Leila Buttler

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PI3K E SUA INTERAÇÃO
COM A ANGIOTENSINA II EM NÚCLEOS CENTRAIS
AUTONÔMICOS DE ANIMAIS HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

Leila Buttler

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PI3K E SUA INTERAÇÃO
COM A ANGIOTENSINA II EM NÚCLEOS CENTRAIS
AUTONÔMICOS DE ANIMAIS HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

Versão Original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Buttler, Leila.

Avaliação da expressão da PI3K e sua interação com a angiotensina II em núcleos centrais autonômicos de animais hipertensos / Leila Buttler. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Vagner Roberto Antunes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Controle neural da circulação.

Versão do título para o inglês: Evaluation of PI3K expression and its interaction with angiotensin II on central autonomic nuclei of hypertensive animals.

Descritores: 1. Hipertensão 2. Angiotensina II 3. PI3K 4. p-Akt 5. PVN 6. NTS I. Antunes, Vagner Roberto II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB068/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leila Buttler.

Título da Dissertação: Avaliação da expressão da PI3K e sua interação com a
angiotensina II em núcleos centrais autonômicos de animais
hipertensos.

Orientador(a): Vagner Roberto Antunes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **105** nas fls. **50** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Vagner Roberto Antunes** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Análise funcional de genes relacionados à hipertensão neurogênica**" do qual participou(aram) a pesquisadora **Lisete C. Michelini**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **22.11.2007**.

São Paulo, 23 de novembro de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA – ICB/USP

Dedico esse trabalho à minha maravilhosa família - meus pais João e Maria, à minha irmã Lilian e aos meus sobrinhos Thiago e Fernando.

AGRADECIMENTOS

Deixo registrado meu agradecimento a pessoas muito especiais que estiveram ao meu lado e que acompanharam minhas batalhas e conquistas durante mestrado.

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, João e Maria, por todo suporte que me deram e sem o qual eu não conseguiria chegar aonde cheguei. Agradeço também a minha irmã Lilian e meu cunhado Giva por todo apoio, aos meus sobrinhos Thiago e Fernando que sempre alegram meus dias e ao meu namorado Danilo pelos bons momentos, apoio e compreensão.

Agradeço também ao professor Vagner por ter acreditado em mim, por ter me ensinado com dedicação, contribuindo para meu amadurecimento como pesquisadora.

Aos meus amigos queridos, pelos “ombros”, risadas, conselhos e ajuda, especialmente: Olívia Beloto da Silva, Aline David Silva, Thais Tessari Zampieri, Adriana Ruggeri, Rafael Peres, Robinson Sabino e Carlos Alexandre Staico.

À colega Carla R. Bromati por ter ficado comigo até meia noite no laboratório me ensinado a fazer *Western-Blotting*.

Aos os técnicos de laboratório que me tiveram paciência para me ajudar e ensinar, principalmente: Alexandre Ceroni, Marcio Pinotti Guirao, Julieta H. Scialfa Falcão, Luciene M Ribeiro (Teca), Maristela M Okamoto, José Luis dos Santos e Marilu.

Aos professores que me ensinaram, incentivaram e que servem como exemplo para mim, especialmente: Profa. Lisete C. Michelini, Prof. Thiago S. Moreira, Profa. Ana Carolina Takakura, Profa. Sara Joyce S. Lagnado, Prof. Luis Roberto G. de Britto e Profa. Silvana A. Bordin da Silva.

Aos funcionários do biotério de experimentação – Cláudio Lúcio de Castro, Maria Alice Silva Lima, Vilson Rosa Batista e José Miguel do Nascimento.

Agradeço também o técnico de informática e colega Itamar Klemps Filho, o secretário da pós-graduação José Maria Rodrigues Filho, e os funcionários do departamento: Claudia Ribeiro, Patrícia Ramalho Santos, Leila Gomes de Moraes Affini e Tarcisio Aparecido Dantas Dias.

E por fim, agradeço as agências de fomento CAPES e FAPESP.

*“Só se pode alcançar um grande êxito
quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”
(Friedrich Nietzsche)*

RESUMO

BUTTLER, L. **Avaliação da PI3K e sua interação com a angiotensina II em núcleos centrais de animais hipertensos**. 2011. 48 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2011.

O sistema nervoso central (SNC) desempenha papel crítico na patogênese da hipertensão arterial (HA). É muito provável que uma das causas dessa patologia esteja estreitamente relacionada às alterações nas bases moleculares genéticas e bioquímicas neuronais de núcleos autonômicos específicos que estão diretamente relacionados com o controle dos reflexos cardiovasculares. Dentre estes núcleos destacam-se o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o núcleo do trato solitário (NTS) e bulbo rostroventrolateral (RVLM). A angiotensina II (ANG II), atuando via receptores AT_1 nestes três núcleos autonômicos desempenha importante papel no controle neural da PA. Estudos *in vitro*, realizados em cultura primária de células neuronais de núcleos autonômicos, demonstraram uma via de sinalização da ANG II envolvendo a ativação da enzima fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K). Vários subprodutos decorrentes de sua ativação foram identificados e entre eles está a proteína Akt. No presente estudo avaliamos as diferenças na atividade da PI3K, por meio da quantificação da AKT fosforilada (p-Akt) no PVN, NTS e RVLM de animais SHR comparados aos controles normotensos WKY e Wistar. A técnica de *immunoblotting* foi aplicada para quantificar a expressão da subunidade regulatória p85 da PI3K e da p-Akt no PVN, NTS e RVLM de SHR e animais normotensos. Além disso, foi avaliada a interação da PI3K com os efeitos cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca) da ANG II exógena injetada diretamente no PVN de animais normotensos acordados. A expressão da p85 não diferiu entre os núcleos estudados em qualquer grupo experimental (SHR, WKY e Wistar). No entanto, a expressão da p-Akt apresentou-se significativamente maior no PVN de SHR (1,5x), quando comparada com Wistar. Além disso, observamos que a injeção unilateral de ANG II (10 μ M; 100 nL) no PVN promoveu aumento da PAM (13 ± 1 mmHg, n= 5), a qual foi significativamente reduzida 5 min após a injeção do inibidor da PI3K [LY294002, 50 μ M; 100 nL, (PAM: 4 ± 1 mmHg, n= 5; $p < 0,05$)], com recuperação da resposta 30 min mais tarde (11 ± 1 mmHg; n= 5). A redução da frequência cardíaca promovida pela microinjeção de ANG II (situação basal) no PVN (-34 ± 4 bpm, n= 5) também foi significativamente diminuída após o bloqueio da PI3K com LY294002 (-9 ± 5 bpm, n= 5; $p < 0,05$) 5 min após o bloqueio da PI3K, porém não diferiu dos valores do grupo controle-veículo (FC basal = -26 ± 3 bpm; FC 5 min = -13 ± 4 bpm; FC 30 min = -23 ± 7 bpm, n= 5) no mesmo período de tempo. Em conclusão, podemos sugerir que a via da PI3K está mais ativa no PVN de animais hipertensos e há uma interação entre as vias da ANG II-PI3K que pode estar diretamente relacionada com a hipertensão neurogênica neste núcleo autonômico.

Palavras-chave: Hipertensão. ANG II. PI3K. p-Akt. PVN. NTS. RVLM.

ABSTRACT

BUTTLER, L. **Evaluation of the PI3K and its interaction with angiotensin II in central autonomic nuclei of hypertensive animals.** 2011. 48p. Master's Thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The central nervous system (CNS) plays an essential role on the pathogenesis of the hypertension. It is possible to assume that the causes of this pathology are closely associated to changes in the expression of genes network as well as in the molecular and biochemical signalling of specific autonomic nuclei of the hypothalamic-brainstem circuitry that control the cardiovascular reflexes and sympathetic activity (SNA). Among these nuclei are the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), the nucleus of the solitary tract (NST) and the rostroventrolateral medulla (RVLM). The angiotensin II (ANG II), acting through AT₁ receptors in these three autonomic nuclei, plays an important role on the neural control of the arterial pressure (AP). *In vitro* studies conducted in primary neuronal cell culture of autonomic nuclei have demonstrated a signaling pathway of the ANG II that involves the activation of the enzyme phosphoinositide 3-kinase (PI3K), with several subproducts due to its activation among of them the Akt protein. In the present study we evaluated the PI3K activity via expression of phospho-Akt (p-Akt) in the PVN, NTS and RVLM of SHR compared to normotensive rats WKY and Wistar. The immunoblotting technic was performed in order to compare the expression of the p85 regulatory subunit of PI3K and the p-Akt in the PVN, NTS and RVLM of SHR and normotensive animals. Moreover, we also evaluated the interaction of the PI3K with the exogenous ANG II injected into the PVN on arterial pressure and heart rate of conscious normotensive animals. The p85 expression was not different at all autonomic nuclei (PVN, NTS, RVLM) studied of any experimental group (SHR, Wistar and WKY). However, the p-Akt expression was significantly higher in the PVN of SHR (1.5 x) when compared to Wistar rats. Besides, we observed that the injection of ANG II (10 µM; 100 nL) into the PVN elicited a rise in the MAP (13±1 mmHg; n= 5), which was significantly reduced 5 min after the PI3K inhibitor [LY294002, 50 µM; 100 nL, (MAP 5±2 mmHg; n= 5; p<0,05)] with recovery 30 min later (MAP 11±1mmHg; n= 5). The bradycardic response induced by ANG II into the PVN (-34±4 bpm; n= 5) was significantly reduced 5 min after the PI3K antagonism (-9±5 bpm; n= 5), however it was not different of vehicle control group (basal HR = -26±3 bpm; HR 5 min = -13±4 bpm; HR 30 min = -23±7 bpm; n= 5) at the same time course. In conclusion, we can suggested that PI3K pathway is more activate at the PVN level of hypertensive rats and there is an interaction between ANG II-PI3K, which might be related to the hypertensive stage at this autonomic nuclei level.

Keywords: Hypertension. ANG II. PI3K. p-Akt. PVN. NTS. RVLM.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3V – terceiro ventrículo
Akt – proteína serina/treonina cinase ou proteína cinase B
ANG II – angiotensina II
ANS – atividade nervosa simpática
AP – antero-posterior
AT₁ – receptor de angiotensina II
c-Fos – proteína codificada pelo gene Fos
c-Jun – proteína codificada pelo gene Jun
CIL - coluna intermediolateral
CVOs - órgãos circunventriculares
DβH – dopamina beta-hidroxilase
DMV – núcleo motor dorsal do vago
DV – dorso-ventral
EM – eminência mediana
FC – frequência cardíaca
G_{βγ} – complexo formado pelas subunidades β e γ da proteína G
GPRC – receptores acoplados a proteína G
HA - hipertensão arterial
L - lateral
LY294002 – inibidor da PI3K
MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno
ME - eminência mediana
NA – núcleo ambíguo
NaT – transportador de noradrenalina
Nor - noradrenalina
NTS – núcleo do trato solitário
OVLT - órgão vascular da lâmina terminal
p110 – subunidade catalítica da PI3K, classe IA
p85 – subunidade regulatória da PI3K, classe IA
p-Akt – fosfo-AKT
PA – pressão arterial
PAM – pressão arterial média
PD098059 – inibidor da MAPK
PK-1 - proteína cinase dependente de fosfatidilinositol 3-fosfato
PI3K – fosfatidilinositol 3-cinase
PIP3 – fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato ou PtdIns(3,4,5)P₃
PKB – proteína cinase B ou Akt

PKC – proteína cinase C
PtdIns – fosfatidilinositol
PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo
Ras – proteína G monomérica
Raf – proto-oncogene proteína serina/treonina cinase
RVLM – bulbo rostroventrolateral
SFO – órgão subfornicial
SHIP - fosfatase de inositol 5-fosfato
SHR - ratos espontaneamente hipertensos
SNC – sistema nervoso central
spNTS – região subpostrema do núcleo do trato solitário
SRA – sistema renina-angiotensina
TH – tirosina hidroxilase
WKY – Wistar-Kyoto

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Cortes coronais do hipotálamo (núcleo paraventricular, PVN), e do tronco-cerebral (núcleo do trato solitário, NTS, e bulbo ventrolateral rostral, RVLM) representando com pontilhados em branco a delimitação anatômica para microdissecção. NA: núcleo ambíguo como referência para coleta dos tecidos do RVLM.....24
- Figura 2:** Desenho experimental do protocolo da injeção de ANG II antes e após a inibição da PI3K com LY294002 no PVN de ratos não anestesiados.....30
- Figura 3:** Conteúdo proteico da subunidade p85 da PI3K e da Akt fosforilada (p-Akt) no NTS. O painel A representa o conteúdo da subunidade p85 normalizada pela alfa-tubulina e o painel B o conteúdo da p-Akt normalizada pela Akt total no núcleo do trato solitário (NTS) de animais do GRUPO 1 (WKY vs SHR) e do GRUPO 2 (Wistar vs SHR); n=10 animais por grupo (5 normotensos e 5 hipertensos).....32
- Figura 4:** Conteúdo proteico da subunidade p85 da PI3K e da Akt fosforilada (p-Akt) no RVLM. O painel A representa o conteúdo da subunidade p85 normalizada pela alfa-tubulina e o painel B o conteúdo da p-Akt normalizada pela AKT total no bulboventrolateral rostral (RVLM) de animais do GRUPO 1 (WKY vs SHR) e do GRUPO 2 (Wistar vs SHR); n=10 animais por grupo (5 normotensos e 5 hipertensos).....33
- Figura 5:** Conteúdo proteico da subunidade p85 da PI3K e da Akt fosforilada (p-Akt) no PVN. O painel A representa o conteúdo da subunidade p85 normalizada pela alfa-tubulina e o painel B o conteúdo da p-Akt normalizada pela Akt total no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de animais do GRUPO 1 (WKY vs SHR) e do GRUPO 2 (Wistar vs SHR); n=10 animais por grupo (5 normotensos e 5 hipertensos).....34
- Figura 6:** Traçado de um animal não anestesiado, representativo do grupo, ilustrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PA mmHg), na pressão arterial média (PAM mmHg) e na frequência cardíaca (FC bpm) decorrente da injeção de ANG II antes (controle) e aos 5 e 30 min após a inibição da PI3K com LY294002 no PVN.....34
- Figura 7:** Variações na pressão arterial média (Δ PAM mmHg, painel **A**) e na frequência cardíaca (Δ FC bpm, painel **B**) em resposta à injeção de ANG II (10 μ M; 100 nL, n=5) no PVN, antes (controle), aos 5 e aos 30 minutos após a inibição da PI3K com LY294002 (50 μ M; 100 nL) ou veículo. *diferente em relação à resposta da ANG II controle e 30 min; $p < 0,05$36
- Figura 8:** Fotomicrografia de uma secção coronal do hipotálamo mostrando a trajetória das injetoras e o centro das injeções no PVN (cabecinhas de setas). 3V: terceiro ventrículo.....37

LISTA DE TABELA

- Tabela 1** - Valores basais da pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de dois diferentes grupos experimentais estudados: GRUPO 1: WKY (Wistar-Kyoto) e SHR (animais espontaneamente hipertensos) e GRUPO 2: Wistar e SHR. *diferente em relação ao SHR do respectivo grupo, $p \leq 0,05$, n= 5, animais de cada linhagem por grupo.....31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	HIPERTENSÃO ARTERIAL	14
1.2	ANGIOTENSINA II	15
1.3	A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K-AKT	17
1.4	SINALIZAÇÕES CELULARES ENVOLVENDO INTERAÇÕES ENTRE PI3K E ANG II E SUA RELAÇÃO COM A HIPERTENSÃO NEUROGÊNICA	19
2	OBJETIVO.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	ANÁLISE DE CONTEÚDO PROTEICO	22
3.1.1	Animais.....	22
3.1.2	Cateterização da artéria carótida	22
3.1.3	Registros das variáveis cardiovasculares.....	23
3.1.4	Coleta das fatias de tecidos cerebrais	23
3.1.5	Dissecção dos núcleos autonômicos do hipotálamo e bulbo	24
3.1.6	Extração de proteína total.....	25
3.1.7	Immunoblotting	25
3.1.8	Análise estatística	26
3.2	ESTUDO FUNCIONAL: INTERAÇÃO ANG II E PI3K.....	26
3.2.1	Animais.....	26
3.2.2	Implante de cânulas-guia em direção ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN).....	26
3.2.3	Injeções de fármacos no PVN.....	28
3.2.4	Cateterização da artéria femoral e registro de variáveis cardiovasculares.....	28
3.2.5	Histologia	29
3.2.6	Protocolo Experimental	29
3.2.7	Análise Estatística	30
4	RESULTADOS	31
4.1	ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA	31
4.1.1	Determinação dos níveis de PA e FC nos grupos de animais normotensos e hipertensos	31
4.1.2	Análise do conteúdo proteico da p85 e p-Akt no núcleo do trato solitário (NTS) de animais normotensos e hipertensos.....	32
4.1.3	Análise do conteúdo proteico da p85 e p-AKT no bulbo ventrolateral rostral (RVLM) de animais normotensos e hipertensos.....	32
4.1.4	Análise do conteúdo proteico da subunidade p85 e p-Akt no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de animais normotensos e hipertensos	33
4.2	ESTUDO FUNCIONAL: INTERAÇÃO ENTRE ANG II E PI3K	34
5	DISCUSSÃO	38
	REFERÊNCIAS..	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial (HA) é caracterizada pela elevação crônica da pressão arterial e representa a doença de maior prevalência entre as enfermidades cardiovasculares. Cerca de 20% da população de países desenvolvidos e mais de 500 milhões de pessoas em todo mundo apresentam ou apresentarão pressão arterial elevada. No Brasil, a HA representa a maior causa de mortalidade (~30%) e é responsável por aproximadamente 11% de todas as internações hospitalares (DATASUS do Ministério da Saúde). A HA triplica os riscos de doenças cardiovasculares, tais como, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca e aumenta em cerca de seis vezes a predisposição a acidente vascular cerebral. Diversos estudos na literatura científica demonstram o papel fundamental do sistema nervoso central (SNC) na patogênese da hipertensão, denominada de hipertensão neurogênica, essencialmente devido ao aumento na atividade nervosa simpática (ANS) e alterações na função dos barorreceptores arteriais.

Uma das causas da hipertensão neurogênica pode estar relacionada às alterações nas bases moleculares, genéticas e bioquímicas neuronais de específicos núcleos autonômicos relacionados diretamente aos ajustes dos reflexos cardiovasculares e ANS e, consequentemente, com o controle da pressão arterial (PA). Dentre estes núcleos destacamos o paraventricular do hipotálamo (PVN), e os núcleos tronco-encefálicos, núcleo do trato solitário (NTS) e bulbo rostroventrolateral (RVLM).

O PVN exerce papel fundamental na integração de sinais neuroendócrinos e autonômicos envolvidos na regulação da PA, volume sanguíneo e osmolaridade plasmática (SWANSON e SAWCHENKO, 1980). A ativação de seus neurônios por estímulos osmóticos ou pela administração de agonistas exógenos, tais como, a angiotensina II (ANG II) promove aumento na ANS (ZHU et al., 2002; ANTUNES et al., 2006). Animais espontaneamente hipertensos (SHR) possuem duas vezes mais células e fibras imunorreativas a ANG II nesse núcleo (WEYHENMEYER e PHILLIPS, 1982) e seu “*turnover*” (GANTEN et al., 1983) e concentração (PHILLIPS e KIMURA, 1988) encontram-se aumentadas no hipotálamo desses animais quando comparados aos seus controles normotensos Wistar-Kyoto (WKY).

O NTS é outro núcleo diretamente envolvido na integração do controle autonômico. Este núcleo é considerado a primeira estação sináptica dos aferentes dos reflexos cardiovasculares (SPYER, 1990) e possui papel ativo no controle da atividade pré-motora simpática, uma vez que sua lesão resulta em hipertensão fulminante e subsequente edema pulmonar e morte em ratos. A injeção de ANG II no NTS é capaz de deprimir o reflexo barorreceptor (PATON et al., 2001) e o bloqueio dos receptores do subtipo AT₁ de ANG II nesse núcleo restabelece o ganho do barorreflexo que se encontra debilitado em SHR, sugerindo que a ANG II, agindo em neurônios do NTS, estaria diretamente envolvida na modulação deste reflexo cardiovascular (MATSUMURA; AVERILL; FERRARIO, 1998).

Um segundo núcleo autonômico localizado no tronco-encefálico e que também desempenha fundamental papel na geração da atividade autonômica simpática é o RVLM. Neste núcleo estão localizados os neurônios pré-ganglionares motores simpáticos que se projetam diretamente para a coluna intermediolateral (CIL) da medula espinhal e, portanto, desempenham um papel chave na homeostasia da PA (SPYER, 1990; DAMPNEY, 1994). A lesão bilateral do RVLM causa redução na PA aos níveis observados em animais com lesão na medula espinhal (ALEXANDER, 1946). Dados na literatura sugerem que a ANG II nesse núcleo, também via ativação de receptores AT₁, participa da manutenção do tônus vasomotor e, conseqüentemente da PA em animais hipertensos (ALLEN, 2001; ITO et al., 2002).

1.2 Angiotensina II

Além de seu papel tradicional como hormônio circulante, a ANG II também está envolvida em mecanismos locais por meio da ativação do sistema renina-angiotensina tecidual em vários órgãos, incluindo o encéfalo, onde tanto a ANG II sistêmica quanto neuronal agem, via ativação de receptores AT₁, na modulação de várias funções, dentre elas cardiovasculares, autonômicas e comportamentais (ALLEN et al., 1998; MCKINLEY et al., 2003).

O receptor AT₁ pertence à família de receptores acoplados à proteína G (GPCR) e possuem sete alças transmembrana com uma extensão citoplasmática distinta (YANG et al., 1996; RICHARDS et al., 1999). Estes receptores estão localizados em tecidos periféricos, tais

como vasos sanguíneos, coração, rins, córtex da adrenal e fígado, além de também serem encontrados no hipotálamo e tronco encefálico, em áreas como PVN, eminência mediana (EM), órgão subfornicial (SFO), órgão vasculoso da lâmina terminalis (OVLT), NTS, núcleo dorsal motor do vago (DMV) e RVLM (RICHARDS et al., 1999).

Os receptores AT₁ neuronais estão envolvidos na neuromodulação de noradrenalina (Nor) que pode ser estimulada ou aumentada pela ANG II. O estímulo da neuromodulação noradrenérgica ocorre por meio da rápida liberação de sódio (Na⁺), inibição de canais de potássio (K⁺) e estimulação de canais de cálcio (Ca²⁺) (SUMNERS e GELBAND, 1998), enquanto que o aumento da neuromodulação de Nor pela ANG II envolve ativação intracelular das vias de sinalização através da Ras-Raf-MAP cinase (MAPK) levando a um aumento na transcrição do mRNA de tirosina hidroxilase (TH), dopamina β-hidroxilase (DβH) e do transportador de Nor (NaT) (YANG et al., 1996; GELBAND et al., 1998; RICHARDS et al., 1999).

Além de aumentar a síntese, captação e liberação de catecolaminas, a ANG II agindo no encéfalo como um neuromodulador, aumenta a liberação de vasopressina e leva a alterações fisiológicas e comportamentais, tais como, modificação na sensibilidade do barorreflexo (MATSUMURA; AVERILL; FERRARIO, 1998), aumento da ingestão de sódio e água (ANTUNES et al., 1998) aumento da ANS e PA (YANG et al., 1996; RICHARDS et al., 1999; YANG e RAIZADA, 1999). Entretanto, as bases celulares e moleculares das ações fisiológicas da ANG II no controle da PA não estão claramente estabelecidas (YANG e RAIZADA, 1999).

Sabe-se que o papel central das ações da ANG II no controle da PA se deve à sua interação com o subtipo de receptor AT₁ em áreas encefálicas de relevância no controle autonômico e cardiovascular, tais como, o PVN no hipotálamo e, o NTS e RVLM no tronco encefálico (ALLEN et al., 1998; YANG e RAIZADA, 1999; McKINLEY et al., 2003). Foi demonstrado experimentalmente que o sistema renina-angiotensina (SRA) está mais ativo em SHR, devido à elevada expressão de receptores AT₁ no encéfalo desses animais (YANG et al., 1996; YANG e RAIZADA, 1999).

Estudos realizados com cultura primária de neurônios do hipotálamo e tronco encefálico de SHR demonstraram que a ativação dos receptores AT₁ estimula a neuromodulação noradrenérgica por meio da sinalização intracelular envolvendo a

fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e a proteína cinase B (PBK ou Akt) (YANG e RAIZADA, 1999). Além disso, a ação da ANG II via receptores AT₁ na neuromodulação da Nor parece envolver apenas a via da MAPK em neurônios de animais normotensos (WKY), enquanto que em neurônios de SHR esta neuromodulação envolve tanto a via de sinalização intracelular da MAPK bem como da PI3K.

1.3 A via de sinalização PI3K-Akt

Sabe-se que a PI3K está envolvida na regulação de uma imensa gama de respostas biológicas (KUROSU et al., 1997; CORVERA e CZECH, 1998; DURONIO; SHEID; ETTINGER, 1998; FRUMAN et al., 1998; FRUMAN; MEYERS; CANTLEY, 1998; LEEVERS; VANHAESEBROECK; WATERFIELD, 1999; CANTRELL, 2001; CANTLEY, 2002) e que alterações na sua atividade contribuem para o desenvolvimento de cânceres humanos, diabetes tipo II (CANTLEY, 2002) e de muitas outras doenças incluindo alergias, inflamações e problemas cardíacos (FOSTER et al., 2003).

Existem várias isoformas de PI3Ks, as quais são subdivididas em três classes (I, II e III), de acordo com a especificidade de substrato, modo de ativação e estrutura molecular (CANTRELL, 2001; OUDIT et al., 2004). A classe I é formada por proteínas heterodiméricas, compreendendo uma subunidade catalítica p110 (110 KDa) e uma subunidade associada menor, adaptadora/regulatória, que parece ser seletiva para o PtdIns (4,5)P₂ (FRUMAN; MEYERS; CANTLEY, 1998; VANHAESEBROECK e WATERFIELD, 1999; KATSO et al., 2001; ANDERSON e JACKSON, 2003). A classe II inclui proteínas maiores (170-210 KDa) cujos efeitos biológicos *in vivo* ainda não são bem conhecidos. Já a classe III é representada por uma proteína da levedura (CANTRELL, 2001).

Portanto, as enzimas da classe I têm sido o principal foco de estudo das PI3Ks, além de geralmente estarem associadas a estímulos extracelulares (CANTRELL, 2001). Elas podem ser subdivididas em duas subclasses (I_A e I_B), baseadas em sua estrutura e modo de ativação (ANDERSON e JACKSON, 2003). As enzimas da classe I_A normalmente sinalizam *downstream* a tirosina cinases enquanto as enzimas da classe I_B são ativadas *downstream* à ativação de GPRCs, por meio de suas subunidades G_{βγ} (KUROSU et al., 1997; VANHAESEBROECK e WATERFIELD, 1999; CANTRELL, 2001; ANDERSON e JACKSON, 2003).

Há três isoformas catalíticas na classe I_A: p110 α , β e δ (DURONIO; SHEID; ETTINGER, 1998; FRUMAN; MEYERS; CANTLEY, 1998; FOSTER et al., 2003). As subunidades p110 α e a p110 β são amplamente distribuídas nos tecidos de mamíferos, em contraste à p110 δ , a qual mostra uma distribuição mais restrita, sendo encontrada principalmente em leucócitos (VANHAESEBROECK e WATERFIELD, 1999).

As subunidades catalíticas p110 formam um complexo com uma proteína regulatória/adaptadora normalmente denominada proteína p85, baseada no peso molecular das duas primeiras isoformas purificadas e clonadas: p85 α e p85 β (KATSO et al., 2001). As proteínas p85 não possuem qualquer atividade enzimática conhecida, porém desempenham papel crucial na atividade da PI3K, que é sua habilidade em facilitar a ligação da subunidade catalítica p110 à membrana plasmática onde estão localizados seus substratos lipídicos (FRUMAN et al., 1998; CANTRELL, 2001).

A única PI3K da classe I_B identificada até o momento é a subunidade catalítica p110 γ . Esta difere das proteínas da classe I_A, por não interagir com as proteínas p85, mas sim por formarem um complexo com a proteína regulatória p101. Os heterodímeros p110/p101 são ativados pelas subunidades G $\beta\gamma$ de proteínas G heterodiméricas (KUROSU et al., 1997; DURONIO; SHEID; ETTINGER, 1998; FRUMAN; MEYERS; CANTLEY, 1998; VANHAESEBROECK e WATERFIELD, 1999; KATSO et al., 2001).

A ativação das PI3Ks da classe I_A produzem diretamente fosfatidilinositol trifosfato [PtdIns(3,4,5)P₃ ou PIP₃] e indiretamente, via ação de 5' inositol fosfatase (SHIP), PtdIns(3,4)P₂ (VANHAESEBROECK e WATERFIELD, 1999; KATSO et al., 2001). Estes fosfatidilinositois são intensamente regulados em células estimuladas por agonistas (TOKER e CANTLEY, 1997; LEEVERS; VANHAESEBROECK; WATERFIELD, 1999) sendo normalmente ausentes em células não estimuladas, e tendo seus níveis aumentados em resposta a uma variedade de estímulos, quando desempenham papel de segundos mensageiros (TOKER e CANTLEY, 1997; ANDERSON e JACKSON, 2003). Estes segundos mensageiros podem levar à ativação de algumas proteínas, tais como a Akt (KUROSU et al., 1997; TOKER e CANTLEY, 1997; LEEVERS et al., 1999; VANHAESEBROECK e WATERFIELD, 1999), a qual possui importante papel como protetor celular, inibindo a apoptose e promovendo a sobrevivência celular (LEEVERS; VANHAESEBROECK; WATERFIELD, 1999).

1.4 Sinalizações celulares envolvendo interações entre PI3K e ANG II e sua relação com a hipertensão neurogênica

A ANG II participa do controle neural da PA devido à sua interação com os receptores AT₁ presentes em núcleos centrais que participam do controle autonômico e cardiovascular. Dentre esses núcleos destacam-se o núcleo hipotalâmico PVN e, os núcleos bulbares NTS e RVLM (ALLEN et al., 1998; YANG e RAIZADA, 1999; McKINLEY et al., 2003). Além disso, sabe-se que o sistema renina-angiotensina (SRA) encefálico está mais ativo em SHR, devido à elevada expressão de receptores AT₁ nesses animais (YANG et al., 1996; YANG e RAIZADA, 1999).

Yang e Raizada (1999), realizando estudo em cultura primária de neurônios, demonstraram que o aumento crônico da atividade neuromodulatória de Nor pela ANG II é um resultado da regulação transcricional de genes para NaT, TH e DβH em neurônios de ratos WKY e que as via da MAPK e PI3K são ativadas por meio de receptores AT₁, apenas em animais SHR. Além disso, estudos funcionais realizados por Seyedabadi, Goodchild e Pilowsky (2001) confirmaram os dados anteriormente citados por meio da injeção do inibidor da MAPK, PD098059, bilateralmente no RVLM que reduziu drasticamente a PA de WKY e SHR, enquanto que a injeção do inibidor da PI3K, wortmanina, bilateralmente no mesmo núcleo reduziu cerca de 35% da PA de SHR sem promover qualquer efeito na PA de WKY. Com estes resultados, os autores propuseram a existência de uma via de sinalização envolvendo a ativação da MAPK, que regula tonicamente a PA no RVLM de SHR e WKY, e a existência de uma via dependente da ativação da PI3K neste mesmo núcleo de SHR e que, a ativação de ambas as vias (MAPK e PI3K), apenas em SHR, seria importante para a manutenção da hipertensão nestes animais.

Estudos de Veerasingham et al. (2005) verificaram um aumento na expressão das subunidades p85α (regulatória) e p110γ (catalítica) da proteína PI3K em culturas primárias de células neuronais do PVN e RVLM de SHR quando comparados com WKY. Além disso, a exposição dessas células à ANG II exacerbou a expressão da subunidade p85α em SHR, levando os autores a sugerirem que as vias de sinalizações intracelulares da PI3K poderia desempenhar um papel crítico na patologia da hipertensão, tendo como substância mediadora a ANG II (YANG e RAIZADA, 1999). No entanto, nenhum estudo *in vivo* foi

realizado para evidenciar o real papel da PI3K e sua interação com as vias da ANG II na fisiopatologia da hipertensão. Deste modo, nossa hipótese de estudo foi de que poderia haver uma relação direta entre a ação da ANG II, via receptores AT₁ de núcleos centrais autonômicos, e a ativação da via da PI3K-Akt na hipertensão arterial.

2 OBJETIVO

Este trabalho teve por finalidade avaliar as diferenças na atividade da proteína PI3K, via conteúdo da Akt-fosforilada (p-Akt), em diferentes núcleos autonômicos cerebrais (PVN, NTS, RVLM) de animais hipertensos, bem como investigar a interação da proteína PI3K com as vias angiotensinérgicas nestes núcleos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise de conteúdo proteico

3.1.1 Animais

Foram utilizadas duas linhagens de ratos normotensos, WKY e Wistar, e uma linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Os animais utilizados neste estudo foram divididos em dois grupos, a saber: GRUPO 1: WKY e SHR e GRUPO 2: Wistar e SHR, sempre em idades pareadas (normotensos e hipertensos) compreendendo entre 12 e 20 semanas de vida. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Os mesmos foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Fisiologia e Biofísica e alojados em gaiolas sob condições favoráveis de temperatura (22-23 °C), umidade relativa do ar (40-50%) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à ração Nuvilab® (NUVITAL Ltda, Colombo, PR, Brasil). Os protocolos utilizados neste projeto estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP em 23/11/07 com protocolo registrado sob nº 105 nas fls. 50 do livro 2.

3.1.2 Cateterização da artéria carótida

Um dia antes dos registros cardiovasculares (PA e FC) foi realizada a cateterização da artéria carótida. Os cateteres utilizados foram confeccionados com um tubo de polietileno (PE-50) (Clay Adams, Parsipanny, N.J., USA) de cerca de 3 cm de comprimento, soldado a outro tubo tipo tygon (Saint Goubain, Akron, OH, USA) com 6 a 7 cm de comprimento. Antes de serem implantados, os cateteres foram preenchidos com solução fisiológica (NaCl, 154 mM) estéril e obstruídos com pinos de metal na extremidade livre do tygon. Para o implante dos cateteres os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (100 mg/Kg, *i.p.*) e xilazina (20 mg/Kg, *i.p.*). Após completa anestesia do animal, uma pequena incisão foi feita na região ventral do pescoço e o tecido muscular e conjuntivo foi afastado cuidadosamente

para isolamento da artéria carótida, pela qual um cateter foi introduzido. Uma vez implantado, o cateter foi exteriorizado na região escapular dorsal dos animais e fixado com linha de sutura à pele do animal. Após 24 horas foram registradas a PA e FC com o animal acordado e em livre movimentação.

3.1.3 Registros das variáveis cardiovasculares

Os registros da PAP, da PAM e da FC foram feitos no dia seguinte ao da cateterização, conectando-se o cateter arterial, previamente heparinizado, a um transdutor de pressão (Modelo CDX III, Cobe Labs, Lakewood, CO, USA), o qual estava acoplado a um amplificador (ML224 Quad Bridge Amp, ADInstruments, New South Wales, Austrália) e este a um sistema de aquisição de dados digital (PowerLab, ADInstruments, New South Wales, Austrália). A frequência de amostragem para aquisição dos parâmetros hemodinâmicos foi de 1000 Hertz. Os valores de PAP, PAM e FC foram analisados *off-line*.

3.1.4 Coleta das fatias de tecidos cerebrais

Após o registro dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral a 10% (*i.v.*) e decapitados com o auxílio de uma guilhotina (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Os encéfalos foram rapidamente removidos do crânio e colocados em uma matriz cerebral (Stainless Steel Rodent Brain Matrix, Adult Rat, Coronal Sections, Slice Width 1.0 mm, ASI Instruments Inc., MI, USA) previamente imersa em gelo. Em seguida foi feita uma secção coronal de 1 mm de espessura do hipotálamo, contendo o PVN, sempre utilizando o quiasma óptico como referência anatômica. O tronco cerebral foi separado e colado em um bloco montado de agarose 2,5% e submergido em uma base de apoio de um vibrátomo (Vibratome 1500, Vibratome, MO, USA) contendo líquido cérebro-espinhal artificial gelado (Mg_2SO_4 -50mM; KH_2PO_4 -50mM; KCl-200mM; NaHCO_3 -1M; NaCl-5M; CaCl_2 -100mM; D-glicose-20mM). Duas secções coronais do tronco-cerebral foram coletadas na espessura de 500 μm contendo o NTS na sua porção intermediária e caudal, sempre usando como referência anatômica a área postrema. Em seguida outras duas secções, em porção mais anterior do tronco-cerebral, foram coletadas

contendo o RVLM sendo que a referência anatômica neste caso foi núcleo ambíguo (NA).

3.1.5 Dissecção dos núcleos autonômicos do hipotálamo e bulbo

As fatias coronais coletadas do encéfalo foram depositadas em uma placa de petri contendo fluido cerebroespinal artificial e os núcleos PVN, a região subpostremal do NTS (spNTS), NTS caudal e RVLM do bulbo foram cuidadosamente dissecados com a ajuda visual de um esteromicroscópio (Leica, Alemanha) e um microbisturi (Fine Science Tools, CA, USA). Para coleta do PVN utilizamos como referência neuro-anatômica visual o quiasma óptico e as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (2005) para uma distância antero-posterior entre -1.10 a -2.00 mm em relação ao bregma. No caso do NTS utilizamos como referência neuro-anatômica visual a região dorsal do 4º ventrículo e *calamus scriptorius* com a coleta do tecido abrangendo uma distância antero-posterior entre -13.70 a -14.80 mm em relação ao bregma. O tecido do RVLM foi coletado tendo como referência neuro-anatômica visual o núcleo ambíguo e a distância antero-posterior entre -12.00 a -12.90 mm (ver figura 1). Os tecidos coletados foram mantidos em tubos de centrifugação para subseqüentes procedimentos de extração de proteína.

Figura 1: Cortes coronais do hipotálamo (núcleo paraventricular, PVN), e do tronco-cerebral (núcleo do trato solitário, NTS, e bulbo ventrolateral rostral, RVLM) representando com pontilhados em branco a delimitação anatômica para microdissecção. NA: núcleo ambíguo como referência para coleta dos tecidos do RVLM.

FONTE: Modificado de Paxinos e Watson, 2005.

3.1.6 Extração de proteína total

Os tecidos coletados foram colocados separadamente (PVN, NTS e RVLM), sempre considerando um animal de cada grupo (normotenso e hipertenso), em tubos de centrifugação pré-identificados contendo 50 µL de tampão de extração (extrato total, 100 µL de Tris pH 7.5, 50 µL de EDTA, 100 µL de SDS, 4,2 mg/mL de fluoreto, 4,5 mg/mL de pirofosfato de sódio e 1,89 mg/mL de ortovanadato de sódio) e previamente resfriados a 4 °C. Após serem fervidas a 96 °C por 10 min, as amostras foram sedimentadas por centrifugação a 12000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Parte do sobrenadante foi utilizada para determinação do conteúdo proteico por espectrofotometria com reagente Bradford (Biorad, CA, USA); o restante foi diluído em de tampão Laemmli (1:4 v/v) contendo ditiotreitól 100 mM, incubados por 10 minutos a 96 °C e submetido à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 10% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em aparelho para minigel (Mini Protean III, Bio-Rad, CA, USA).

3.1.7 Immunoblotting

As proteínas presentes nos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, CA, USA) em cuba para transferência elétrica semi-úmida (Bio-Rad, CA, USA). As membranas foram posteriormente bloqueadas com uma solução de leite desnatado em pó a 5% por 12 h a 4 °C. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-subunidades regulatórias p85 α e p85 β da PI3K, diluição 1:1000 [Rabbit monoclonal, Upstate Biotechnology, USA] por 12 horas a 4 °C. A atividade da PI3K foi avaliada por meio da quantificação da via de fosforilação *downstream* a desta proteína, por meio da p-Akt [incubação com anticorpo primário p-Akt1/2/3 (Ser 473)-R, diluição 1:700, Rabbit monoclonal, Santa Cruz, USA] em relação à AKT total [anticorpo primário Akt1/2/3 (H-136), 1:700, (Rabbit monoclonal, Santa Cruz, USA)] ambas incubadas por 12 horas a 4 °C. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit [ECL Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody from donkey (Amersham Pharmacia, UK)] e reagentes de detecção do kit de quimiluminescência (ECL, Amersham

Pharmacia, UK). Posteriormente as membranas foram expostas durante tempos variados em filmes de raios-X, os quais depois de revelados, foram submetidos à análise de densitometria óptica utilizando o software Scion Image (Scioncorp, USA). Os valores obtidos em unidades arbitrárias, das bandas correspondentes à proteína p85, foram normalizados pelos valores obtidos da expressão de α -tubulina [anticorpo primário clone DM1A, 1:2000 (Mouse monoclonal, Upstate Biotechnology, USA)] e, as bandas da p-Akt, foram normalizadas pelos valores de Akt total.

3.1.8 *Análise estatística*

A análise estatística foi gerada utilizando o programa GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software Inc., CA, USA) e os resultados apresentados estão expressos como média $\pm$ epm (erro padrão da média). Aos dados referentes aos parâmetros cardiovasculares e aos resultados obtidos com a técnica de *immunoblotting* aplicamos um teste “*t*” de Student “*one tailed*” para duas amostras pareadas de grupo normotenso (WKY ou Wistar), comparado ao seu respectivo grupo hipertenso (SHR). O nível de significância foi fixado com $p \leq 0,05$.

3.2 **Estudo funcional: interação ANG II e PI3K**

3.2.1 *Animais*

Foram utilizados animais normotensos da linhagem Wistar, pesando entre 300 e 320g. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo e mantidos nas mesmas condições previamente citadas no item 3.1.1.

3.2.2 *Implante de cânulas-guia em direção ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN)*

Utilizando-se um aparelho estereotático (David-Kopf, Tujunga, CA, EUA), cânulas-guia foram implantadas bilateralmente em direção à região do PVN. Estas cânulas de aço inoxidável (15 mm de comprimento) foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas

(20,0 x 0,55 mm). Para os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (100mg/kg, *i.p.*) e xilazina (20 mg/Kg, *i.p.*), tricotomizados na região dorsal da cabeça, colocados no aparelho estereotáxico e, com o auxílio de um protetor auricular, a cabeça foi colocada em posição plana e fixada por meio das barras auriculares do aparelho estereotáxico. A seguir foi injetado, subcutaneamente, um anestésico local com vasoconstrictor (cloridrato de lidocaína a 3% com bitartarato de norepinefrina 1:50.000), na região do escalpo a ser aberta, a fim de se evitar sangramentos após a incisão cirúrgica. Logo após a assepsia da pele com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo-se a região da calota craniana, a qual foi posteriormente tratada com solução fisiológica e água oxigenada para a completa assepsia da área. As cânulas-guia foram fixadas na torre do estereotáxico e colocadas na posição vertical (angulação zero) com a cabeça do animal ajustada até que os pontos das suturas sagitais (bregma) e occipital (lâmbda) da calota craniana ficassem no mesmo nível horizontal e, então, foram feitas as leituras dos parâmetros antero-posterior (AP), lateral (L) e dorsoventral (DV) a partir do bregma. Uma vez determinado o ponto de introdução da cânula-guia, foi feita a trepanação da calota craniana com auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício foram introduzidas as cânulas, cuja localização da extremidade inferior foi feita a partir das coordenadas estereotáxicas do Atlas de Paxinos e Watson (2005) (AP=-1,2 mm em relação ao bregma; L=±0,4 mm em relação ao seio venoso e D= -4,8 mm ventral à superfície do osso). Estas cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica de uso odontológico (Clássico Artigos Odontológicos, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) e ancoradas por dois pequenos parafusos de aço-inoxidável previamente introduzidos na calota craniana. Após a completa fixação das cânulas, a torre do estereotáxico foi removida e para que não houvesse obstrução das cânulas-guia introduziu-se, nas mesmas, mandris (15 mm), também de aço inoxidável que foram mantidos até a realização dos experimentos. O animal foi retirado do aparelho estereotáxico e, como medida profilática pós-cirúrgica, foram injetados 0,1 ml de Pentabiótico Veterinário de amplo-espectro (associação de penicilina e estreptomicina, 1.200.000 UI, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) e analgésico/antiinflamatório Biofen 1% (Biofarm Química e Farmacêutica LTDA, Jaboticabal, SP, Brasil) ambos por via subcutânea. Em seguida os animais foram colocados em caixas individuais, com água e ração "ad-

libitum" e mantidos em salas com temperatura, umidade e luminosidade controladas, por um período de 5 a 7 dias para recuperação.

3.2.3 Injeções de fármacos no PVN

Os fármacos utilizados nesse estudo foram dissolvidos em solução fisiológica (NaCl 154 mM) estéril e injetadas no PVN dos animais em livre movimentação utilizando-se de uma seringa Hamilton de 1 µL (Hamilton, Reno, NV) conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a uma microinjetora (33 gauge) 3,5 mm mais longa que a cânula-guia, a fim de que as injeções atingissem diretamente o PVN. O volume injetado foi sempre de 100 nL com a duração de aproximadamente 5 segundos. O pH das soluções foi ajustado com bicarbonato de sódio (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para valores próximos a 7,4. Os fármacos usados foram ANG II (10 µM; Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA), o inibidor da PI3K, LY294002 (50 µM; Cell Signaling Tecn.[®], Danvers, MA, EUA) e DMSO (na diluição 1:100 em solução salina) utilizado para diluir o LY294002 (controle-veículo).

3.2.4 Cateterização da artéria femoral e registro de variáveis cardiovasculares

Um dia antes do protocolo experimental com injeções no PVN e registros cardiovasculares (PAP, PAM e FC) foi realizada a cateterização da artéria femoral. Os cateteres utilizados foram confeccionados com um tubo de polietileno (PE-10) (Clay Adams, Parsipanny, NJ, USA) de cerca de 6 cm de comprimento, soldado a outro tubo tipo tygon (Saint Goubain, Akron, OH, USA) com 15 cm de comprimento. Antes de serem implantados, os cateteres foram preenchidos com solução fisiológica (NaCl, 154 mM) estéril e obstruídos com pinos de metal na extremidade livre do tygon. Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (100 mg/Kg, *i.p.*) e xilazina (20 mg/Kg, *i.p.*). Uma pequena incisão foi feita na região inguinal com afastamento do tecido conjuntivo e cauteloso isolamento da artéria femoral, pela qual um cateter foi introduzido em direção à aorta abdominal. Uma vez implantados, os cateteres foram exteriorizados na região escapular dorsal dos animais e fixados com linha de sutura. Após 24 horas foram registradas a PAP, PAM e FC com o animal acordado e em livre movimentação.

Os registros cardiovasculares foram feitos no dia seguinte ao da cateterização, conectando-se o cateter arterial, previamente heparinizado, a um transdutor de pressão (Modelo CDX III, Cobe Labs., Lakewood, CO, USA), o qual foi acoplado a um amplificador (ML224 Quad Bridge Amp, ADInstruments, New South Wales, Austrália) e este a um sistema de aquisição de dados digital (PowerLab, ADInstruments, New South Wales, Austrália). A frequência de amostragem para aquisição dos parâmetros hemodinâmicos foi de 1000 Hertz. Os valores de PAP, PAM e FC foram analisados *off-line*.

3.2.5 *Histologia*

Ao final dos experimentos foram feitas injeções bilaterais no PVN (volume 100 nL) do corante azul de Evans 2% (Vetec, Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para determinar os sítios específicos das injeções. A seguir, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (10%, *i.v.*) e submetidos à abertura da região torácica para a exposição do coração e perfusão com solução tampão fosfato de sódio a 0,01M, seguida de perfusão com solução de paraformaldeído 4% via ventrículo cardíaco esquerdo. A seguir o encéfalo foi removido e mantido em uma solução de sacarose (0,2 g/mL) em paraformaldeído 4% por 48 horas. Logo após o hipotálamo foi separado do tronco-cerebral, resfriado rapidamente em nitrogênio líquido e foi seccionado transversalmente, por meio de um micrótomo de congelamento, em fatias de 40 µm de espessura. Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de campo escuro para identificação dos sítios de injeção. Apenas os animais que apresentarem marcação no PVN foram considerados na análise dos resultados.

3.2.6 *Protocolo Experimental*

No dia do experimento, após a ambientação do animal às condições da sala de registro, a cânula da artéria femoral foi conectada ao transdutor de pressão e este ao sistema de registro para monitoramento simultâneo da PAP, a PAM e a FC até a completa estabilização dos registros. Em seguida foi feita uma primeira injeção de 100 nL ANG II (10 µM) unilateralmente no PVN. Uma segunda injeção de 100 nL de ANG II (10 µM) foi realizada no mesmo local 30 min mais tarde a fim de verificar a reprodutibilidade do efeito. Sendo a

resposta reproduzida 30 min após a segunda injeção de ANG II, foi feita a injeção de 100 nL do inibidor reversível da PI3K, LY294002 (50 μ M). A ANG II foi microinjetada novamente no PVN aos 5 e 30 min após a inibição da PI3K com LY ou injeção de veículo e as alterações na PA e FC foram monitoradas de acordo com o desenho experimental da figura 2. Em um segundo grupo de animais foi realizado um protocolo como controle de veículo no mesmo molde do anterior, sendo que ao invés do LY294002 foi injetado o DMSO (1:1000 em solução salina) frente aos efeitos cardiovasculares promovidos pela ANG II.

Figura 2: Desenho experimental do protocolo da injeção de ANG II antes e após a inibição da PI3K com LY294002 ou correspondente veículo (DMSO 1:1000 em solução salina) no PVN de ratos não anestesiados.

3.2.7 Análise Estatística

A análise estatística foi gerada utilizando o programa GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Para análise dos efeitos na PA e FC decorrente da injeção de ANG II antes e após o LY294002, no PVN levou-se em consideração a variação máxima das respostas sobre estes parâmetros cardiovasculares. Os resultados apresentados estão expressos como média $\pm$ epm (erro padrão da média). Foi aplicada uma análise de variância de uma via “One-Way” para medidas repetidas (ANOVA). Havendo significância estatística, foi utilizado o pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. O nível de significância foi fixado com $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise do conteúdo proteico

4.1.1 Determinação dos níveis de PA e FC nos grupos de animais normotensos e hipertensos

Antes da coleta de tecidos para extração de proteínas, os registros das variáveis cardiovasculares (PA e FC) foram monitorados sempre em dois animais de cada grupo, **GRUPO 1:** WKY e SHR ou **GRUPO 2:** Wistar e SHR. Na tabela 1 podemos verificar no GRUPO 1 que a PAM dos animais SHR apresentou-se maior (173 ± 10 mmHg) quando comparadas ao seu controle WKY (122 ± 4 mmHg). No GRUPO 2 também foi observado um valor basal de PAM maior nos animais SHR (174 ± 13 mmHg) quando comparados aos seus respectivos controles Wistar (114 ± 5 mmHg). É importante mencionar que o valor basal da PAM nos animais normotensos da linhagem WKY apresentou-se levemente maior que da linhagem Wistar, mas não diferiram estatisticamente. Em relação à FC não houve diferenças significativas entre os grupos avaliados.

Tabela 1 - Valores basais da pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de dois diferentes grupos experimentais estudados: GRUPO 1: WKY (Wistar-Kyoto) e SHR (animais espontaneamente hipertensos) e GRUPO 2: Wistar e SHR, n=10 animais por grupo (5 normotensos e 5 hipertensos)

		PAM (mmHg)	FC (bpm)
GRUPO 1	WKY	122 ± 4	304 ± 20
	SHR	$173 \pm 10^*$	348 ± 16
GRUPO 2	Wistar	114 ± 5	270 ± 39
	SHR	$174 \pm 13^*$	332 ± 18

*diferente em relação ao SHR do respectivo grupo, $p \leq 0,05$

4.1.2 Análise do conteúdo proteico da p85 e p-Akt no núcleo do trato solitário (NTS) de animais normotensos e hipertensos

Os resultados apresentados nos gráficos da figura 3 demonstram que não houve diferenças significativas no conteúdo da subunidade p85 da PI3K no NTS dos dois grupos estudados – **GRUPO 1:** WKY ($0,84 \pm 0,23$ UA) vs SHR ($0,84 \pm 0,17$ UA) e **GRUPO 2:** Wistar ($0,71 \pm 0,15$ UA) vs SHR ($0,57 \pm 0,09$ UA) (Fig. 3A). Além disso, também não houve diferença no conteúdo da p-AKT (Fig. 3B) neste mesmo núcleo – **GRUPO 1:** WKY ($0,83 \pm 0,15$ UA) vs SHR ($0,85 \pm 0,09$ UA) e **GRUPO 2:** Wistar ($0,79 \pm 0,12$ UA) vs SHR ($0,78 \pm 0,09$ UA).

Figura 3: Conteúdo proteico da subunidade p85 da PI3K e da Akt fosforilada (p-Akt) no NTS. O painel **A** representa o conteúdo da subunidade p85 normalizada pela alfa-tubulina e o painel **B** o conteúdo da p-Akt normalizada pela Akt total no núcleo do trato solitário (NTS) de animais do GRUPO 1 (WKY vs SHR) e do GRUPO 2 (Wistar vs SHR). n=10 animais por grupo (5 normotensos e 5 hipertensos).

4.1.2 Análise do conteúdo proteico da p85 e p-AKT no bulbo ventrolateral rostral (RVLM) de animais normotensos e hipertensos

Os dados apresentados na figura 4 demonstram que não houve diferenças significativas no conteúdo da subunidade p85 da PI3K (painel A) no RVLM dos animais do **GRUPO 1:** WKY ($0,74 \pm 0,05$ UA) vs SHR ($0,61 \pm 0,03$ UA) e **GRUPO 2:** Wistar ($0,69 \pm 0,12$ UA) vs SHR ($0,78 \pm 0,07$ UA) e também não houve alteração da Akt fosforilada nos **GRUPOS 1:** WKY

($0,62 \pm 0,19$ UA) vs SHR ($0,57 \pm 0,16$ UA) e 2: Wistar ($0,51 \pm 0,09$ UA) vs SHR ($0,42 \pm 0,06$) neste mesmo núcleo (painel B).

Figura 4: Conteúdo proteico da subunidade p85 da PI3K e da Akt fosforilada (p-Akt) no RVLM. O painel **A** representa o conteúdo da subunidade p85 normalizada pela α -tubulina e o painel **B** o conteúdo da p-AKT normalizada pela AKT total no núcleo ventrolateral rostral (RVLM) de animais do GRUPO 1 (WKY vs SHR) e do GRUPO 2 (Wistar vs SHR). n=10 animais por grupo (5 normotensos e 5 hipertensos).

4.1.3 Análise do conteúdo proteico da subunidade p85 e p-Akt no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de animais normotensos e hipertensos

A figura 5A representa os valores, em medidas arbitrárias, do conteúdo da subunidade regulatória p85 da PI3K no PVN e evidencia que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais estudados: **GRUPO 1:** WKY ($1,11 \pm 0,09$ UA) vs SHR ($1,00 \pm 0,16$ UA) e **GRUPO 2:** Wistar ($0,93 \pm 0,17$ UA) vs SHR ($0,90 \pm 0,10$ UA). No entanto, a avaliação da AKT fosforilada (p-AKT) demonstra que o conteúdo desta proteína encontrou-se significativamente maior no PVN de animais do **GRUPO2**, ou seja, SHR ($0,96 \pm 0,09$ UA) em relação ao seu controle normotenso Wistar ($0,61 \pm 0,11$ UA), porém não foram observadas diferenças significativas no conteúdo da p-AKT neste mesmo núcleo em animais do **GRUPO 1** (WKY: $0,80 \pm 0,10$ vs SHR: $0,85 \pm 0,17$ UA; fig. 5B).

Figura 5: Conteúdo proteico da subunidade p85 da PI3K e da Akt fosforilada (p-Akt) no PVN. O painel **A** representa o conteúdo da subunidade p85 normalizada pela α -tubulina e o painel **B** o conteúdo da p-Akt normalizada pela Akt total no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de animais do GRUPO 1 (WKY vs SHR) e do GRUPO 2 (Wistar vs SHR). $n=10$ animais por grupo (5 normotensos e 5 hipertensos).

4.2 Estudo funcional: interação entre ANG II e PI3K

A figura 6 ilustra os traçados de um animal, representativo do grupo, com alterações na pressão arterial pulsátil, pressão arterial média e frequência cardíaca, promovidas pela injeção de ANG II no PVN antes (controle) e após a inibição da PI3K com LY294002.

Figura 6: Traçado de um animal não anestesiado, representativo do grupo, ilustrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PA mmHg), na pressão arterial média (PAM mmHg) e na frequência cardíaca (FC bpm) decorrente da injeção de ANG II antes (controle) e aos 5 e 30 min após a inibição da PI3K com LY294002 no PVN.

Como podemos observar na figura 7A, a injeção unilateral de ANG II (10 μ M; 100 nL) no PVN promoveu aumento na PAM (13 $\pm$ 1 mmHg), a qual foi atenuada aos 5 (4 $\pm$ 1 mmHg) e revertida aos 30 min (11 $\pm$ 1 mmHg) após a administração de LY294002 (50 μ M; 100 nL) no mesmo sítio do PVN. A injeção unilateral de veículo, por outro lado, não alterou o aumento da PA induzido pela injeção de ANG II (10 μ M; 100 nL) no PVN (PAM basal = 12 $\pm$ 1 mmHg, a PAM 5 min após veículo = 12 $\pm$ 2 mmHg e a PAM 30 min após veículo = 11 $\pm$ 1 mmHg).

A figura 7B demonstra que a injeção unilateral de ANG II (10 μ M; 100 nL) no PVN promoveu bradicardia (-34 $\pm$ 4 bpm), que foi significativamente atenuada aos 5 min (-9 $\pm$ 5 bpm) após a administração de LY294002 no mesmo sítio do PVN e restaurada 30 min (-26 $\pm$ 3 bpm) mais tarde. No entanto, a injeção de veículo no grupo controle gerou o mesmo padrão de resposta, ou seja, houve uma bradicardia induzida pela injeção unilateral de ANG II (10 μ M; 100 nL) no PVN (-27 $\pm$ 6 bpm), a qual também esteve atenuada aos 5 min (-13 $\pm$ 4 bpm), com restaurada 30 min mais tarde (-23 $\pm$ 7 bpm).

Figura 7: Variações na pressão arterial média (Δ PAM mmHg, painel **A**) e na frequência cardíaca (painel **B**) em resposta a injeção de ANG II (10 μ M; 100 nL, n=6) no PVN, antes (All controle) e aos 5 e 30 minutos após a inibição da PI3K com LY294002 (50 μ M; 100 nL) ou injeção de veículo (solução DMSO 1:1000 em salina - 100 nL). * diferente em relação à resposta da ANG II controle e 30 min; + diferente em relação à resposta da ANG II controle, n=5; $p < 0,05$.

A Figura 8 é uma fotomicrografia de um corte histológico coronal do encéfalo de um animal representativo do grupo mostrando os sítios bilaterais das injeções no PVN. Foram considerados na análise dos resultados somente os animais que tiveram as injeções localizadas no PVN. Analisamos também os animais que não responderam à ANG II e verificamos que as injeções estavam fora do PVN e neste grupo de animais a microinjeção de ANG II não promoveu qualquer efeito sobre a PA e FC. Deste modo, podemos garantir que

os resultados observados nas variáveis cardiovasculares foram essencialmente por ação dos fármacos diretamente no PVN.

Figura 8: Fotomicrografia de uma secção coronal do hipotálamo mostrando a trajetória das microinjetoras e o centro das injeções no PVN (cabeças de setas). 3V: terceiro ventrículo

5 DISCUSSÃO

O conjunto dos resultados demonstrou que a forma ativa da via de sinalização da PI3K (Akt fosforilada) encontrou-se mais abundante no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos espontaneamente hipertensos quando comparados ao seu controle normotenso Wistar. Além disso, o efeito pressor decorrente da injeção de ANG II no PVN de animais normotensos não anestesiados foi atenuado pela inibição da PI3K, evidenciando desta forma uma interação entre a angiotensina e a via da PI3K sobre o controle da PA neste núcleo autonômico.

Os registros hemodinâmicos de PAM e FC evidenciaram que a PAM basal do grupo de animais (WKY) apresentou-se relativamente elevada para uma linhagem normotensa e considerada controle para os animais SHR. Deste modo, resolvemos considerar também outra linhagem de animais normotensos, neste caso ratos Wistar, para efeitos comparativos com o grupo de animais hipertensos. Além disso, como esperado, os animais SHR apresentaram níveis pressóricos significativamente maiores do que as duas linhagens de animais normotensos (Tabela 1).

Alguns estudos demonstram que uma das causas da hipertensão em SHR está relacionada à elevada frequência de disparos de neurônios em núcleos autonômicos pré-simpáticos, além de um aumento da transcrição de fatores ligados à neuromodulação noradrenérgica relacionados com a sinalização da ANG II nestes núcleos (VEERASINGHAM et al., 2005). Sabe-se que esses animais possuem uma hiperatividade do sistema renina-angiotensina sistêmico e central, evidenciado pela elevada expressão de receptores AT₁ de ANG II em núcleos autonômicos e as vias de sinalização PI3K-Akt tem sido relacionado à atividade neuromodulatória noradrenérgica induzida pela ANG II (YANG e RAIZADA, 1999).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a forma ativa da via de sinalização da PI3K (Akt fosforilada) apresentou-se mais abundante somente no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de ratos hipertensos quando comparados ao seu controle normotenso. Podemos notar ainda que os resultados da análise do conteúdo proteico da subunidade regulatória p85 da PI3K nos núcleos autonômicos PVN, NTS e RVLM não demonstraram diferenças significativas na quantidade desta proteína entre os grupos experimentais nem entre os núcleos estudados. Estes resultados diferem de estudos prévios obtidos *in vitro* utilizando cultura primária de neurônios, nos quais se demonstrou que a

subunidade regulatória p85 se encontrava mais abundante em neurônios do hipotálamo e tronco encefálico de animais hipertensos (YANG e RAIZADA, 1999; SUN et al., 2003; VEERASINGHAM et al., 2005). Esta diferença observada pode estar correlacionada à abordagem experimental, pois estudos *in vitro*, nem sempre reproduzem as condições fisiológicas encontradas *in vivo*, em que ocorrem interações neuronais muito mais complexas que em um conjunto isolado de células. De fato, Sumners, Fleegal e Zhu (2002) ressaltam a importância da realização de experimentos *in vivo* para confirmar a importância dessas vias observadas nos experimentos *in vitro*.

A PI3K, uma vez ativada, gera fosfatidilinositol (PtdIns) (3,4,5)P₃ levando ao recrutamento e ativação da Akt através da PDK1 e proteínas G monoméricas (OUDIT et al., 2004). A Akt fosforilada (p-Akt) é um indicativo da atividade da via da PI3K, pois esta é ao que parece, o único ativador *upstream* da Akt (MANNING e CANTLEY, 2004; OUDIT et al., 2004). Nossos resultados demonstram um conteúdo significativamente maior da p-Akt apenas no PVN de SHR quanto comparados aos seus controles normotensos, o que sugere maior atividade dessa via neste núcleo autonômico de animais hipertensos.

O conteúdo maior de p-Akt apenas no PVN de SHR corrobora o fato de que este núcleo possui alta densidade de receptores AT₁ e, além disso, está localizado próximo aos órgãos circunventriculares (CVOs), tais como o órgão subfornicial (SFO), o órgão vascular da lâmina terminalis (OVLT), a eminência mediana (ME) (MCKINLEY et al., 2003), núcleos estes desprovidos de barreira hematoencefálica e que detectam a angiotensina circulante enviando projeções diretamente para o PVN. O PVN, por sua vez, possui um conjunto de neurônios denominados de parvocelulares que fazem sinapse com neurônios simpatoexcitatórios pré-motores localizados no RVLM e/ou neurônios simpáticos pré-ganglionares da coluna intermediolateral (CIML) da medula espinhal (SAWCHENKO e SWANSON, 1982; SHAFTON; RYAN; BADOER, 1998; PYNER e COOTE, 1999; 2000) e diversas outras áreas do SNC. A ativação deste núcleo, por meio da hiperatividade do sistema angiotensinérgico central poderia modular a atividade autonômica simpática e contribuir para o desenvolvimento e/ou manutenção da hipertensão observada nos animais SHR.

Curiosamente, apesar de a p-Akt estar mais abundante no PVN de SHR, não foi observado diferença significativa no conteúdo proteico da subunidade regulatória p85 neste mesmo núcleo. Entretanto, o papel da p85 na regulação da sinalização intracelular da PI3K é

mais complexo do que simplesmente direcionar o transporte da subunidade catalítica na célula. Apesar de ser necessária para translocação e ativação da sua subunidade p110 catalítica, a p85 também regula negativamente essa subunidade, pois uma vez ligada a ela, inibe sua atividade catalítica (FRUMAN et al., 1998; CANTRELL, 2001). Quando a subunidade p85 se desassocia da p110, esta é ativada e produz diretamente PIP3 a partir de PtdIns(4,5)P₂ e, indiretamente, PtdIns(3,4)P₂ via ação de 5' inositol fosfatases, como a SHIP. Estes fosfoinositídeos (PIP3 e PtdIns(3,4)P₂) levarão por fim à fosforilação e ativação da Akt via PDK-1 (TOKER e CANTLEY, 1997; LEEVERS et al., 1999; VANHAESEBROECK e WATERFIELD, 1999; ANDERSON e JACKSON, 2003; KATSO et al., 2001; OUDIT et al., 2004).

Além disso, uma possível explicação para o fato de não ter sido observada diferença significativa no conteúdo proteico da p85 no PVN de animais SHR, como observado para a p-Akt (proteína *downstream* a PI3K) neste mesmo núcleo, seria de que a Akt poderia ser fosforilada pela ação da PI3K classe I_B, a qual está muito relacionada a receptores acoplados à proteína G, como é o caso dos receptores AT₁ da ANG II (KATSO et al., 2001).

A subunidade catalítica das enzimas da classe I_B é p110γ, a qual é similar em estrutura e função às proteínas p110 da classe I_A, porém não possui um domínio ligante para a p85. O estímulo ativador da p110γ é provido pela interação de agonistas com receptores acoplados à GPCR, que é o caso da ANG II. Após ativação da proteína Gq, a subunidade G_{βγ} livre se liga e ativa a p110γ por um mecanismo que é estimulado por outra proteína regulatória, a p101, a qual não está relacionada à p85. A subunidade p101, portanto, desempenha um papel de recrutamento necessário a ativação da p110γ (KATSO et al., 2001). Neste sentido, seria interessante avaliar em animais hipertensos e normotensos a expressão da subunidade p101, principalmente em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo.

Outra possível explicação para os resultados obtidos sobre o aumento do conteúdo proteico da p-Akt no PVN de SHR em relação ao seu controle normotenso Wistar, não acompanhado pelo aumento na expressão da subunidade p85, está no fato de que os animais SHR possuem outras alterações fisiológicas, dentre as quais podemos destacar a hiperinsulinemia (MONDON e REAVEN, 1988) e a resistência à insulina (HULMAN; FALKNER; CHEN, 1991). A ativação das PI3Ks, principalmente da classe I_A, está muito relacionada às vias de sinalização da insulina, portanto poderia haver um *cross-talk* das vias de sinalização

de insulina e ANG II, como já descrito em trabalhos anteriores relacionando diabetes mellitus e hipertensão arterial (SAAD; VELLOSO; CARVALHO, 1995; VELLOSO et al., 1996; NICKENIG e BÖHM, 1998; VELLOSO et al., 2006).

Os resultados do estudo funcional demonstraram que o aumento pressórico induzido pela injeção de ANG II no PVN foi atenuado pela inibição da PI3K, com seu inibidor reversível LY294002, logo aos 5 minutos após o bloqueio, com recuperação da resposta 30 minutos mais tarde. Podemos concluir que este efeito de atenuação na resposta pressora induzida pela ANG II no PVN e a diminuição da bradicardia reflexa aos 5 min após a injeção de LY294002, foram essencialmente decorrentes do bloqueio da PI3K, uma vez que no grupo experimental controle (veículo) a resposta pressora a ANG II não foi afetada pela microinjeção de veículo no PVN no mesmo decurso temporal. É importante salientar, que a microinjeção de LY294002 *per se* no PVN não alterou nem a PA e nem mesmo a FC basais.

Estes resultados sugerem haver uma relação direta entre o efeito de aumento na PA induzido pela ação da ANG II e ativação da PI3K no PVN de animais normotensos. De fato Veerasingham et al. (2005) também observaram aumentos na expressão do mRNA da subunidade p85 α e da subunidade catalítica p110 δ no PVN de SHR, sendo essa expressão reduzida quando estes animais eram tratados com captopril (inibidor da enzima conversora de ANG II). Ainda em estudos recentes de Zubcevic et al. (2009) foi observado elevados níveis de mRNA da subunidade catalítica da PI3K p110 δ em neurônios do PVN de animais SHR, além da atividade aumentada da PI3K. Além disso, sabe-se que o aumento da neuromodulação noradrenérgica pela ANG II envolve ativação intracelular das vias de sinalização através da MAPK e PI3K levando a um aumento na transcrição do mRNA de tirosina hidroxilase (TH), dopamina β -hidroxilase (D β H) e do transportador de Nor (NaT) (YANG et al., 1996; GELBAND et al., 1998), e que a ação central ANG II no controle da PA se deve à sua interação com o subtipo de receptor AT₁ em áreas encefálicas de relevância no controle autonômico e cardiovascular, tais como, o PVN no hipotálamo (ALLEN et al., 1998; YANG e RAIZADA, 1999; McKINLEY et al., 2003). Portanto, nossos resultados funcionais sobre os efeitos da ANG II no PVN sobre a PA e sua interação com a via da PI3K poderia estar envolvida com esta neuromodulação noradrenérgica, possivelmente por modular a atividade autonômica simpática. Neste sentido experimentos futuros seriam interessantes para certificar esta hipótese.

O conjunto de dados obtidos neste projeto abre novas perspectivas para verificar o real papel da ANG II e sua interação com a via da PI3K no PVN de animais hipertensos e sua influência sobre os níveis de pressão arterial. Dentre elas, seria interessante explorar o efeito do bloqueio da PI3K no PVN de animais SHR, os quais também possuem um SRA mais ativo, e verificar se a elevada PA desses animais é normalizada ou diminuída frente a este antagonismo. Além disso, outra abordagem seria tratar os animais SHR com antagonistas dos receptores AT_1 e, após normalização da PA, avaliar o conteúdo protéico da p-Akt no PVN e verificar se a inibição dos efeitos da ANG II via receptores AT_1 , interfere ou não com a ativação da PI3K frente à normalização da pressão arterial destes animais.

Em conclusão, os resultados obtidos no presente trabalho nos levam a sugerir que a via da PI3K-Akt apresenta-se mais ativa nas células neuronais do núcleo paraventricular do hipotálamo de animais hipertensos, e há uma interação entre as vias da ANG II-PI3K que pode estar diretamente relacionada com a hipertensão neurogênica neste núcleo autonômico, o qual parece ser um dos principais sítios envolvidos no desenvolvimento ou manutenção da hiperativação autonômica simpática e, conseqüentemente, dos altos níveis de pressão arterial observados nesta patologia.

REFERÊNCIAS*

ALEXANDER, R. S. Tonic and reflex functions of medullary sympathetic cardiovascular centers. **Journal of Neurophysiology**, v. 9, p. 205-217, 1946.

ALLEN, A. M.; MOELLER, I.; JENKINS, T. A.; ZHUO, J.; ALDRED, G. P.; CHAI, S. Y.; MENDELSON, F. A. O. Angiotensin receptors in the nervous system. **Brain Research Bulletin**, v. 47, p. 17-28, 1998.

ALLEN, A. M. Blockade of angiotensin II receptors in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats reduces blood pressure and sympathetic nerve discharge. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 2, p. 120-124, 2001.

ANDERSON, K. E.; JACKSON, S. P. Class I phosphoinositide 3-kinases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 1028-1033, 2003.

ANTUNES, V. R.; CAMARGO, G. M. P. A.; SAAD, R.; SAAD, W. A.; LUIZ, A. C.; CAMARGO, J. A. A. Role of angiotensin II and vasopressin receptors within the supraoptic nucleus in water and sodium intake induced by injection of angiotensin II into the medial septal area. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1597-1600, 1998.

ANTUNES, V. R.; YAO, S. T.; PICKERING, A. E.; MURPHY, D.; PATON, J. F. A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation. **The Journal of Physiology**, v. 576, p. 569-583, 2006.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, p. 1655-1657, 2002.

CANTRELL, D. A. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 1439-1445, 2001.

CORVERA, S.; CZECH, M. P. Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 442-446, 1998.

DAMPNEY, R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 323-363, 1994.

DURONIO, V.; SHEID, M. P.; ETTINGER, S. Downstream signalling events regulated by phosphatidylinositol 3-kinase activity. **Cellular Signaling**, v. 10, p. 233-239, 1998.

FOSTER, F. M.; TRAER, C. J.; ABRAHAM, S. M.; FRY, M. J. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 3037-3040, 2003.

FRUMAN, D. A.; MEYERS, R. E.; CANTLEY, L. C. Phosphoinositide kinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 481-507, 1998.

GANTEN, D.; HERMANN, K.; BAYER, C.; UNGER, T.; LANG, R. E. Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in hypertensive rats. **Science**, v. 221, p. 869-871, 1983.

GELBAND, C. H.; SUMNER, C.; LU, D.; RAIZADA, M. K. Angiotensin receptors and norepinephrine neuromodulation: implications of functional coupling. **Regulatory Peptides**, v. 73, p. 141-147, 1998.

HULMAN, S.; FALKNER, B.; CHEN, Y. Q. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rat. **Metabolism**, v.40, p. 359-361, 1991.

ITO, S.; KOMATSU, K.; TSUKAMOTO, K.; KANMATSUSE, K.; SVED, A. F. Ventrolateral medulla AT₁ receptors support blood pressure in hypertensive rats. **Hypertension**, v. 40, p. 552-559, 2002.

KATSO, R.; OKKENHAUG, K.; AHMADI, K.; WHITE, S.; TIMMS, J.; WATERFIELD, M. D. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: Implications for development, immunity, homeostasis, and cancer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 615-675, 2001.

KUROSU, H.; MAEHAMA, T.; OKADA, T.; YAMAMOTO, T.; HOSHINO, S.; FUKUI, Y.; UI, M.; HAZEKI, O.; KATADA, T. Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110 β is synergistically activated by the $\beta\gamma$ subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 24252-24256, 1997.

LEEVERS, S.; VANHAESEBROECK, B.; WATERFIELD, M. D. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. **Current Opinion on Cell Biology**, v. 11, p. 219-225, 1999.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. Akt/PKB signalling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, p. 1261-1274, 2004.

MATSUMURA, K.; AVERILL, D. B.; FERRARIO, C. M. Angiotensin II acts at AT₁ receptors in the nucleus of the solitary tract to attenuate the baroreceptor reflex. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 275, p. 1611-1619, 1998.

McKINLEY, M. J.; ALBISTON, A. L.; ALLEN, A. M.; MATHAI, M. L.; MAY, C. N.; McALLEN, R. M.; OLDFIELD, B. J.; MENDELSON, F. A. O.; CHAI, S. Y. The brain rennin-angiotensin system: location and physiological roles. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, p. 901-918, 2003.

MONDON, C. E.; REAVEN, G. M. Evidence for abnormalities of insulin metabolism in rats with spontaneous hypertension. **Metabolism**, v.37, p. 303-305, 1988.

NICKENIG, G.; BÖHM, M. Interaction between insulin and AT₁ receptor. Relevance for hypertension and arteriosclerosis. **Basic Research in Cardiology**, v. 93, p. 135-139, 1998.

ODUIT, G. Y.; KERFANT, B. G.; CRACKOWER, M. A.; PENNINGER, J. M.; BACKX, P. H. The role of phosphoinositide 3-kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 37, p. 449-471, 2004.

PATON, J. F.; DEUCHARS, J.; AHMAD, Z.; WONG, L. F.; MURPHY, D.; KASPAROV, S. Adenoviral vector demonstrates that angiotensin II-induced depression of the cardiac baroreflex is mediated by endothelial nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarius of the rat. **The Journal of Physiology**, v. 531, p. 445-458, 2001.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The brain in stereotaxic coordinates**. San Diego, CA: Academic Press, 2005.

PHILLIPS, M. I.; KIMURA, B. Brain angiotensin in the developing spontaneously hypertensive rat. **Journal of Hypertension**, v. 6, p. 607-612, 1988.

PYNER, S.; COOTE, J. H. Identification of an efferent projection from the paraventricular nucleus of the hypothalamus terminating close to spinally projecting rostral ventrolateral medullary neurons. **Neuroscience**, v. 88, p. 949-957, 1999.

PYNER, S.; COOTE, J. H. Identification of branching paraventricular neurons of the hypothalamus that project to the rostroventrolateral medulla and spinal cord. **Neuroscience**, v. 100, p. 549-556, 2000.

RICHARDS, E. M.; RAIZADA, M. K.; GELBAND, C. H.; SUMNERS, C. Angiotensin II type 1 receptor-modulated signaling pathways in neurons. **Molecular Neurobiology**, v. 19, p. 25-41, 1999.

SAAD, M. J. A.; VELLOSO, L. A.; CARVALHO, C. R. O. Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. **Biochemical Journal**, v. 310, p. 741-744, 1995.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 205, p. 260-272, 1982.

SEYEDABADI, M.; GOODCHILD, A. K.; PILOWSKY, P. M. Differential role of kinases in brain stem of hypertensive and normotensive rats. **Hypertension**, v. 38, p. 1087-1092, 2001.

SHAFTON, A. D.; RYAN, A.; BADOER, E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Brain Research**, v. 801, p. 239-243, 1998.

SHIN, B. C.; SUZUKI, M.; INUKAI, K.; ANAI, M.; ASANO, T.; TAKATA, K. Multiple isoforms of the regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-Kinase) are expressed in neurons in the rat brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, p. 313-319, 1998.

SPYER, K. M. The central nervous organization of reflex circulatory control. In: LOWEY, A. D.; SPYER, K. M. **Central Regulation of Autonomic Functions**. New York: Oxford Press, 1990. p. 168-188.

SUMNERS, C.; GELBAND, C. H. Neuronal ion channel signalling pathways: modulation by angiotensin II. **Cellular Signalling**, v. 10, p. 303-311, 1998.

SUMNERS, C.; FLEEGAL, M. A.; ZHU, M. Angiotensin AT₁ receptor signalling pathways in neurons. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, p. 483-490, 2002.

SUN, C.; DU, J.; SUMNERS, C.; RAIZADA, M. K. PI3-kinase inhibitors abolish the enhanced chronotropic effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rat brain neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 90, p. 3155-3160, 2003.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. **Neuroendocrinology**, v. 31, p. 410-417, 1980.

TOKER, A.; CANTLEY, L. C. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. **Nature**, v. 387, p. 673-676, 1997.

VANHAESEBROECK, B.; WATERFIELD, M. D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. **Experimental Cell Research**, v. 253, p. 239-254, 1999.

VEERASINGHAM, S. J.; YAMAZATO, M.; BERECEK, K. H.; WYSS, J. M.; RAIZADA, M. K. Increased PI3-kinase in presympathetic brain areas of the spontaneous hypertensive rat. **Circulation Research**, v. 96, p. 277-279, 2005.

VELLOSO, L. A.; FOLLI, F.; SUN, X. J.; WHITE, M. F.; SAAD, M. J. A; KAHN, C. R. Cross-talk between the insulin and angiotensin signalling systems. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 93, p. 12490-12495, 1996.

VELLOSO, L. A.; FOLLI, F.; PEREGO, L.; SAAD, M. J. A. The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 22, p. 98-107, 2006.

YANG, H.; LU, D.; YU, K.; RAIZADA, M. K. Regulation of neuromodulatory actions of angiotensin II in the brain neurons by the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase pathway. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 4047-4058, 1996.

YANG, H.; RAIZADA, M. K. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in angiotensin II regulation of norepinephrine neuromodulation in brain neurons of the spontaneously hypertensive rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 2413-2423, 1999.

WEYHENMEYER, J. A.; PHILLIPS, M. I. Angiotensin-like immunoreactivity in the brain of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 4, p. 514-523, 1982.

ZHU, G. Q.; PATEL, K. P.; ZUCKER, I. H.; WANG, W. Microinjection of ANG II into paraventricular nucleus enhances cardiac sympathetic afferent reflex in rats. **American Journal of Physiology**, v. 282, p. H2039-H2045, 2002.

ZUBCEVIC, J.; WAKI, H.; DIEZ-FREIRE, C.; GAMPEL, A.; RAIZADA, M. K. e PATON, J. F. R. Chronic blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in the nucleus tractus solitarii is prohypertensive in spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 53, p. 97-103, 2009.