Siragy. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. Endocr Rev, v.24, n.3, Jun, p.261-71. 2003.
- Casto, R. e M. I. Phillips. Mechanism of pressor effects by angiotensin in the nucleus tractus solitarius of rats. Am J Physiol, v.247, n.3 Pt 2, Sep, p.R575-81. 1984.
- Chon, H., C. A. Gaillard, *et al.* Broadly altered gene expression in blood leukocytes in essential hypertension is absent during treatment. Hypertension, v.43, n.5, May, p.947-51. 2004.
- Correa, F. M., M. Viswanathan, *et al.* Kidney angiotensin II receptors and converting enzyme in neonatal and adult Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. Peptides, v.16, n.1, p.19-24. 1995.
- Cowley, A. W., Jr. Long-term control of arterial blood pressure. Physiol Rev, v.72, n.1, Jan, p.231-300. 1992.
- Cravo, S. L., R. R. Campos, *et al.* Role of the medulla oblongata in normal and high arterial blood pressure regulation: the contribution of Escola Paulista de Medicina - UNIFESP. An Acad Bras Cienc, v.81, n.3, Sep, p.589-603. 2009.
- Cravo, S. L., S. F. Morrison, *et al.* Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla. Am J Physiol, v.261, n.4 Pt 2, Oct, p.R985-94. 1991.
- Cui, T., H. Nakagami, *et al.* ATRAP, novel AT1 receptor associated protein, enhances internalization of AT1 receptor and inhibits vascular smooth muscle cell growth. Biochem Biophys Res Commun, v.279, n.3, Dec 29, p.938-41. 2000.
- Daviet, L., J. Y. Lehtonen, *et al.* Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. J Biol Chem, v.274, n.24, Jun 11, p.17058-62. 1999.

- Delva, P., A. Lechi, *et al.* Collagen I and III mRNA gene expression and cell growth potential of skin fibroblasts in patients with essential hypertension. J Hypertens, v.20, n.7, Jul, p.1393-9. 2002.
- Doggrell, S. A. e L. Brown. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. Cardiovasc Res, v.39, n.1, Jul, p.89-105. 1998.
- Elbekai, R. H. e A. O. El-Kadi. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. Pharmacol Ther, v.112, n.2, Nov, p.564-87. 2006.
- Eshima, K., Y. Hirooka, *et al.* Angiotensin in the nucleus tractus solitarii contributes to neurogenic hypertension caused by chronic nitric oxide synthase inhibition. Hypertension, v.36, n.2, Aug, p.259-63. 2000.
- Fernandes-Santos, C., L. De Souza Mendonca, *et al.* Favorable cardiac and aortic remodeling in olmesartan-treated spontaneously hypertensive rats. Heart Vessels, v.24, n.3, May, p.219-27. 2009.
- Ferrari, M. F. e D. R. Fior-Chadi. Differential expression of nNOS mRNA and protein in the nucleus tractus solitarii of young and aged Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. J Hypertens, v.23, n.9, Sep, p.1683-90. 2005.
- Ferrari, M. F. e D. R. Fior-Chadi. Chronic nicotine administration. Analysis of the development of hypertension and glutamatergic neurotransmission. Brain Res Bull, v.72, n.4-6, May 30, p.215-24. 2007.
- Ferrari, M. F., M. K. Raizada, *et al.* Nicotine modulates the renin-angiotensin system of cultured neurons and glial cells from cardiovascular brain areas of Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. J Mol Neurosci, v.33, n.3, p.284-93. 2007.
- Ferrari, M. F., Raizada, *et al.* Differential regulation of the renin-angiotensin system by nicotine in WKY and SHR glia. J Mol Neurosci, v.35, n.2, Jun, p.151-60. 2008.
- Ferrari, M. F., E. M. Reis, *et al.* Gene expression profiling of cultured cells from brainstem of newborn spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. Cell Mol Neurobiol, v.29, n.3, May, p.287-308. 2009.
- Ferrario, C. M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, v.7, n.1, Mar, p.3-14. 2006.
- Fior-Chadi, D. R. e K. Fuxe. Quantitative receptor radioautography in the study of receptor-receptor interactions in the nucleus tractus solitarii. Braz J Med Biol Res, v.31, n.2, Feb, p.225-30. 1998.
- Fior, D. R. e K. Fuxe. Bradykinin modulation of alpha 2-adrenoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. An in vitro autoradiographical study. Neuropharmacology, v.34, n.1, Jan, p.81-8. 1995.

- Fior, D. R., S. N. Yang, *et al.* Evidence for an antagonistic angiotensin II/alpha 2-adrenoceptor interaction in the nucleus tractus solitarii. Eur J Pharmacol, v.262, n.3, Sep 12, p.271-82. 1994.
- Gottlieb, R. A. Cytochrome P450: major player in reperfusion injury. Arch Biochem Biophys, v.420, n.2, Dec 15, p.262-7. 2003.
- Guyenet, P. G. The sympathetic control of blood pressure. Nat Rev Neurosci, v.7, n.5, May, p.335-46. 2006.
- Guyenet, P. G., N. Koshiya, *et al.* Role of medulla oblongata in generation of sympathetic and vagal outflows. Prog Brain Res, v.107, p.127-44. 1996.
- Guyton, A. C. Roles of the kidneys and fluid volumes in arterial pressure regulation and hypertension. Chin J Physiol, v.32, n.2, p.49-57. 1989.
- Haketa, A., M. Soma, *et al.* Two medium-chain acyl-coenzyme A synthetase genes, SAH and MACS1, are associated with plasma high-density lipoprotein cholesterol levels, but they are not associated with essential hypertension. J Hypertens, v.22, n.10, Oct, p.1903-7. 2004.
- Hardy, S. G. Hypothalamic projections to cardiovascular centers of the medulla. Brain Res, v.894, n.2, Mar 16, p.233-40. 2001.
- Harrison-Bernard, L. M. The renal renin-angiotensin system. Adv Physiol Educ, v.33, n.4, Dec, p.270-4. 2009.
- Hunt, R. A., G. M. Ciuffo, *et al.* Quantification and localisation of angiotensin II receptors and angiotensin converting enzyme in the developing rat heart. Cardiovasc Res, v.29, n.6, Jun, p.834-40. 1995.
- Hunyady, L., M. Bor, *et al.* Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor. J Biol Chem, v.269, n.50, Dec 16, p.31378-82. 1994.
- Ishinaga, Y., T. Nabika, *et al.* Re-evaluation of the SA gene in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.24, n.1, Jan, p.18-22. 1997.
- Ito, S., K. Komatsu, *et al.* Ventrolateral medulla AT1 receptors support blood pressure in hypertensive rats. Hypertension, v.40, n.4, Oct, p.552-9. 2002.
- Iwai, N. e T. Inagami. Isolation of preferentially expressed genes in the kidneys of hypertensive rats. Hypertension, v.17, n.2, Feb, p.161-9. 1991.
- Iwai, N. e T. Inagami. Identification of a candidate gene responsible for the high blood pressure of spontaneously hypertensive rats. J Hypertens, v.10, n.10, Oct, p.1155-7. 1992.

- Iwai, N., T. Inagami, *et al.* Molecular genetics of the SA gene. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.21, n.11, Nov, p.913-4. 1994.
- Iwai, N., T. Katsuya, *et al.* Association between SAH, an acyl-CoA synthetase gene, and hypertriglyceridemia, obesity, and hypertension. Circulation, v.105, n.1, Jan 1, p.41-7. 2002.
- Iwai, N., Y. Tsujita, *et al.* Isolation of a chromosome 1 region that contributes to high blood pressure and salt sensitivity. Hypertension, v.32, n.4, Oct, p.636-8. 1998.
- Jin, Y., T. Kuznetsova, *et al.* Left ventricular structure in relation to the human SAH gene in the European Project on Genes in Hypertension. Hypertens Res, v.32, n.2, Feb, p.145-51. 2009.
- Johnston, C. I. Vasopressin in circulatory control and hypertension. J Hypertens, v.3, n.6, Dec, p.557-69. 1985.
- Joyner, M. J., N. Charkoudian, *et al.* A sympathetic view of the sympathetic nervous system and human blood pressure regulation. Exp Physiol, v.93, n.6, Jun, p.715-24. 2008.
- Julius, S. Interaction between renin and the autonomic nervous system in hypertension. Am Heart J, v.116, n.2 Pt 2, Aug, p.611-6. 1988.
- Kaiser, M. A., D. Lodwick, *et al.* The rat SA gene shows genotype-dependent tissue-specific expression. Clin Sci (Lond), v.87, n.1, Jul, p.1-4. 1994.
- Kenney, M. J., M. L. Weiss, *et al.* The paraventricular nucleus: an important component of the central neurocircuitry regulating sympathetic nerve outflow. Acta Physiol Scand, v.177, n.1, Jan, p.7-15. 2003.
- Kenney, M. J., M. L. Weiss, *et al.* Role of paraventricular nucleus in regulation of sympathetic nerve frequency components. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.284, n.5, May, p.H1710-20. 2003.
- Kurtz, T. W. e R. C. Morris, Jr. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. Hypertension, v.10, n.1, Jul, p.127-31. 1987.
- Laubie, M. e H. Schmitt. Destruction of the nucleus tractus solitarii in the dog: comparison with sinoaortic denervation. Am J Physiol, v.236, n.5, May, p.H736-43. 1979.
- Lawrence, A. J. e B. Jarrott. Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. Prog Neurobiol, v.48, n.1, Jan, p.21-53. 1996.
- Lee, J. S., W. O. Ward, *et al.* Coordinated changes in xenobiotic metabolizing enzyme gene expression in aging male rats. Toxicol Sci, v.106, n.1, Nov, p.263-83. 2008.

- Lenkei, Z., M. Palkovits, *et al.* Distribution of angiotensin type-1 receptor messenger RNA expression in the adult rat brain. Neuroscience, v.82, n.3, Feb, p.827-41. 1998.
- Limas, C., B. Westrum, *et al.* The evolution of vascular changes in the spontaneously hypertensive rat. Am J Pathol, v.98, n.2, Feb, p.357-84. 1980.
- Lindpaintner, K., P. Hilbert, *et al.* Molecular genetics of the SA-gene: cosegregation with hypertension and mapping to rat chromosome 1. J Hypertens, v.11, n.1, Jan, p.19-23. 1993.
- Lowes, V. L., L. E. Mclean, *et al.* Cardiovascular consequences of microinjection of vasopressin and angiotensin II in the area postrema. Am J Physiol, v.265, n.3 Pt 2, Sep, p.R625-31. 1993.
- Millan, M. A., D. M. Jacobowitz, *et al.* Differential distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.24, Dec 15, p.11440-4. 1991.
- Mishima, A., K. Shigematsu, *et al.* Strain differences in SA gene expression in brain and kidney of normotensive and hypertensive rats. Cell Mol Neurobiol, v.20, n.6, Dec, p.633-52. 2000.
- Mochizuki, S., B. Dahlof, *et al.* Valsartan in a Japanese population with hypertension and other cardiovascular disease (Jikei Heart Study): a randomised, open-label, blinded endpoint morbidity-mortality study. Lancet, v.369, n.9571, Apr 28, p.1431-9. 2007.
- Nahmias, C., S. M. Cazaubon, *et al.* Angiotensin II AT2 receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells. Biochem J, v.306 (Pt 1), Feb 15, p.87-92. 1995.
- Narita, I., N. Saito, *et al.* Role of genetic polymorphism in the SA gene on the blood pressure and prognosis of renal function in patients with immunoglobulin A nephropathy. Hypertens Res, v.25, n.6, Nov, p.831-6. 2002.
- Nathan, M. A. e D. J. Reis. Chronic labile hypertension produced by lesions of the nucleus tractus solitarii in the cat. Circ Res, v.40, n.1, Jan, p.72-81. 1977.
- Navar, L. G. The role of the kidneys in hypertension. J Clin Hypertens (Greenwich), v.7, n.9, Sep, p.542-9. 2005.
- Okamoto, K. e K. Aoki. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. Jpn Circ J, v.27, Mar, p.282-93. 1963.
- Okuyama, S., T. Sakagawa, *et al.* Role of the angiotensin II type-2 receptor in the mouse central nervous system. Jpn J Pharmacol, v.81, n.3, Nov, p.259-63. 1999.
- Onai, T., M. Saji, *et al.* Functional subdivisions of the nucleus tractus solitarii of the rat as determined by circulatory and respiratory responses to electrical stimulation of the nucleus. J Auton Nerv Syst, v.21, n.2-3, Dec, p.195-202. 1987.

- Onai, T., K. Takayama, *et al.* Projections to areas of the nucleus tractus solitarii related to circulatory and respiratory responses in cats. J Auton Nerv Syst, v.18, n.2, Feb, p.163-75. 1987.
- Pan, H. L. Brain angiotensin II and synaptic transmission. Neuroscientist, v.10, n.5, Oct, p.422-31. 2004.
- Raizada, M. K., D. Lu, *et al.* Increased angiotensin II type-1 receptor gene expression in neuronal cultures from spontaneously hypertensive rats. Endocrinology, v.132, n.4, Apr, p.1715-22. 1993.
- Reis, D. J. The nucleus tractus solitarius and experimental neurogenic hypertension: evidence for a central neural imbalance hypothesis of hypertensive disease. Adv Biochem Psychopharmacol, v.28, p.409-20. 1981.
- Reis, D. J., A. R. Granata, *et al.* Brain stem catecholamine mechanisms in tonic and reflex control of blood pressure. Hypertension, v.6, n.5 Pt 2, Sep-Oct, p.II7-15. 1984.
- Reja, V., A. K. Goodchild, *et al.* Tyrosine hydroxylase gene expression in ventrolateral medulla oblongata of WKY and SHR: a quantitative real-time polymerase chain reaction study. Auton Neurosci, v.98, n.1-2, Jun 28, p.79-84. 2002.
- Reja, V., A. K. Goodchild, *et al.* Upregulation of angiotensin AT1 receptor and intracellular kinase gene expression in hypertensive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.33, n.8, Aug, p.690-5. 2006.
- Reja, V., A. K. Goodchild, *et al.* Catecholamine-related gene expression correlates with blood pressures in SHR. Hypertension, v.40, n.3, Sep, p.342-7. 2002.
- Rizzoni, D., E. Porteri, *et al.* Effect of treatment with candesartan or enalapril on subcutaneous small artery structure in hypertensive patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. Hypertension, v.45, n.4, Apr, p.659-65. 2005.
- Roman, R. J. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. Physiol Rev, v.82, n.1, Jan, p.131-85. 2002.
- Romero, J. C. e J. F. Reckelhoff. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. Hypertension, v.34, n.4 Pt 2, Oct, p.943-9. 1999.
- Samani, N. J., S. A. Whitmore, *et al.* Chromosomal assignment of the human SA gene to 16p13.11 and demonstration of its expression in the kidney. Biochem Biophys Res Commun, v.199, n.2, Mar 15, p.862-8. 1994.
- Schlenker, E. H. Integration in the PVN: another piece of the puzzle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.289, n.3, Sep, p.R653-5. 2005.
- Schmieder, R. E., K. F. Hilgers, *et al.* Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. Lancet, v.369, n.9568, Apr 7, p.1208-19. 2007.

Shigenaga, A., K. Tamura, *et al.* Effect of olmesartan on tissue expression balance between angiotensin II receptor and its inhibitory binding molecule. Hypertension, v.52, n.4, Oct, p.672-8. 2008.

Song, K., J. Zhuo, *et al.* Angiotensin II receptor subtypes in rat brain and peripheral tissues. Cardiology, v.79 Suppl 1, p.45-54. 1991.

Spiecker, M. e J. K. Liao. Vascular protective effects of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. Arch Biochem Biophys, v.433, n.2, Jan 15, p.413-20. 2005.

Swaab, D. F., F. Nijveldt, *et al.* Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. J Endocrinol, v.67, n.3, Dec, p.461-2. 1975.

Swanson, L. W. e P. E. Sawchenko. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. Neuroendocrinology, v.31, n.6, Dec, p.410-7. 1980.

Taler, S. J. Secondary causes of hypertension. Prim Care, v.35, n.3, Sep, p.489-500, vi. 2008.

Telgmann, R., E. Brand, *et al.* SAH gene variants are associated with obesity-related hypertension in Caucasians: the PEGASE Study. J Hypertens, v.25, n.3, Mar, p.557-64. 2007.

Tikhonova, I. G. e S. Costanzi. Unraveling the structure and function of G protein-coupled receptors through NMR spectroscopy. Curr Pharm Des, v.15, n.35, p.4003-16. 2009.

Toal, C. B. e F. H. Leenen. Body fluid volumes during development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. J Hypertens, v.1, n.4, Dec, p.345-50. 1983.

Tonelli, L., O. Jhren, *et al.* Gerbil angiotensin II AT1 receptors are highly expressed in the hippocampus and cerebral cortex during postnatal development. Neuroscience, v.95, n.4, p.981-91. 2000.

Tsutsumi, K. e J. M. Saavedra. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. Am J Physiol, v.261, n.1 Pt 2, Jul, p.R209-16. 1991.

Van Giersbergen, P. L., M. Palkovits, *et al.* Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. Physiol Rev, v.72, n.3, Jul, p.789-824. 1992.

Vaneckova, I. Function of the isolated perfused kidney in young and adult spontaneously hypertensive and dahl salt-sensitive rats. Kidney Blood Press Res, v.25, n.5, p.315-21. 2002.

Vessey, D. A. e M. Kelley. Purification and partial sequencing of the XL-I form of xenobiotic-metabolizing medium chain fatty acid:CoA ligase from bovine liver

- mitochondria, and its homology with the essential hypertension protein. Biochim Biophys Acta, v.1346, n.3, Jun 23, p.231-6. 1997.
- Viswanathan, M., K. Tsutsumi, *et al.* Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. Biochem Biophys Res Commun, v.179, n.3, Sep 30, p.1361-7. 1991.
- Waki, H., S. S. Gouraud, *et al.* Evidence of specific inflammatory condition in nucleus tractus solitarii of neurogenic hypertension. Exp Physiol, Nov 18. 2009.
- Yang, S. N., D. R. Fior, *et al.* Selective modulation of the NPY receptors of the Y2 subtype by alpha 2 receptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. A cardiovascular and quantitative receptor autoradiographical analysis. Brain Res, v.654, n.1, Aug 15, p.137-44. 1994.
- Yang, S. N., D. R. Fior, *et al.* Coinjections of NPY(1-36) or [Leu31,Pro34]NPY with adrenaline in the nucleus tractus solitarius of the rat counteract the vasodepressor responses to adrenaline. Neurosci Lett, v.171, n.1-2, Apr 25, p.27-31. 1994.
- Yokoyama, H., D. B. Averill, *et al.* Role of blood pressure reduction in prevention of cardiac and vascular hypertrophy. Am J Hypertens, v.18, n.7, Jul, p.922-9. 2005.
- Yoon, M., M. C. Madden, *et al.* Developmental expression of aldehyde dehydrogenase in rat: a comparison of liver and lung development. Toxicol Sci, v.89, n.2, Feb, p.386-98. 2006.
- Yoshimoto, T. e Y. Hirata. Aldosterone as a cardiovascular risk hormone. Endocr J, v.54, n.3, Jun, p.359-70. 2007.
- Zanutto, B. S., M. E. Valentinuzzi, *et al.* Neural set point for the control of arterial pressure: role of the nucleus tractus solitarius. Biomed Eng Online, v.9, p.4. 2010.