

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**ESTUDO DA ISOFORMA NEURONAL DA SINTASE DE ÓXIDO
NÍTRICO PRESENTE NO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO
PERIFÉRICO EM RATAS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSAS (SHR) ANTES E APÓS DESENVOLVEREM
HIPERTENSÃO ARTERIAL**

Andréia Fernanda Carvalho Leone Aguiar

Ribeirão Preto

2008

Andréia Fernanda Carvalho Leone Aguiar

ESTUDO DA ISOFORMA NEURONAL DA SINTASE DE ÓXIDO
NÍTRICO PRESENTE NO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO
PERIFÉRICO EM RATAS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSAS (SHR) ANTES E APÓS DESENVOLVEREM
HIPERTENSÃO ARTERIAL

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração Clínica Médica.

Orientador: Prof. Eduardo Barbosa Coelho

Ribeirão Preto

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Aguiar, Andréia Fernanda Carvalho Leone

Estudo da isoforma neuronal da sintase de óxido nítrico presente no sistema nervoso simpático periférico em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) antes e após desenvolverem hipertensão arterial. Ribeirão Preto, 2008.

106 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Coelho, Eduardo Barbosa.

1. Óxido Nítrico neuronal. 2. Reatividade vascular. 3. Hipertensão Arterial. 4. Sistema Nervoso Autônomo

*Ainda que eu falasse a língua dos homens.
E falasse a língua dos anjos, sem amor eu nada seria.*

*É só o amor, é só o amor.
Que conhece o que é verdade.
O amor é bom, não quer o mal.
Não sente inveja ou se envaidece.*

*O amor é o fogo que arde sem se ver.
É ferida que dói e não se sente.
É um contentamento descontente.
É dor que desatina sem doer.*

*Ainda que eu falasse a língua dos homens.
E falasse a língua dos anjos, sem amor eu nada seria.*

*É um não querer mais que bem querer.
É solitário andar por entre a gente.
É um não contentar-se de contente.
É cuidar que se ganha em se perder.*

*É um estar-se preso por vontade.
É servir a quem vence, o vencedor;
É um ter com quem nos mata a lealdade.
Tão contrário a si é o mesmo amor.*

*Estou acordado e todos dormem todos dormem todos dormem.
Agora vejo em parte. Mas então veremos face a face.*

*É só o amor, é só o amor.
Que conhece o que é verdade.*

*Ainda que eu falasse a língua dos homens.
E falasse a língua dos anjos, sem amor eu nada seria.
Monte Castelo (Renato Russo)*

*Dedico esse trabalho ao meu marido,
Fernando, minha alma gêmea.*

Aos meus pais, José Carlos e Maria Antônia. A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que o trilhasse sem medo e cheio de esperança, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar o meu. Pela longa espera e compreensão durante minha longa viagem, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuramos arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amo vocês!

Aos meus irmãos Vivian, Caroline e Junior, pelo amor que nos une, pela preocupação, pelo incentivo e pela certeza de sempre poder contar com sua sinceridade.

Aos meus queridos sobrinhos, Matheus, Michel, Laís e Letícia, pelo sorriso puro e o amor incondicional, por tornarem meus dias mais alegres e barulhentos.

Aos meus cunhados Samir, Caio, José Paulo e Luiz e as minhas cunhadas Gislene, Ana Maria e Valéria por sempre confiarem em mim e por terem me proporcionado momentos descontraídos quando eu mais precisei.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo!

De maneira muito especial, agradeço o meu orientador Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho. Quem desde o início acreditou e confiou em mim. E que durante este período, em que tive o privilégio de ser orientada por ele, demonstrou a grande importância de não apenas ser um bom profissional, mas também ser um profissional humano e completo. Um modelo que desejo seguir.

Aos membros da banca examinadora da minha tese: Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado, Prof. Dr. Augusto Scalabrini, Profa. Dra. Ângela de Castro Resende, Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, pela atenção, discussão e sugestões que enriqueceram este trabalho.

À Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra, professora do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, pela atenção, valiosas sugestões e confiança que muito colaboraram para execução deste trabalho. Também pela disponibilidade que colocou seu laboratório para o meu aprendizado sobre técnica de Western Blot.

Ao Prof. Dr. Roberto Silva Costa, professor do Departamento de Patologia da FMRP-USP, por ter contribuído para realização deste trabalho.

Aos Professores Dr. Márcio Dantas e Dr. José Abrão da divisão de Nefrologia do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, pela participação na minha formação científica.

À Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo auxílio durante a realização do programa de aperfeiçoamento ao ensino (PAE) e principalmente pela amizade. Claudinha, registro aqui minha admiração por você!

À amiga Cleonice Geovanini Alves da Silva, técnica do laboratório de fisiologia renal do departamento de Fisiologia da FMRP, pela atenção, valiosas sugestões, constante incentivo, auxílio e amizade.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, pela participação na minha formação científica.

Aos funcionários do biotério Adalberto Valadas Vercezi, Maurício Rodrigues de Arantes e Roni Charles Fabbris, pelos cuidados aos animais de experimentação e pela sincera amizade. Meu muito obrigada.

A Adriana e Rossana, secretárias da pós-graduação do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, pela amizade e prestimosa ajuda.

Ao Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli, professor da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela amizade, apoio e incentivo constante. Obrigada também pela paciência e dedicação aos nossos trabalhos por você realizados.

À Adriana e Érika, pelo grande auxílio dispensado no Laboratório de Patologia. Obrigada pela competência que vocês conduzem o manuseio de espécimes renais.

À todos do laboratório, pelo convívio, amizade, incentivo e constante troca de experiências que nos proporcionaram crescimento profissional e pessoal. Obrigada Soraia, Gustavo, Lígia (Pudim) e Carlão por fazerem parte da equipe do laboratório e da minha vida.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, Ednéia, Simone, Mirian, Cleusa, Regina, Alex e Cadu, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Ao técnico Osmar Vettore, do laboratório de Farmacologia Cardiovascular da FMRP-USP, pelo auxílio na preparação de drogas e amizade.

À amiga Heloisa (Lele) uma pessoa maravilhosa e competente, que esteve sempre presente e auxiliou-me em todos os momentos em que precisei.

À todos do laboratório de Fisiologia Renal que me recebeu de braços abertos, todos vocês foram importante para mim, obrigada!!!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

À todos os amigos de pós-graduação pelo convívio, em especial: Lígia, Roberta, André, Renato, Evelin, Rildo, Telma, Ana Paula, Danielle, Teresa, Flávia, Alessandra (mandioca), Julia, Roberta, Valéria (Val), Daniela, Veridiana, Fabíola, Lúcia. Vocês souberam gentilmente compartilhar não só os bons momentos, mas também aqueles difíceis... Obrigada pela força, incentivo e palavras que muito me ajudaram a seguir em frente, mas também pelos momentos de descontração e folia. Vocês foram essências para finalização dessa etapa. Os laços criados aqui são verdadeiros e estão solidificados!!!

"Amigo é coisa para se guardar no lado esquerdo do peito

Mesmo que o tempo e a distância digam "não"

Mesmo esquecendo a canção

O que importa é ouvir a voz do coração"

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
DE ₅₀	Dose efetiva capaz de promover 50% do efeito máximo
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EEP	Estimulação elétrica periarterial
EMAX	Efeito máximo
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina adenina mononucleotídeo
HÁ	Hipertensão arterial
LAM	Leito arterial mesentérico
L-NMMA	N ^G -metil-L-arginina
L-NNA	N ^G -nitro-L-arginina
N	Normotenso
NA	Noradrenalina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	Nitrobluetetrazolium
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
O ₂ ⁻	superóxido
PFA	Paraformoldeido
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SMTC	S-metil-tiocitrulina
SOD	Superoxide desmutase
WKY	Wistar-Kyoto
7-NI	7-nitroindazol

SUMÁRIO

Resumo	xi
Summary	xv
I – Introdução	19
II – Objetivos	27
III – Material e Métodos	29
IV – Resultados	38
V – Discussão	54
VI – Conclusões	66
VII – Referências Bibliográficas	68
Anexos	86

RESUMO

RESUMO

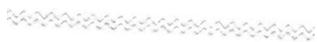
Neste trabalho, nosso objetivo foi investigar a função e a expressão da isoforma neuronal da enzima sintase de óxido nítrico (nNOS) em ratas Wistar normotensas (N) e espontaneamente hipertensas (SHR) em diferentes fases de desenvolvimento. Estudamos a resposta vasoconstritora induzida pela estimulação elétrica de nervos simpáticos periarteriais (EEP) em leito arterial mesentérico (LAM) isolado e perfundido (Krebs, 4ml/min) de ratas N com 30 e 180 dias e SHR de mesma idade. Também foi investigado a influência da hipertensão arterial sobre a modulação nitrérgica da resposta simpática usando um inibidor seletivo para nNOS, S-metil-tiocitrulina (SMTC) (20 μ M), além de western blot e histoquímica (NADPH-diaforase) do gânglio simpático mesentérico superior. A pressão arterial nos animais de 30 dias foi maior no grupo SHR quando comparada ao grupo N (132,0 \pm 1,0 vs 115,9 \pm 2,3, SHR; $P=0,01$) assim como aos 180d (183,0 \pm 1,3 vs 126,7 \pm 3,1;SHR; $P=0,001$). Em ambos os animais a pressão arterial se elevou com o envelhecimento (126,7 \pm 3,1 vs 115,9 \pm 2,3, N; $P=0,01$); (183,0 \pm 1,3 vs 132,0 \pm 1,0, SHR; $P=0,001$). A pressão basal de perfusão dos LAM isolados de N 30d e SHR 30d não apresentaram diferenças (15,5 \pm 0,4 vs 13,4 \pm 1,0). Entretanto houve um aumento nos animais SHR 180d quando comparados aos N 180d (26,9 \pm 0,9 vs 15,7 \pm 0,4). A resposta simpática à EEP mostrou que em SHR 30d houve um aumento da resposta vasoconstritora máxima à EEP, quando comparado com N 30d (183,1 [153,3–212,9] vs (78,2 [70,2–86,2] EMAX \pm EPM, $P= 0,001$). O mesmo foi observado no grupo SHR 180d em relação ao grupo N 180d (171,1 [165,1–177,2] vs (106,1

[91,1–125,5] $EMAX \pm EPM$, $P=0,003$). Em animais SHR 180d houve um aumento da sensibilidade a EEP em relação ao SHR 30d (14,3 [13,8–14,9] vs (18,7 [15,4–22,0], FE_{50} [IC95%], $P=0,05$). Em contraste, nos animais N 180d foi observado um aumento do efeito máximo em relação ao N 30d (106,1 [91,1–125,5] (78,2 [70,2–86,2] $EMAX \pm EPM$, $P=0,002$). A perfusão de SMTc não modificou a resposta a EEP em preparações de animais N 30d. Porém, a SMTc produziu um aumento da sensibilidade a EEP em preparações SHR 30d quando comparadas com SHR 30d na ausência do inibidor (15,3 [13,1–17,5] vs 18,7 [15,4–22,0], FE_{50} [IC95%], $P=0,04$). O mesmo foi observado em preparações N 180d (14,8 [12,8–16,7] vs 18,8 [14,4–22,1], FE_{50} [IC95%], $P=0,03$), não houve alterações entre as preparações de animais SHR 180d na presença ou na ausência de SMTc. A histoquímica do gânglio mesentérico superior mostrou diminuição significativa de neurônios NADPH-diaforase positivos SHR quando comparadas com N 30 e 180d ($0,6 \pm 0,2$ vs $2,8 \pm 0,4$, $P=0,001$), ($0,7 \pm 0,46$ vs $2,4 \pm 0,4$, $P=0,007$). O Western blot mostrou uma redução significativa na expressão proteica da nNOS em gânglio mesentérico superior dos animais SHR 180d quando comparados com animais N 180d ($0,1 \pm 0,009$ vs $0,3 \pm 0,01$, $P=0,005$).

Resumindo, os resultados desse trabalho mostram um menor número de neurônios NADPH-diaforase positivos no gânglio mesentérico superior de ratas SHR, presentes desde a fase de pré-hipertensão e mantidos durante a fase de hipertensão estabelecida, sugerindo uma relação causal entre a redução dos neurônios NADPH-diaforase positivos e o surgimento da

hipertensão arterial nesse modelo. A análise dos dados funcionais e da expressão protéica da nNOS mostram que nas fases de pré-hipertensão há uma resposta adrenérgica exacerbada, modulada pelo NO, sugerindo um papel contra-regulador do óxido nítrico sobre a atividade adrenérgica. Nossos dados também mostram que esse mecanismo inicial se esgota com o tempo, uma vez que na fase de hipertensão estabelecida a atividade da enzima, assim como sua expressão encontram-se reduzidas.

SUMMARY



SUMMARY

The objective of the present study was to investigate the function and expression of the nNOS in normotensive (N) and spontaneously hypertensive (SHR) female Wistar rats during different phases of development. We studied the vasoconstrictor response induced by electrical stimulation of periarterial sympathetic nerves (ESP) in a mesenteric arterial bed (MAB) isolated from N rats aged 30 and 180 days and SHR of the same age and perfused with Krebs (4 ml/min). We also investigated the influence of arterial hypertension on the nitrenergic modulation of the sympathetic response using the selective nNOS inhibitor S-methyl-thiocitrulline (SMTTC, 20 μ M), as well as Western blot and histochemistry (NADPH-diaphorase) of the superior mesenteric sympathetic ganglion. The arterial pressure of 30d animals was higher for the SHR group compared to the N group (132.0 ± 1.0 vs 115.9 ± 2.3 , SHR; $P=0.01$) as also observed at 180d (183.0 ± 1.3 vs 126.7 ± 3.1 , SHR; $P=0.001$). Arterial pressure increased with aging in both groups (126.7 ± 3.1 vs 115.9 ± 2.3 , N; $P=0.01$); (183.0 ± 1.3 vs 132.0 ± 1.0 , SHR; $P=0.001$). Basal perfusion pressure of MAB isolated from 30d N and SHR did not show differences (15.5 ± 0.4 vs 13.4 ± 1.0). However, there was an increase in 180d SHR animals compared to 180d N animals (26.9 ± 0.9 vs 15.7 ± 0.4). The sympathetic response to ESP revealed an increase of the maximum vasoconstrictor response to ESP in 30d SHR compared to 30d N (183.1 [153.3–212.9] vs $(78.2$ [70.2–86.2] $EMAX \pm SEM$, $P=0.001$). The same was observed in 180d SHR animals compared to 180d N animals (171.1 [165.1–177.2] vs $(106.1$ [91.1–125.5] $EMAX \pm SEM$, $P=0.003$). An increase in sensitivity to ESP occurred in 180d

SHR compared to 30d SHR (14.3 [13.8–14.9] vs (18.7 [15.4–22.0], FE_{50} [95%CI], $P<0.05$). In contrast, an increase in maximum effect was observed in 180d N animals compared to 30d N animals (106.1 [91.1–125.5] (78.2 [70.2–86.2] $EMAX \pm SEM$, $P=0.002$). SMTC perfusion did not modify the response to ESP in preparations from 30d N animals. However, SMTC elicited an increase in sensitivity to ESP in 30d SHR preparations compared to 30d SHR preparations in the absence of the inhibitor (15.3 [13.1–17.5] vs 18.7 [15.4–22.0]. FE_{50} [95%CI], $P=0.04$). The same was observed in 30d N preparations (14.8 [12.8–16.7] vs 18.8 [14.4–22.1], FE_{50} [95%CI], $P=0.03$). There was no difference between preparations from 180d SHR animals in the presence or absence of SMTC. Histochemistry of the superior mesenteric ganglion showed a significant reduction of NADPH-diaphorase-positive neurons in 180d SHR compared to 30 and 180d N (0.6 ± 0.2 vs 2.8 ± 0.4 , $P=0.001$). (0.76 ± 0.46 vs 2.4 ± 0.41 , $P<0.007$). Western blot showed a significant reduction in the protein expression of nNOS in the superior mesenteric ganglion of 180d SHR compared to 180d N (0.1 ± 0.009 vs 0.3 ± 0.01 , $P=0.005$).

In summary, the present results show that a smaller number of NADPH-diaphorase-positive neurons was present in the superior mesenteric ganglion of female SHR rats since the pre-hypertensive phase and that this reduction was maintained during the phase of established hypertension, suggesting a causal relation between the reduction of NADPH-diaphorase-positive neurons and the onset of arterial hypertension in this model. Analysis of functional data and of the protein expression of nNOS showed the

occurrence of an exacerbated adrenergic response modulated by NO in the pre-hypertensive phases, suggesting a counter-regulatory role of NO in adrenergic activity. The present data also show that this initial mechanism is exhausted with time since the activity of the enzyme and its expression were reduced in the phase of established hypertension.

I – INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) primária e a induzida experimentalmente ou determinada geneticamente em animais possui como característica em sua fase crônica o aumento da resistência vascular periférica - RVP - (Ferrario e Page, 1978; Pickering, 1986). Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos neste fenômeno ainda não são completamente compreendidos, porém envolvem alterações da estrutura vascular, ou seja, estreitamento da luz vascular por hipertrofia da camada muscular média (Folkow et al, 1970) e alterações funcionais que podem envolver a musculatura lisa vascular (Webb, 1984), os nervos periarteriais (Head, 1989) e as células endoteliais (Félétou e Vanhoutte, 2006).

Em condições fisiológicas o tônus vascular é mantido por um balanço entre sistemas vasoconstritores e vasodilatadores, destacando-se fatores vasoativos liberados pelas células endoteliais, substâncias humorais e neurotransmissores liberados pelas terminações nervosas presentes junto à camada adventícia vascular (Vanhoutte e Lüscher, 1987; Reid, 1988).

Furchgott e Zawadzki (1980) foram os pioneiros em observar em anéis de aorta de coelho, a liberação de um fator de relaxamento através do endotélio vascular. Ignarro e Palmer (1987) demonstraram a produção de óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina pelas células endoteliais. Essa molécula contribuiu para regulação da pressão arterial por meio do relaxamento da musculatura lisa vascular, sendo reconhecida,

posteriormente, como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). O NO modula a ação e a liberação de outros fatores vasoativos, como a renina (Bieirwaltes et al, 1994), a endotelina (Boulanger et al, 1990), e as prostaglandinas (Ribeiro et al, 2003). A biossíntese do NO envolve uma enzima denominada de NO sintase (NOS), a qual converte L-arginina em citrulina e NO. Até o presente momento, três isoformas desta enzima foram caracterizadas, purificadas e clonadas (revisto por Ortiz e Garvin, 2003). A isoenzima neuronal (nNOS), uma enzima dependente das concentrações de cálcio e de calmodulina intracelular, está presente nos neurônios do sistema nervoso central e do sistema periférico. A isoenzima induzida (iNOS) encontra-se principalmente em macrófagos e não é modulada pela concentração de cálcio intracelular. A síntese desta isoforma é induzida por diversos estímulos, como por exemplo, a presença de endotoxina bacteriana ou de citocinas, e pode ser induzida em diversos tipos celulares como músculo liso, células mesangiais renais, fibroblastos e hepatócitos. A isoenzima endotelial (eNOS) está presente nas células do endotélio vascular e também é controlada pelos níveis intracelulares de cálcio e calmodulina. Todas as isoenzimas são proteínas que contêm o grupamento heme, utilizam a L-arginina como substrato, necessitam dos cofatores NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), tetrahidrobiopterina, FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e FMN (flavina adenina mononucleotídeo) e são inibidas por análogos da L-arginina. Dentre esses, existem inibidores classificados como inespecíficos por bloquearem as três isoformas da NOS, são exemplos a N^G-metil-L-arginina (L-NMMA), a N^G-nitro-L-arginina (L-

NNA) (Takiguchi et al, 1988). Por outro lado, alguns análogos têm mostrado preferência pela inibição de isoforma específica como a da isoforma neuronal como 1[(2-trifluorometil l-fenil)imidazole] (Handy et al, 1996), o 7-nitroindazol (7-NI) (Garthewaite et al, 1996) e S-metil-tiocitrulina (SMTC) (Marayanan et al, 1994).

A modulação do tônus vascular através do sistema nervoso autônomo é realizada em sua maior parte pelo simpático, principalmente através da liberação de noradrenalina (NA) e conseqüente efeito constritor da musculatura lisa vascular. A intensidade desse efeito é regulada por uma série de mecanismos pré e pós-sinápticos. A liberação de NA é acompanhada por outros neurotransmissores que podem modificar a quantidade da NA das vesículas sinápticas nos próximos potenciais de ação ou modular seu efeito na junção neuro-muscular, destacando-se o neuropeptídeo Y e o ATP. A inervação perivascular possui, além das fibras simpáticas, fibras sensitivas que liberam substâncias vasoativas como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, neurocininas e o peptídeo vasoativo intestinal além de nervos nitrérgicos que liberam o NO. Tanto as substâncias liberadas dos nervos sensitivos quanto o NO podem produzir vasodilatação, opondo-se à NA, e dessa forma, modular a intensidade da resposta simpática (Ralevic et al, 1995).

Diversas evidências experimentais sugerem que o sistema nervoso simpático periférico possa ter relevância na fisiopatologia da HA. Técnicas de imuno-histo-fluorescência aplicadas às fibras adrenérgicas, análises morfométricas da densidade destes nervos e dosagens bioquímicas da

concentração vascular de NA têm mostrado que a inervação simpática de diversos territórios vasculares de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é maior que a determinada em territórios correspondentes de Wistar Kyoto (WKY) (revisto por Head, 1989). Não obstante essas alterações morfológicas, a resposta vasoconstritora produzida através de estímulos elétricos de vasos isolados é de maior intensidade em SHR que em WKY (Nilsson e Folkow, 1982; Mulvany e Halpern, 1977; Cline Jr., 1985; Cassis et al, 1985; Chu e Beilin, 1993; Coelho et al, 1997; Rabelo et al, 2001), embora alguns autores não tenham observado diferenças significantes neste parâmetro (Collis e Vanhoutte, 1977; Webb et al, 1981). Esta “hiperresponsividade” adrenérgica parece envolver diversas alterações pré e pós-sinápticas simpáticas. Em vasos retirados de SHR tem sido descrito uma maior liberação de $^3\text{[H]-NA}$ (Collis et al, 1979; Vanhoutte et al, 1980), sugerindo que a maior resposta à estimulação elétrica de nervos simpáticos observada nos animais hipertensos envolva alterações pré-sinápticas. Por outro lado, uma maior sensibilidade à NA exógena tem sido observada em diversos vasos isolados de animais hipertensos (Ekas e Lokhandwala, 1981; Finch e Haeusler, 1974; Kubo, 1979; Haeusler e Haeely, 1970), o que sugere que alterações pós-sinápticas, no músculo liso vascular ou nas células endoteliais possam contribuir para o fenômeno acima descrito. Em resumo, os dados existentes na literatura apontam para a existência de uma hiperatividade adrenérgica em SHR, o que sugere que o sistema nervoso simpático possa participar de forma importante na fisiopatologia da HA.

Na hipertensão humana e em diversos modelos experimentais, o relaxamento provocado pela acetilcolina encontra-se reduzido em comparação com controles normotensos, apontando para uma disfunção das células endoteliais (Konishi e Su, 1983; Winqvist et al, 1984; Lockette et al, 1986; Carvalho et al, 1987; Félétou e Vanhoutte, 2006). Assim, estudos realizados por vários autores sugerem a participação do endotélio na modulação da resposta vasoconstritora simpática “in vitro”, uma vez que a retirada do mesmo potencializa a resposta vasoconstritora adrenérgica (Tesmafamarian et al, 1987; Hynes et al, 1988; Toda et al, 1990; Vo et al, 1991 e 1992; Li e Duckeles, 1992; Shinozuka et al, 1992; Bucher et al, 1992; Yamamoto et al, 1994; Boric et al, 1999). Em camundongo knockout para nNOS não é observada nenhuma alteração na pressão arterial, quando comparado aos “wild-type”, sugerindo que a deleção genética da nNOS seja compensada em partes, por outros mecanismos (Barouch et al, 2002; Jumrussirikul et al, 1998; Nelson et al, 1995; Vallon et al, 2001). Por outro lado, a administração aguda de 7-NI em camundongos knockout para eNOS reduz significativamente a pressão arterial, sugerindo que a nNOS contribui para a hipertensão (Kurihara et al, 1998). Gerova et al (1995) e Tseng et al (1996) demonstraram um aumento da atividade simpática após o bloqueio do NO no sistema nervoso central. Em contraste, Lewis et al (1991) e Horn et al (1994) demonstraram uma redução da atividade simpática com a aplicação local de doadores de NO em núcleos cerebrais relacionados ao controle da pressão arterial, sugerindo que o NO possa modular a atividade simpática em distintos sítios. Tem-se demonstrado, que a administração

aguda de SMTC um inibidor seletivo da nNOS é capaz de elevar a pressão arterial em ratos anestesiados (Narayanan et al, 1995; Komers et al, 2000) e em ratos consciente (Gozal et al, 1996), sugerindo a participação da nNOS no controle da pressão arterial. O mesmo foi observado por Ollerstam et al (1997) em ratos Sprague-Dawley com a administração crônica de 7-NI. Powers-Martin et al (2006) demonstraram uma redução na expressão da nNOS em neurônios pré-ganglionares simpáticos em ratos SHR. Por outro lado, Rabelo et al (2001) demonstraram a importância do NO neuronal na neuromodulação adrenérgica do leito vascular mesentérico. Um outro dado observado por estes autores é que essa modulação estava reduzida em SHR. Recentemente, a transferência e expressão funcional do gene da nNOS para ratos mostrou corrigir a hiperreatividade adrenérgica cardíaca, observada em animais SHR (Dan Li et al, 2007).

Estudo realizado em nosso laboratório mostrou que a resposta simpática a estimulação elétrica periarterial (EEP) do leito arterial mesentérico (LAM) é modulada por NO de origem não endotelial em ratas Wistar. Em contraste, essa modulação estava reduzida em animais SHR, sugerindo que a ausência da modulação do NO de origem não endotelial (neuronal ou através da isoforma induzida presente no músculo liso vascular) poderia contribuir para o aumento da resposta adrenérgica observada nesse modelo de hipertensão e, conseqüentemente, da manutenção da HA. De forma interessante, a perfusão de L-NNA potencializava a resposta adrenérgica de preparações removidas de ratas SHR com endotélio intacto, sugerindo que na fase de hipertensão arterial

estabelecida haja uma modulação compensatória da resposta adrenérgica, através da produção de NO endotelial (Rabelo et al 2001). Assim, uma possível deficiência na produção de NO pelos neurônios pós-ganglionares simpáticos ou uma diminuição da sensibilidade a esse neurotransmissor pelas células musculares lisas arteriais poderia ser provocada pelas diferenças hemodinâmicas e metabólicas apresentadas por esses dois grupos de animais durante o crescimento, sendo conseqüência da hipertensão. No entanto, não se pode excluir a hipótese de que nos ratos SHR a predisposição genética para hipertensão poderia incluir uma produção de NO neuronal deficiente. Um outro dado observado foi a redução do número de neurônios pós-ganglionares localizados no gânglio mesentérico superior circundados por terminações NADPH diaforase-positivas em animais SHR. Somados, a redução do efeito inibidor dos análogos de L-arginina sobre a EEP do LAM isolado e perfundido de animais hipertensos sem endotélio aliado a uma menor densidade de fibras NADPH diaforase em gânglio pós-sinápticos simpáticos apontam para uma possível deficiência da modulação da nNOS na resposta adrenérgica periférica nesse modelo de hipertensão. Entretanto, o uso de animais adultos, nos quais a HA já está estabelecida, não permite concluir se esses achados são causa ou conseqüência da hipertensão arterial. Assim, o presente estudo busca estudar a influência do NO de origem neuronal sobre o sistema nervoso simpático periférico em animais SHR antes e após desenvolverem hipertensão.

II – OBJETIVOS

OBJETIVOS

Comparar o efeito do bloqueio farmacológico da nNOS com SMTC sobre a resposta vasoconstritora simpática evocada pela EEP da artéria mesentérica superior de ratas normotensas e com hipertensão arterial espontânea

Comparar os padrões de resposta à EEP em ratas jovens (normotensas e pré-hipertensas) com ratas adultas (normotensas e com hipertensão arterial estabelecida)

Avaliar a densidade de neurônios positivos para nNOS no gânglio simpático mesentérico superior em ratas Wistar e SHR jovens e adultas.

Avaliar a expressão da nNOS em gânglio mesentérico superior em ratas Wistar e SHR jovens e adultas.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas ratas Wistar com 30 e 180 dias de vida provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto e ratas espontaneamente hipertensas (SHR) com 30 e 180 dias de vida, provindas de linhagem obtida originalmente da Taconic Farms Inc. Germantown, NY. Os animais permaneceram no Biotério Setorial do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP até o sacrifício e foram mantidos em sala com temperatura, umidade e ciclo claro-escuro previamente definidos e com livre acesso a ração e água.

Medida da Pressão Arterial

No dia em que se completou a idade desejada, foi realizada a aferição da pressão arterial das ratas Wistar ou SHR, acordadas e contidas em caixa pré-aquecida a 30° C, através de pletismografia de cauda com o uso de monitor computadorizado de pressão arterial (IITC, model 031, USA).

Preparo do leito vascular mesentérico isolado e perfundido

Como modelo de território vascular de resistência utilizamos o leito vascular mesentérico de rata isolado e perfundido "*in vitro*". O método segue o descrito por McGregor et al (1965), com pequenas modificações. As ratas foram anestesiadas com Tribromoetanol 2,5 % (1ml para cada 100g de animal, I.P.) para a abertura da cavidade abdominal e exposição das alças intestinais. As artérias íleo-cólica, cólica e duodeno-pancreática foram identificadas e ligadas. A artéria mesentérica superior foi dissecada próxima à sua origem na aorta abdominal e canulada com catéter de polietileno PE-50. O leito foi perfundido com 1 ml de uma solução de Krebs (composição abaixo) com 500 UI de heparina. O animal foi sacrificado com uma perfuração no diafragma e o conjunto mesentérico - alças intestinais retirado em bloco, sendo o leito mesentérico separado através de corte rente às alças intestinais. A preparação foi colocada em uma cuba de 10 ml contendo solução de Krebs aquecida a 37° C. A artéria mesentérica superior canulada foi acoplada a uma bomba de perfusão (LKB 2215 Multiperpex pump - Suécia) e o leito mesentérico perfundido com solução de Krebs, borbulhada com gás carbogênico (95% de O₂ e 5% de CO₂), em fluxo constante de 4 ml /min. A solução de Krebs utilizada (pH = 7.4) continha a seguinte composição: NaCl 120.0 mM; KCl 4.7 mM; NaHCO₃ 25.0 mM; CaCl₂.2 H₂O 2.4 mM; MgCl₂.6H₂O 1.4 mM; KH₂PO₄ 1.17 mM; glicose 11.0 mM. Um transdutor de pressão (Beckman R 511A, USA) foi acoplado em "y" ao sistema para registrar a pressão de perfusão. O sinal de saída, pré-amplificado e filtrado, foi acoplado ao sistema de aquisição de dados

DATAQ DI-150 conectado à porta paralela RS 232 de um computador pessoal Pentium II (Intel - USA), onde foi armazenados para posterior análise com software Windaq (DATAQ -USA – versão 2.5).

Estimulação elétrica

A EEP foi realizada com eletrodos anulares bipolares colocados ao redor da artéria mesentérica superior. As respostas vasoconstritoras simpáticas foram produzidas por estímulos de onda quadrada de 34 V, 3 ms, duração de 20 s e frequência variável de 7 a 64 Hz. Esses parâmetros foram previamente utilizados e mostraram-se eficazes em estimular nervos simpáticos (Rabelo.et al, 2001). Os estímulos elétricos foram aplicados com um estimulador de ondas quadradas (Stimulator Grass S4 - Grass Instrument CO, Quincy Mass. USA ou similar) e aferidos continuamente pela presença de um osciloscópio acoplado em paralelo com os eletrodos (Tektronix - modelo 5112 – Oregon -USA).

Protocolos experimentais

Investigação da influência do no sobre a resposta vasoconstritora induzida pela estimulação elétrica periarterial:

Para o estudo do bloqueio da NOS sobre a resposta vasoconstritora simpática foi adicionado à solução de Krebs o análogo da L-arginina seletivo

para nNOS SMTC (Sigma - USA), na concentração de 20 μ M. Inicialmente o leito mesentérico foi mantido por 15 minutos em repouso para estabilização da pressão basal de perfusão, a qual foi registrada continuamente em seus valores médios. Após o período de estabilização, iniciava-se a EEP com frequência de 7 a 64Hz, duração de 3ms. O estímulo foi mantido por 20 segundos e repetidos a cada 3 minutos, sendo seu efeito registrado. A partir de então, foi adicionada SMTC (20 μ M) a solução de perfusão. A droga foi infundida continuamente e a EEP foi realizada após o tempo de equilíbrio da preparação.

NADPH-Diaforase

A técnica utilizada para este fim segue a descrita por Vicent e Kimura (1992) com algumas modificações. As ratas, após anestesia com éter, foram perfundidas, através de cateter colocado no ventrículo esquerdo, com 200 ml de NaCl 0,9 % (para retirada do sangue) e em seguida perfundidos pela mesma via com 100 -150 ml de paraformaldeído (PFA) 4 % tamponado com fosfato 0,1 M para a fixação dos tecidos. A seguir, a artéria mesentérica superior foi identificada separada em conjunto com a aorta abdominal, bloco do gânglio simpático mesentérico superior e tecido conjuntivo. A seguir, o material foi colocado em sacarose 15 % tamponada com fosfato 0,1 M, permanecendo nessas condições durante a noite, sendo em seguida congelado com nitrogênio líquido e armazenado a -70°C. Após este procedimento, as amostras foram

cortadas em criostato à temperatura de -18°C em secções de $20\ \mu\text{m}$ de espessura. Os gânglios foram incubados em lâminas gelatinizadas contendo 100 a 200 ml de tampão fosfato ($\text{pH}=7,4$), Triton X-100 (0,3 %), nitrobluetetrazolium (NBT) 0,1 mg/ml e β -NADPH 1mg/ml por 1 h, a 37°C . A seguir, o meio foi retirado e a preparação lavada com água destilada e contra-coradas com solução de Van Guinon durante 3 minutos. No gânglio simpático, não há descrição de neurônios nitrérgicos (Anderson et al, 1993). Neste local, os neurônios simpáticos pós sinápticos estão cercados por uma densa rede pericelular de terminações que apresentam atividade NADPH diaforase. Os gânglios mesentéricos foram contados no microscópio com sistema de aquisição de imagem. Uma área de $100\ \mu^2$ foi delimitada e contou-se o número de neurônios cercados por fibras NADPH-diaforase positivos. Para cada corte foram contados 3 campos ao acaso e para cada animal contou-se 5 cortes. Assim, para cada animal obtiveram-se cerca de 15 contagens. O número médio de neurônios desta contagem foi o dado considerado para cada animal, sendo expresso como número de neurônios cercados por fibras NADPH positivos/ $100\ \mu^2$.

Western Blot

O método utilizado segue o descrito por Kim et al (1998) com modificações. Os gânglios mesentéricos superiores ($N=10$) de cada grupo foram retirados e homogeneizados, sob o gelo, com Politron em tampão contendo HEPES (20 mmol/L, pH 7.2), NaCl (25 mmol/L), EGTA (2 mmol/L),

NaF (50mmol/L), Na₃VO₄ (1 mmol/L) β-glicerofosfato (25 mmol/L), DTT (0.2 mmol/L), PMSF (1mmol/L), aprotinina (60ug/ml), leupeptina (2ug/ml) e Triton X-100 (0.1%). Após descanso de 30 minutos a 4°C, os homogenatos foram submetidos a ultrassom em gelo por 1 minuto e centrifugados a 10 000 g a 4°C por 30 minutos. A concentração de proteína do sobrenadante foi quantificada através de Kit específico e as amostras congeladas a -80°C para análise.

As amostras (30µg proteína) foram aquecidas por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (7,5 %) e transferidas posteriormente para membranas de PVDF (polivinil difluoreto). A reação não específica de fundo (background) foi minimizada com a incubação por 1 hora em temperatura ambiente com solução contendo leite desnatado (5%), Tris (10mmol/L, pH 7.5), NaCl (100mmol/L) e Tween 20 (0.1 %). Em seguida incubamos com anticorpo primário policlonal anti NOS neuronal (1/200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e anti α-tubulina monoclonal (1/4000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) *overnight* à 4°C . As bandas foram detectadas por quimioluminescência (SuperSignal West pico Chemiluminescent substrate – Pierce) e autoradiografia em filme de radiografia (Kodak Biomax MS-2).

Drogas

S-Metil-Tiocitrulina (Sigma Chemical USA).

Tribromoethanol (TBE anestésico) Aldrich Chemical Company, Inc.

Liquemine® (heparina anticoagulante) Roche do Brasil.

As drogas foram pesadas, diluídas em água destilada e deionizadas, distribuídas em alíquotas de 1ml e estocadas em freezer à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sais

Bicarbonato de Sódio P.A: Merck

Cloreto de Cálcio P. A .: Merck

Cloreto de Potássio P. A .: Merck

Cloreto de Sódio P. A .: Merck

Cloreto de Magnésio P. A .: Merck

Dextrose P. A .: Reagem Quimibras – Indústrias Químicas

Fosfato de diácido de Potássio P. A .: Merck

Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Dados considerados paramétricos foram comparados utilizando-se o teste t de Student para amostras não pareadas. Dados considerados não paramétricos foram comparados com teste de Mann Whitney. Para cada curva frequência-efeito obtida foi calculada a FE₅₀ (frequência efetiva capaz de promover 50% do efeito máximo da estimulação elétrica) com base nos valores do efeito máximo (EMAX) obtidos experimentalmente, utilizando-se o programa Instat versão 4.0 (Graph Pad Software, USA). As FE₅₀ das curvas frequência-efeito obtidas através da EEP do leito arterial mesentérico foram calculadas por regressão não-linear, utilizando-se o programa Prism® (GraphPad Software Corporation).

A comparação entre FE₅₀ e os EMAX foi feita através do método não-pareado e não-paramétrico de Mann Whitney e o teste pareado e não-paramétrico de Wilcoxon. Para análise da pressão basal de perfusão usou-se ANOVA não-paramétrico e pós-teste de Bonferroni. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

IV – RESULTADOS

RESULTADOS

Peso Corporal

A figura 1 representa o peso corporal das ratas normotensas (N) e hipertensas (SHR) com 30 e 180 dias de vida.

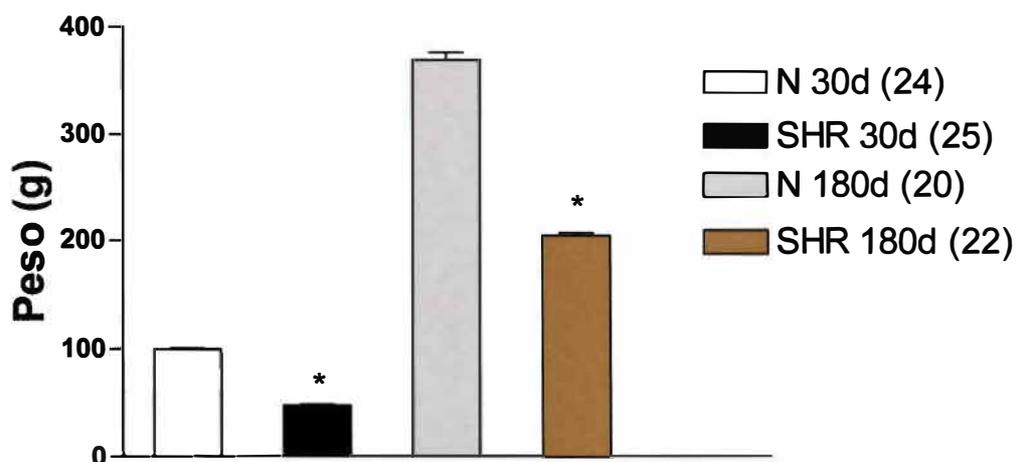


Figura 1: Peso Corporal de ratas N e SHR 30 e 180 dias de vida. As barras representam o valor das médias \pm EPM. Número de animais entre parênteses. (* $P=0,001$, SHR 30d vs N 30d e SHR 180d vs N 180d), test t Student.

Tabela 1: Peso corporal (em gramas) de ratas N e SHR com 30 e 180 dias de vida.

GRUPO	PESO (g)
N 30d (24)	99,7 ± 1,1
SHR 30d (25)	47,4± 0,9*
N 180d (20)	370,2±7,1
SHR 180d (22)	205,1±2,4*

Os resultados são expressos como média ± EPM. Número de animais entre parênteses. (* $P=0,001$, SHR 30d vs N 30d e SHR 180d vs N 180d).

Aferição da Pressão Arterial

A figura 2 e a tabela 2 representam os valores da média ± EPM da medida pletismográfica não invasiva da pressão arterial de ratas N e SHR com 30 e 180 dias de vida. A pressão arterial nos animais de 30 dias foi estatisticamente maior no grupo SHR quando comparada ao grupo N ($P=0,0001$) assim como aos 180 dias de vida ($P=0,0001$). Em ambos os animais a pressão arterial se elevou com o envelhecimento ($P<0.05$).

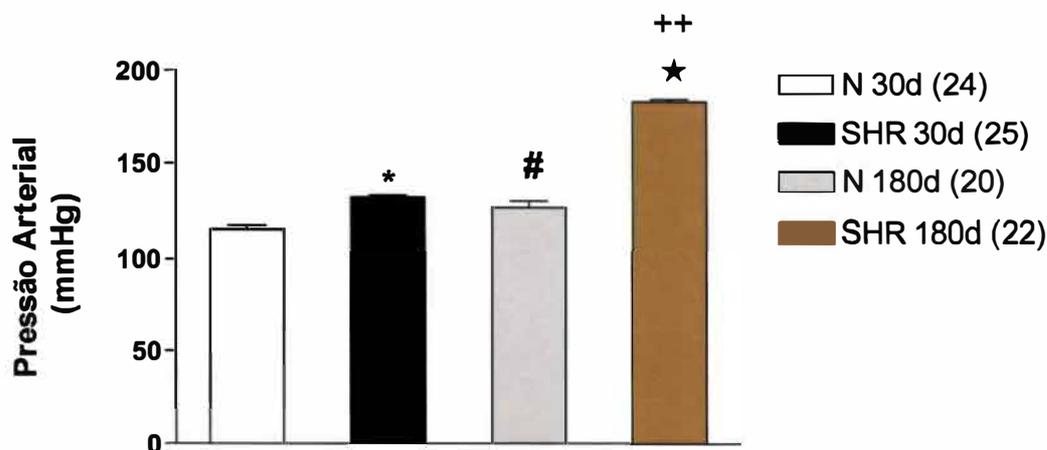


Figura 2: Pressão arterial pletoimográfica de ratas N e SHR com 30 e 180 dias de vida. As barras representam os valores da média \pm EPM. * $P=0,001$ N 30d vs SHR 30d; # $P=0,01$ N 30d vs N 180d; ++ $P=0,001$ SHR 180d vs SHR 30d; ★ $P=0,001$ SHR 180d vs N 180d. ANOVA com correção de Bonferroni.

Tabela 2: Pressão Arterial de ratas SHR e N com 30 e 180 dias de vida.

GRUPO	PRESSÃO ARTERIAL (mmHg)
N 30d (24)	115,9 \pm 2,3
SHR 30d (25)	132,0 \pm 1,0*++
N 180d (20)	126,7 \pm 3,1 #★
SHR 180d (22)	183,0 \pm 1,3

Resultados expressos com média \pm EPM. Número de animais entre parênteses. (* $P=0,001$ N 30 d vs SHR 30d; # $P=0,01$ N 30d vs N 180d; ++ $P=0,001$ SHR 180d vs SHR 30d; ★ $P=0,001$ SHR 180d vs N 180d).

Aferição da Pressão Basal de Perfusão do Leito Arterial Mesentérico

Isolado

A figura 3 e a tabela 3 representam os valores da média \pm EPM da pressão basal de perfusão do LAM isolado e perfundido de ratas N e SHR com 30 dias de vida registrada na presença ou na ausência do inibidor da NO sintase SMTC ($20\mu\text{M}$). Os dados mostraram que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos N e SHR na presença de SMTC.

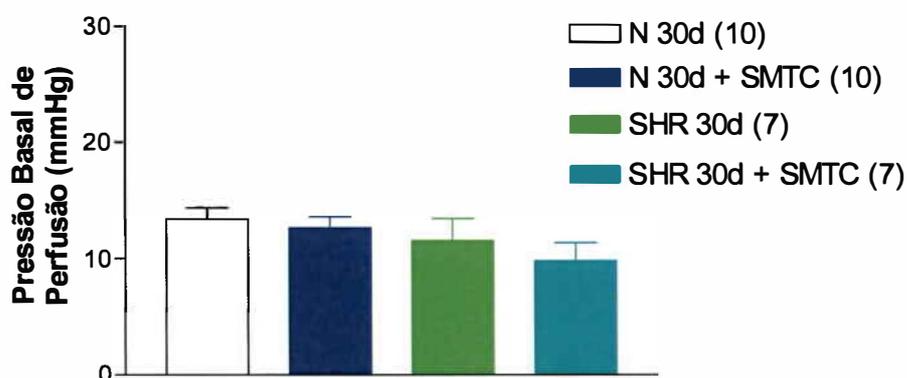


Figura 3: Pressão basal de perfusão do LAM isolado obtido de N e SHR 30 dias de vida, perfundido com SMTC ($20\mu\text{M}$). As barras representam o valor das médias \pm EPM.

Tabela 3: Efeito da SMTC (20 μ M) sobre a pressão basal de perfusão (fluxo 4ml/min) do LAM perfundido de ratas N e SHR com 30 dias de vida.

GRUPO	PRESSÃO BASAL (mmHg)
N 30d(10)	13,4 \pm 1,0
N 30d + SMTC(10)	12,6 \pm 0,9
SHR 30d (7)	15,5 \pm 0,4
SHR 30d + SMTC (7)	14,0 \pm 0,3

Resultados expressos como média \pm EPM. Número de animais entre parênteses.

A figura 4 e a tabela 4 representam os valores da média \pm EPM da pressão basal de perfusão do LAM isolado e perfundido de ratas N e SHR com 180 dias de vida registrada na presença ou na ausência do inibidor da NO sintase SMTC (20 μ M). Os dados mostram que não houve alterações estatisticamente significantes entre os grupos N 180 dias e SHR 180 dias na presença e na ausência de SMTC.

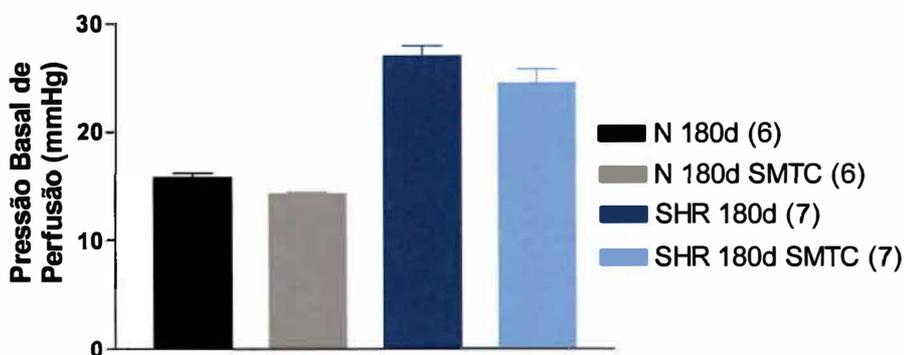


Figura 4: Pressão basal de perfusão do LAM isolado obtido de ratas N e SHR com 180 dias (n=7), perfundido com SMTC (20 μ M). As barras representam o valor das médias \pm EPM.

Tabela 4: Efeito da SMTC (20 μ M) sobre a pressão basal de perfusão (fluxo 4ml/min) do LAM perfundido de ratas N e SHR com 180 dias de vida.

GRUPO	PRESSÃO BASAL (mmHg)
N 180d(6)	15,7 \pm 0,4
N 180d + SMTC(6)	14,2 \pm 0,1
SHR 180d (7)	26,9 \pm 0,9
SHR 180d + SMTC (7)	24,5 \pm 1,2

Resultados expressos como média \pm EPM. Número de animais entre parênteses.

Curvas Frequência-Resposta à Estimulação Elétrica dos Nervos Periarteriais do Leito Arterial Mesentérico Isolado

A figura 5 mostra as curvas freqüência-efeito obtidas pela EEP do LAM retirado de ratas N e SHR com 30 dias e 180 dias de vida. A tabela 5 mostra os valores de FE₅₀ e EMAX obtido, acrescido dos respectivos intervalos de confiança (95%). A análise destas curvas mostra que em animais SHR com 30 dias de vida houve um aumento da resposta vasoconstritora máxima a EEP, quando comparado com N de mesma idade ($P=0,001$). O mesmo padrão de resposta foi observado no grupo SHR 180 dias em relação ao grupo N 180 dias ($P= 0,003$). Em animais SHR 180 dias houve um aumento da sensibilidade a EEP em relação ao SHR 30 dias ($P< 0,05$). Em contraste, nos animais N 180 dias nota-se um aumento do efeito máximo em relação ao N 30 dias ($P= 0,002$).

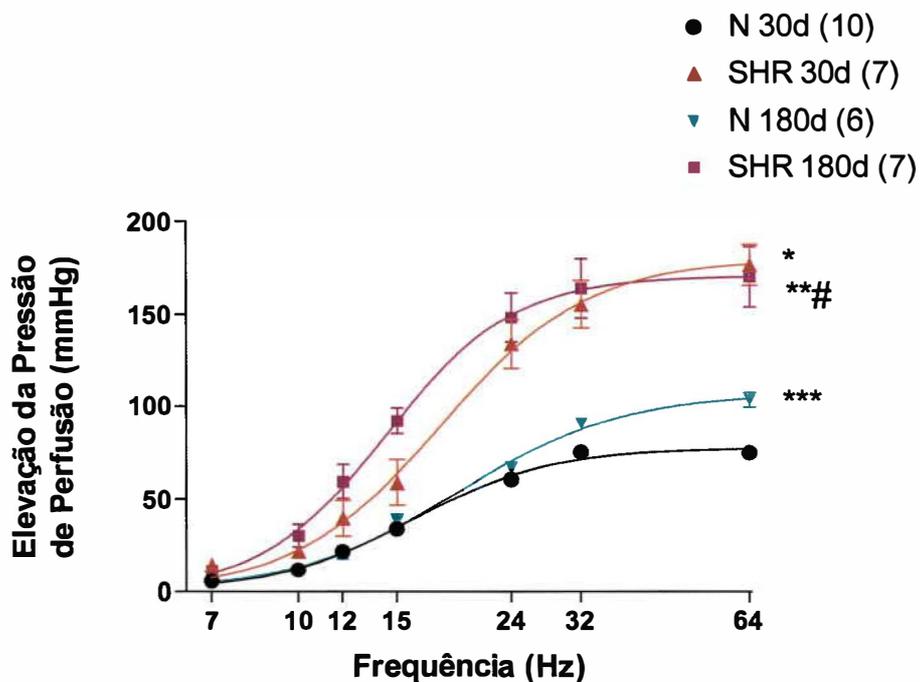


Figura 5: Curvas freqüência-resposta obtidas pela EEP (7-64Hz, 34 V, 3ms, duração de 20s) do LAM isolado de ratos N e SHR com 30 dias e 180 dias de vida. Valores expressos como média \pm EPM. As ordenadas expressam o efeito vasoconstritor. Número de animais entre parênteses. * $P=0,0001$ N 30d vs SHR 30d (EMAX); ** $P=0,003$ N 180d vs SHR 180d (EMAX); *** $P=0,002$ N30d vs N180d (EMAX); # $P< 0,05$ SHR 180d vs SHR 30d (FE₅₀) teste de Mann Whitney.

Tabela 5: Valores da FE₅₀ e EMAX para EEP (7-64Hz, 34 V, 3ms, duração de 20s) do LAM isolado de ratas N e SHR 30 e 180 dias de vida.

GRUPO	FE ₅₀	EMAX
N 30d (10)	16,2 (14,1 – 18,2)	78,2 (70,2 – 86,2)
SHR 30d (7)	18,7 (15,4 – 22,0)	183,1* (153,3 – 212,9)
N 180d (6)	18,8 (14,4 – 22,1)	106,1*** (91,1 – 125,5)
SHR 180d (7)	14,3# (13,8 – 14,9)	171,1** (165,1 – 177,2)

Valores expressos como mediana e intervalo de confiança 95% (IC 95%). Número de animais entre parênteses, * $P=0,0001$ N 30d vs SHR 30d; ** $P=0,003$ N 180d vs SHR 180d; *** $P=0,002$ N30d vs N180d; # $P<0,05$ SHR 180d vs SHR 30d.

Efeito da Inibição da NOS Neuronal sobre a Resposta Vasoconstritora Simpática do Leito Arterial Mesentérico Isolado

A figura 6 representa o efeito da perfusão de SMTC (20 μ M) sobre a resposta vasoconstritora simpática obtida pela EEP do LAM isolado de ratas N 30 dias (A), SHR 30 dias (B), N 180 dias (C), SHR 180 dias (D). A tabela 6 mostra os valores de FE₅₀ e do EMAX obtido, acrescido dos respectivos intervalos de confiança (95%). A perfusão de SMTC não modificou a resposta a EEP em preparações de animais N 30d (A). Em contraste a

perfusão de SMTC em preparações SHR 30d (B) foi acompanhada de um aumento da sensibilidade a EEP quando comparadas com SHR 30d na ausência do inibidor. O mesmo foi observado em preparações N 180d (C). A figura 6 (D) mostra que não houve alterações estatisticamente significantes entre as preparações de animais SHR 180d na presença ou na ausência do inibidor da NOS neuronal SMTC.

Tabela 6: Valores da FE₅₀ e EM para EEP (7-64Hz, 34 V, 3ms, duração de 20s) do LAM isolado de ratas N e SHR 30 e 180 dias de vida na presença e na ausência de SMTC (20µM).

Grupo	N 30d		SHR 30d		N 180d		SHR 180d	
	FE ₅₀	EMÁX	FE ₅₀	EMÁX	FE ₅₀	EMÁX	FE ₅₀	EMÁX
Com	16,22	78,2	18,7	183,1	18,8	106,1	14,3	171,1
endotélio	(14,1 – 18,2)	(70,2 – 86,2)	(15,4 – 22,0)	(153,3 – 212,9)	(14,4 – 22,1)	(91,1 – 125,5)	(13,8 – 14,9)	(165,1 – 177,2)
SMTC	16,39	81,9	15,3*	180,0	14,8**	114,4	14,3	171,1
	(14,2 – 18,5)	(74,8 – 89,0)	(13,1 – 17,5)	(153,8 – 206,3)	(12,8 – 16,7)	(96,2 – 127,1)	(13,8 – 14,9)	(165,1 – 177,2)

Valores expressos como mediana e intervalo de confiança 95% (IC 95%). Estatisticamente significante: *(SHR 30d vs SMTC); ** (N 180d vs SMTC).

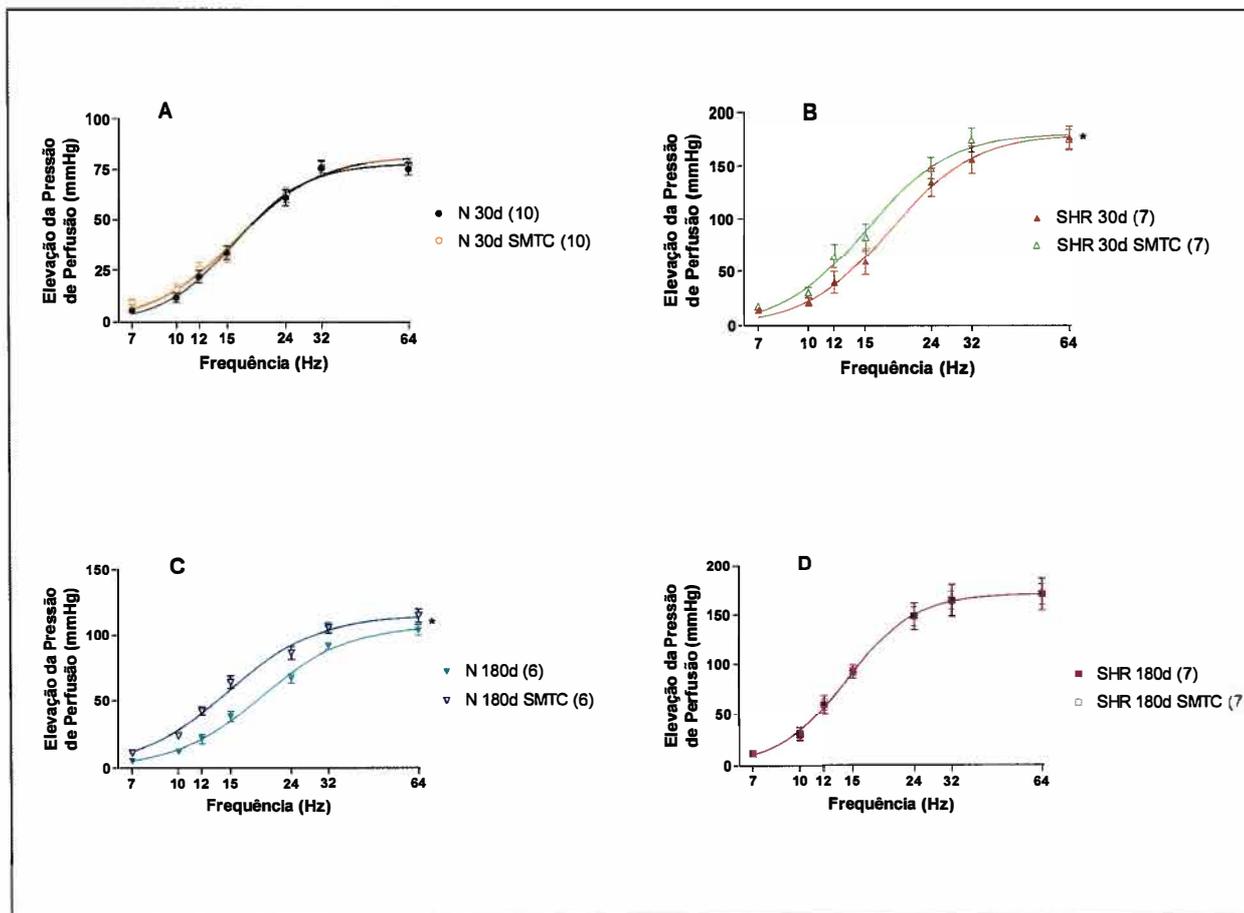


Figura 6: Efeito da perfusão de SMTC ($20 \mu\text{M}$) sobre a resposta vasoconstritora simpática do LAM isolado e perfundido de ratas N 30d (A), SHR 30d (B), N 180d (C), SHR 180d (D). Os pontos representam a média \pm EPM. Número de animais entre parênteses. * $P=0,04$ vs N 30d (FE_{50}); * $P=0,03$ vs N 180d (FE_{50}), teste de Wilcoxon.

Análise Histológica

A figura 7 mostra um corte de gânglio mesentérico NADPH-diaforase de uma rata N 30 dias (A) e de uma rata SHR (B). Os estudos histológicos evidenciaram diminuição significativa de neurônios NADPH-diaforase positivos em ratas SHR quando comparadas com ratas N 30 e 180 dias.

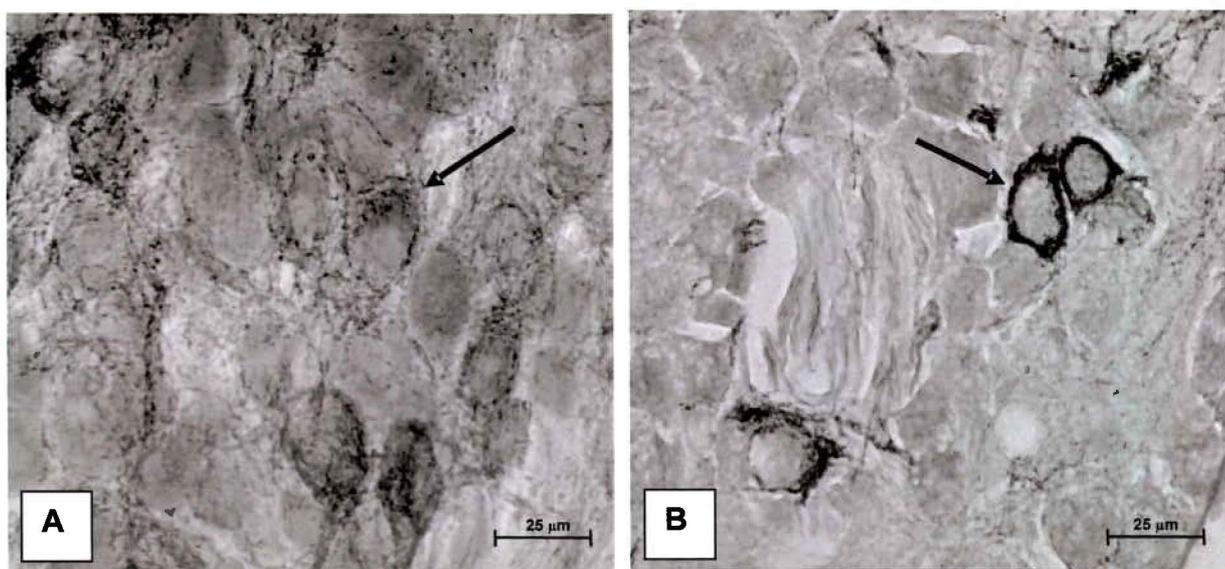


Figura 7 A e B: Cortes histológicos de gânglio mesentérico superior. Técnica NADPH-diaforase (preto) contra-corado com Van Guinon. (A) N 30 dias, (B) rata SHR 30 dias, A seta indica um neurônio pós-sináptico NADPH+.

Tabela 7: Avaliação histológica de neurônios do gânglio mesentérico NADPH-diaforase positivos de ratas N e SHR com 30 e 180 dias de vida.

GRUPO	Nº de neurônios NADPH + (/100µ ²)
N 30d (4)	2,8 ± 0,4
SHR 30d (8)	0,6 ± 0,2 *
N 180d (4)	2,4 ± 0,4
SHR 180d (5)	0,7 ± 0,4**

Valores expressos como média ± EPM. Número de animais entre parênteses. Estatisticamente significante: * $P= 0,001$, SHR 30d vs N 30d; ** $P= 0,007$, SHR 180d vs N 180d.

A figura 8 e a tabela 7 representam o número de células NADPH-diaforase + de ratas N e SHR com 30 e 180 dias. Em animais SHR 30 e 180 dias o número de células NADPH-diaforase + mostra-se estatisticamente diferente em relação aos animais N.

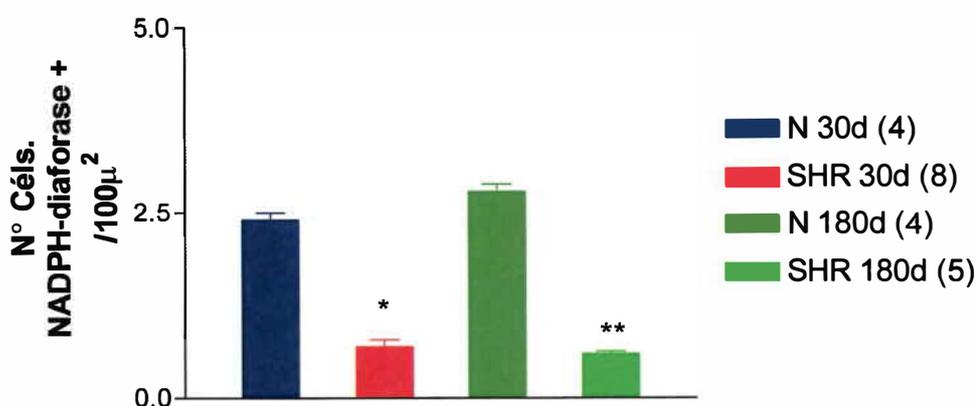


Figura 8: Número de células NDPH-diaforase + de gânglio mesentérico de ratas N e de SHR 30 e 180 dias. As barras representam o valor das médias ± EPM (* $P= 0,001$ SHR 30d vs N 30d; ** $P= 0,007$, SHR 180d vs N 180d, Mann Whitney).

Análise da Expressão da nNOS

A figura 9 e a tabela 8 representam a expressão da nNOS avaliada por *Western blot*, em gânglio mesentérico superior de ratas N e SHR com 30 e 180 dias. A análise da densidade das bandas de 155 KDa mostrou uma significativa redução na expressão da nNOS em gânglio mesentérico superior dos animais SHR 180 dias quando comparados com os animais N de mesma idade. Entretanto, não houve alterações estatisticamente significantes entre os grupos N e SHR com 30 dias.

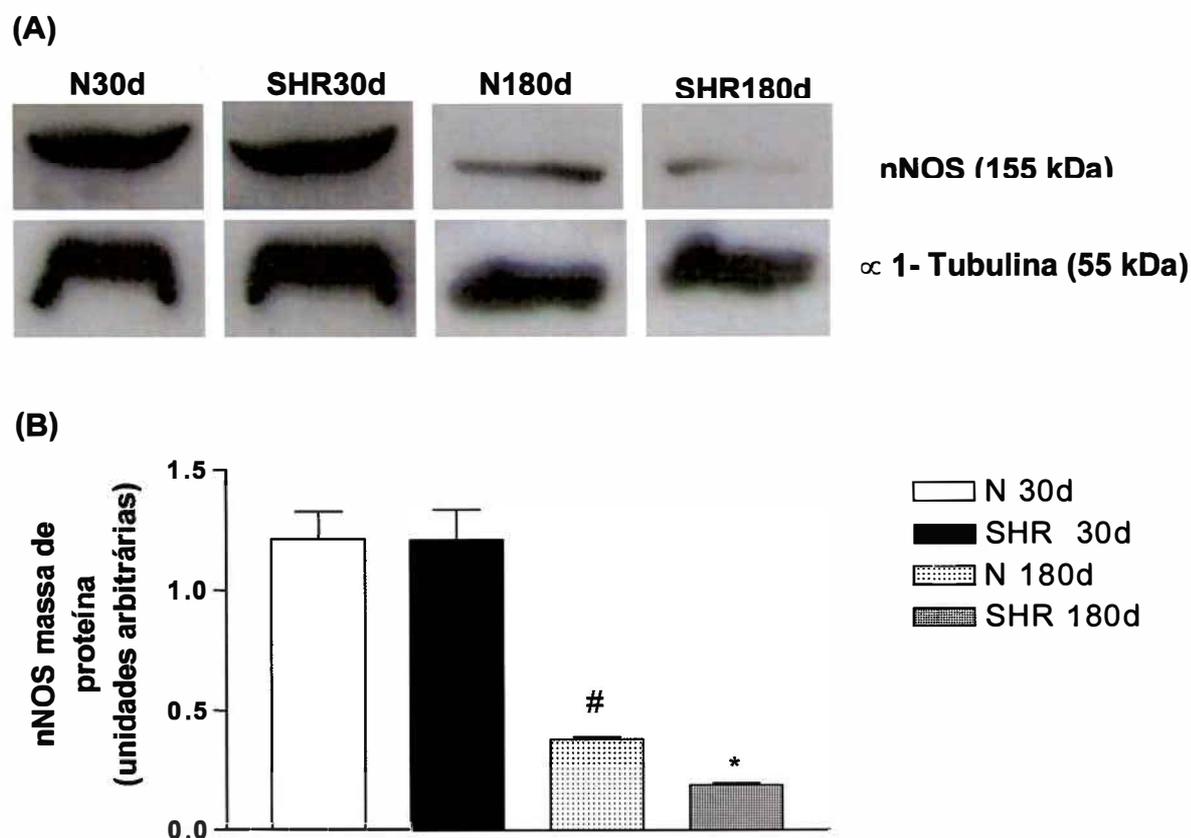


Figura 9: Expressão da nNOS avaliada por *Western blot*, em gânglio mesentérico superior dos animais de 30 e 180 dias dos grupos N e SHR (A). A análise da densidade das bandas de 155 KDa mostrou uma significativa redução na expressão da nNOS em gânglio mesentérico superior dos animais SHR 180 dias (B). Os dados são expressos como Média \pm EPM; $*P=0,005$ (SHR 180d vs N 180d).

Tabela 8: Expressão da nNOS avaliada por *Western blot*, em gânglio mesentérico superior dos animais N e SHR com 30 e 180 dias de vida .

GRUPO	nNOS – Massa Proteína (unidades arbitrárias)
N 30d (10)	1,2 ± 0,1
SHR 30d (10)	1,2 ± 0,1
N 180d (10)	0,3 ± 0,01
SHR 180d (10)	0,1± 0,009*

Valores expressos como média ± EPM. Número de animais entre parênteses. Estatisticamente significante: * SHR vs N.

V – DISCUSSÃO



DISCUSSÃO

No presente trabalho estudamos a função e a expressão da isoforma neuronal da nNOS em ratas wistar e SHR em diferentes fases de desenvolvimento.

Em nosso modelo experimental, podemos evidenciar uma redução significativa do peso dos animais SHR com 30 dias quando comparados com animais normotensos de mesma idade. Da mesma maneira, o peso dos animais com 180 dias foi também menor no grupo SHR do que no normotenso (figura 1, tabela 1). Estes dados mostram que houve um menor ganho ponderal de peso nos ratos SHR quando comparado aos Wistar, provavelmente refletindo alterações relativas à cepa Wistar-Kyoto.

De acordo com a figura 2, pode se constatar que a pressão arterial pletismográfica foi maior no grupo SHR quando comparada ao grupo normotenso tanto com 30 ou 180 dias (tabela 2). No entanto, apesar da diferença entre as pressões aferidas no grupo SHR com 30 dias quando comparada com o grupo normotenso, pode-se evidenciar que nessa idade os animais ainda não apresentavam hipertensão, sendo esses níveis pressóricos significativamente inferiores aos apresentados pelos animais SHR com 180 dias. Estes dados estão em concordância com os descritos previamente por outros autores para ratas normotensas e hipertensas (Roizen et al, 1975; Westfall et al, 1984; Meldrum et al, 1985; Vaziri et al, 1998; Touyz et al, 1999; Labat et al, 2006) Em contraste, os animais do

grupo normotenso 180 dias apresentaram uma elevação da pressão arterial decorrente do envelhecimento.

Influência da hipertensão sobre as características estruturais dos vasos

Alterações da morfologia e composição estrutural dos vasos de condutância e resistência de animais experimentais e humanos hipertensos têm sido descritas na literatura. A HA promove espessamento da parede vascular por hipertrofia e ou hiperplasia da musculatura lisa, levando a um estreitamento da luz vascular (Folkow et al, 1970; Mulvany et al, 1978). Essa alteração da relação entre luz/parede vem sendo proposta como responsável por parte das alterações de reatividade vascular observada nos diversos modelos de HA, afetando principalmente a inclinação (slope) e o efeito máximo das curvas dose-efeito a diversos agentes vasopressores (Folkow et al, 1970; 1982; Korner, 1982).

Os resultados obtidos em nossos experimentos em animais SHR 180 dias (figura 4, tabela 4) mostram que a pressão basal de perfusão é estatisticamente maior nas ratas SHR quando comparada as ratas normotensas de mesma idade, sugerindo que as preparações ratas SHR 180dias apresentem, sob o mesmo fluxo de perfusão, um menor diâmetro da luz vascular, o que seria justificado pelo remodelamento da geometria vascular.

Experimentos realizados “in vivo” mostram que a infusão de análogos da L-arginina, como a L-NMMA, a L-NNA e a Nw-nitro-l-arginina-metilester (L-NAME) são capazes de elevar a pressão arterial (Rees et al, 1989, Vargas et al, 1991) e de aumentar a resistência de vários territórios perfundidos (Gardiner et al, 1990). A interpretação dada a esses dados é a de que haveria uma produção basal de NO, a qual seria importante para a manutenção do tônus vascular, contrapondo-se a diversos sistemas pressores como o simpático, a angiotensina II e a vasopressina e o de substâncias vasoconstritoras liberadas pelo próprio endotélio como endotelina e algumas prostaglandinas. Evidências “in vitro” reforçam a hipótese da liberação basal de NO. Artérias isoladas apresentam uma maior sensibilidade a diversos agentes vasoconstritores quando o endotélio vascular é removido ou na presença de inibidores da NOS (Allan et al, 1983; Lues e Schumam, 1984; Tesfamariam e Halpern, 1988). Em coração isolado de coelho, a perfusão de L-NNA foi capaz de reduzir o fluxo basal coronariano (Pohl et al, 1994). Entretanto, outros dados sugerem que esta modulação do fluxo pelo EDRF varie de importância conforme a espécie animal envolvida e o território vascular estudado. Assim, a perfusão de inibidores da NOS não é acompanhada de elevação da pressão basal de perfusão em artéria pulmonar de cão (Nishiwaki et al, 1992) em artéria femoral de gato (Melkumyants et al, 1996) e em leito vascular mesentérico de rato (Ralevic e Burnstock, 1996).

O presente estudo mostra que não houve alterações na pressão basal de perfusão na presença de SMTC tanto em animais normotensos quanto

em animais SHR com 30 e 180 dias (figura 3, tabela 3). Esses dados reforçam a idéia de que a principal alteração promovida pela hipertensão arterial possa ser a hipertrofia vascular acompanhada de redução do diâmetro da luz vascular. (Folkow et al, 1970, 1982; Mulvany et al, 1977, 1978).

Influência da hipertensão arterial sobre a resposta vasoconstritora induzida pela estimulação elétrica de nervos simpáticos periarteriais

A modulação do tônus vascular através do sistema nervoso autônomo é realizada em sua maior parte pelo simpático, principalmente através da liberação de NA e conseqüentemente efeito constritor da musculatura lisa vascular. Nos nervos simpáticos periarteriais três principais neurotransmissores vêm sendo descritos: a clássica NA, o ATP (adenosina tri-fosfato) e o neuropeptídeo Y (Burnstock e Relevic, 1995). Além de neurotransmissores excitatórios, a EEP promove a liberação de neurotransmissores vasodilatadores, que atenuam a resposta contrátil. A inervação perivascular possui, além das fibras simpáticas, fibras sensitivas que liberam substâncias vasoativas como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, neurocininas e o peptídeo vasoativo intestinal além de nervos nitrérgicos que liberam o NO. Tanto as substâncias liberadas dos nervos sensitivos quanto o NO podem produzir vasodilatação, opondo-se à NA e dessa forma, modular a intensidade da resposta simpática.

Na figura 5 e na tabela 5 podemos observar que na fase pré-hipertensão, há uma resposta adrenérgica aumentada no grupo SHR 30 dias. Com o envelhecimento, ocorre o aumento da resposta adrenérgica nos dois grupos normotensos e SHR 180 dias (figura 5; tabela 5), concordantes com o aumento da pressão arterial (figura 2, tabela 2). Entretanto, a resposta do grupo SHR permanece elevada quando comparada ao grupo normotenso 180 dias. Estes resultados são consistentes com os obtidos previamente em vasos isolados. (Mulvany e Halpern, 1977; Collis et al, 1979; Vanhoutte et al, 1980; Nilsson e Folkow, 1982; Webb, 1984; Cline Jr., 1985; Cassis et al, 1985; Head, 1989; Chu e Beilin, 1993; Vanhoutte, 1996; Schiffrin, 2001; Ferrer et al, 2003), embora alguns autores não tenham observado diferenças significativas neste parâmetro (Collis e Vanhoutte, 1977; Webb et al, 1981). Esta “hiperresponsividade” adrenérgica parece envolver diversas alterações pré e pós-sinápticas simpáticas. Em vasos retirados de SHR tem sido descrito uma maior liberação de $^3\text{[H]-NA}$ (Collis et al, 1979; Vanhoutte et al, 1980), sugerindo que a maior resposta à estimulação elétrica de nervos simpáticos observada nos animais hipertensos envolva alterações pré-sinápticas. Por outro lado, uma maior sensibilidade à NA exógena tem sido observada em diversos vasos isolados de animais hipertensos (Ekas e Lokhandwala, 1981; Finch e Haeusler, 1974; Kubo, 1979; Haeusler e Haeely, 1970), o que sugere que alterações pós-sinápticas, no músculo liso vascular ou nas células endoteliais possam contribuir para o fenômeno acima descrito. Por outro lado, os resultados obtidos no grupo normotenso 180 dias demonstram um aumento da resposta vasoconstritora máxima,

quando comparado com o grupo normotenso 30 dias. O envelhecimento induz mudanças tanto nas células endoteliais quanto nas células da musculatura lisa vascular (Wei, 1992). Inúmeros autores têm demonstrado que a resposta vasodilatadora dependente do endotélio encontra-se diminuída com a idade, sugerindo alterações do sistema NO guanilato ciclase (Shirasaki et al, 1988). Em adição, a idade também promove alterações pré e pós-sinápticas simpáticas. Por outro lado, a literatura é bem controversa em relação ao conteúdo e a liberação de NA. Alguns autores demonstraram um aumento nessa resposta (Buchholz et al, 1990; Partanen et al, 1985), outros demonstraram uma redução nessa resposta (Fouda et al, 1986; Fernandes et al, 1992) e outros demonstraram que esta resposta não se altera (Handa e Duckles, 1987). Em nosso estudo não exploramos profundamente o mecanismo envolvido nesse fenômeno, entretanto o aumento da resposta adrenérgica é compatível com o aumento da pressão arterial observado em nossos animais.

Estudos realizados por vários autores sugerem a participação do endotélio na modulação do efeito da EEP, uma vez que a retirada do mesmo potencializa a resposta vasoconstritora simpática (Tasmafarian et al, 1987; Vo et al, 1991, 1992; Li e Duckeles, 1992; Shinozuka et al, 1992; Bucher et al, 1992; Boric et al, 1999). Entretanto, trabalhos de Vials et al (1997), Ferrer et al (2000), Rabelo et al (2001) e Hatanaka et al (2006) demonstraram a participação do NO neuronal na neuromodulação do tônus de artéria renal de coelhos e artéria mesentérica de ratos, sugerindo que o NO atenua, em condições fisiológicas, a resposta vasoconstritora simpática. Entretanto,

pouco tem sido descrito sobre a participação funcional da nNOS sobre a modulação da resposta adrenérgica em ratas espontaneamente hipertensas. Por isso, resolvemos investigar se o fenômeno acima descrito participa da gênese ou da manutenção da HA. Para isto, determinamos o efeito da inibição da nNOS com SMTC sobre a resposta vasoconstritora simpática em animais SHR antes e após o início da HA.

Na figura 6 A e na tabela 6 podemos observar que a SMTC não alterou a resposta vasoconstritora induzida pela EEP em preparações de ratas normotensas com 30 dias, sugerindo que a nNOS não participa dessa resposta. O mesmo foi observado por Marín et al (2000) em artéria mesentérica de rato Wistar-Kyoto. Embora não tenha sido mostrado nenhum efeito da inibição da nNOS sobre a EEP de ratas normotensas 30 dias, observamos que a nNOS está expressa no gânglio mesentérico superior (figura 8 e 9, tabela 7 e 8) desses animais. Vários mecanismos tem sido descrito relacionados ao controle da atividade da nNOS. Dentre eles temos: controle da expressão gênica; modificações após a transcrição do RNAm e após a tradução, alteração da fosforilação da nNOS; modulação redox e interação proteína-proteína. A indução da expressão da nNOS é frequentemente associada com a co-indução de fatores de transcrição como c-Jun (Wang et al, 2002). Vários estudos em humanos e ratos sugerem que o aumento da expressão da nNOS na hipóxia é dependente do tempo (Guo et al, 1997). Herring et al (2000) e Piech et al (2003) demonstraram em átrio e cardiomiócito um aumento nNOS em consequência do envelhecimento. Estudos sugerem que o tráfego intracelular da nNOS seja mediado por

modificações ligadas ao domínio da proteína. Inúmeros trabalhos demonstram que ativação da proteína quinase I (Song et al, 2004) e a II (Hayashi et al, 1999) dependente do complexo cálcio-calmodulina reduz a atividade da nNOS. A importância funcional dessa via ainda não está clara, embora muitas evidências sugere que a inibição da nNOS pelas proteínas quinases possa limitar o dano causado pelo NO na isquemia cerebral (Osuka et al, 2002; Yan et al, 2004). Têm sido demonstrado que a atividade da nNOS é extremamente sensível a modificações causadas pelo stress oxidativo, isso pode ser visto pelo efeito da superóxido dismutase (SOD) na síntese de NO (Hobbs et al, 1994; Schmidt et al, 1996). Os mecanismos propostos para explicar estes fenômenos acima descritos são complexos e fogem ao objetivo desta discussão. Desta forma, a ausência do efeito da SMTC sobre a resposta vasoconstritora simpática em ratas normotensas 30 dias, pode refletir a ausência da ativação da nNOS por um mecanismo não identificado, pós-translacional.

Na figura 6 C e na tabela 6 podemos observar que a perfusão de SMTC em preparações de ratas normotensas 180 dias foi acompanhada de um aumento da sensibilidade a EEP quando comparadas com normotensas 180 dias na ausência do inibidor, sugerindo que o NO seja um provável neuromodulador desta resposta. Dados similares foram observados por Rabelo et al (2001) e Hatanaka et al (2006) em LAM de rato. Nossos dados mostram que a participação da nNOS na modulação da resposta adrenérgica é relevante no rato normotenso mais idosos e parece funcionar como um mecanismo compensador do aumento da resposta adrenérgica

observado nessa situação. Reforçando esta visão, observamos que há uma correlação com o aumento da pressão arterial (figura 2; tabela 2) observado com o envelhecimento dos animais normotensos. Em paralelo, o número de neurônios cercados por fibras NADPH-diaforase positivas em gânglio mesentérico superior nesse período é semelhante aos animais normotensos 30 dias (figura 8, tabela 7), embora haja uma redução da expressão nNOS quando comparado ao grupo normotenso 30 dias (figura 9; tabela 8). A análise conjunta dos dados de expressão e imunolocalização da nNOS no grupo normotenso 180 dias sugerem que a menor expressão nNOS não interfere com a atividade da enzima. Uma possível explicação para esse fenômeno seria que a nNOS estaria mais ativa nesses animais. Em contraste, estudos demonstram que a ligação da nNOS à proteína de choque térmico (hsp90) estimula a síntese de NO (Song et al, 2002). Desta forma, nossos dados sugerem que a atividade da nNOS parece estar relacionada à mecanismos de controle pós-translacional. Assim, o estudo da expressão protéica da nNOS não está relacionado à aparente função observado em nosso modelo, embora o efeito da SMTC observado nos animais normotensos mais velhos sugira que a enzima apresente um a maior atividade nesse grupo, quando comparada aos animais normotensos 30 dias.

A perfusão de SMTC em preparações SHR 30 dias (figura 6 B; tabela 6) foi acompanhada de um aumento da sensibilidade a EEP quando comparadas com SHR 30 dias na ausência do inibidor, sugerindo a participação da nNOS nessa resposta. Em paralelo, a análise de expressão da nNOS nesses animais

é semelhante aos animais normotensos 30 dias (figura 9; tabela 8), embora este grupo apresente um menor número de neurônios cercados por fibras NADPH positivas (figura 8; tabela 7), sugerindo que a expressão relativa da nNOS esteja aumentada. A análise conjunta dos dados de expressão e imunolocalização da nNOS nos animais SHR 30 dias sugerem fortemente que o menor número de neurônios NADPH positivos leva a uma maior expressão e ativação da nNOS e que esse fenômeno possa ter relevância no desenvolvimento da HA e do estado de hiperativação adrenérgica observada nos animais SHR. Estes resultados são consistentes com os obtidos previamente analisando a imunolocalização da nNOS no sistema nervoso central e na região intermédio-lateral da medula espinhal, área correspondente a localização dos neurônios simpáticos pré-ganglionares por Powers-Martin et al (2006) e estendem esses achados para região do neurônio simpático pós-ganglionar em SHR. Entretanto, quando comparamos a resposta EEP em preparações de animais SHR 180 dias na presença de SMTc, observamos que o mesmo fenômeno não ocorreu com os animais SHR 180 dias (figura 6 D; tabela 6) sugerindo o desaparecimento da modulação inibitória do NO sobre a atividade simpática. O mesmo foi observado por Rabelo et al (2001) em leito arterial mesentérico. Em contraste, Ferrer et al (2003, 2004) demonstraram a participação da nNOS na resposta vasoconstritora induzida pela EEP em artéria mesentérica de ratos SHR. Estas discrepâncias nos resultados podem ser atribuídas à idade, ao sexo, a espécie animal e ao leito vascular estudado. Outra hipótese sugerida, mas não explorada em nossos experimentos, seria a de que o aumento da expressão e da atividade da nNOS, observado na fase

pré-hipertensão possa ocasionar uma maior geração de ânions superóxidos (O_2^-), o aumento da geração de radicais livres, em particular o peroxinitrito, poderia levar a uma disfunção ou até mesmo a destruição das fibras nitrérgicas (Ferrer et al, 2003). Celtek et al (1999) demonstraram em pênis e músculo anococcígeo de ratos diabéticos que a degeneração do nervo nitrérgico é um fenômeno dependente do NO. Os autores mostraram que o tratamento prévio desses animais com inibidor da NOS foi capaz de prevenir a degeneração nitrérgica e restaurar a resposta vasodilatadora quando comparados com os animais diabéticos sem tratamento. Resultados semelhantes foram visto por Dawson et al (1991) em cultura de células do córtex cerebral de ratos, sugerindo a participação do NO no processo de morte celular.

Resumindo, os resultados desse trabalho mostram um menor número de neurônios NADPH-diaforase positivos no gânglio mesentérico superior de ratas SHR, presentes desde a fase de pré-hipertensão e mantidos durante a fase de hipertensão estabelecida, sugerindo uma relação causal entre a redução dos neurônios NADPH-diaforase positivos e o surgimento da HA nesse modelo. A análise dos dados funcionais e da expressão protéica da nNOS mostram que nas fases de pré-hipertensão há uma resposta adrenérgica exacerbada, modulada pelo NO, sugerindo um papel contra-regulador do óxido nítrico sobre a atividade adrenérgica. Nossos dados também mostram que esse mecanismo inicial se esgota com o tempo, uma vez que na fase de hipertensão estabelecida a atividade da enzima, assim como sua expressão encontram-se reduzidas.

VI – CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- 1- Há uma redução no número de neurônios NADPH-diaforase positivos no gânglio mesentérico superior de ratas SHR, presentes desde a fase de pré-hipertensão e mantidos durante a fase de hipertensão estabelecida, sugerindo uma relação causal entre a redução dos neurônios NADPH-diaforase positivos e o surgimento da hipertensão arterial nesse modelo.
- 2- Nas fases de pré-hipertensão há uma resposta adrenérgica exacerbada, modulada pelo NO, sugerindo um papel contra-regulador do óxido nítrico sobre a atividade adrenérgica e que esse mecanismo inicial se esgota com o tempo.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERÊNCIAS

ANDERSON CR, EDWARDS SL, FURNESS JB, BREDT DS, SNYDER SH. The distribution of nitric oxide synthase-containing autonomic preganglionic terminals in the rat. *Brain Res.* 614:78-85, 1993.

BAROUCH LA, HARRISON RW, SKAF MW, ROSAS GO, CAPPOLA TP, KOBEISSI ZA, HOBAL IA, LEMMON CA, BURNET AL, O'ROURKE B, RODRIGUEZ ER, HUANG PL, LIMA JA, BERKOWITZ DE, HARE JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416: 337-339, 2002.

BIEIRWALTES WH. Nitric oxide partials in calcium-mediated regulation of renin release. *Hypertension (Suppl I)* 23: 140-144, 1994.

BORIC MP, FIGUEROA XF, DONOSO MV, PAREDES A, POBLETE I, HUIDOBRO-TORO JP. Rise in endothelium-derived NO after stimulation of rat perivascular sympathetic mesenteric nerves. *Am. J. Physiol.* 277: H1027-1035, 1999.

BOULANGER CM, LUSCHER TF. Release of endothelin from the porcine aorta, inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 85: 587-590, 1990.

BUCHER B, OUEDRAOGO S, TSCHÖPL M, PAYA D, STOCLET JC. Role of the l-arginine-NO pathway and of cyclic GMP in electrical field-induced noradrenaline release and vasoconstriction in the rat tail artery. *Br. J. Pharmacol.* 107, 976-982, 1992.

BUCHHOLZ J, DUCKELS SP. Effect of age on prejunctional modulation of norepinephrine release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252: 159-164, 1990.

CARVALHO MHC, SCIVOLETTO R, FORTES ZB, NIGRO D, CORDELLINI S. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats. Role of endothelium. *J. Hypertens.* 5: 377-382, 1987.

CASSIS LA, STITZEL RE, HEAD RJ. Hypernoradrenergic innervation of caudal artery of the spontaneously hypertensive rat and influence upon neuroeffector mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234: 792-803, 1985.

CELLEK S, RODRIGO J, LOBOS E, FERNANDEZ P, SERRANO J, MONCADA S. Selective nitroergic neurodegeneration in diabetes mellitus - a nitric oxide-dependent phenomenon. *Br. J. Pharmacol.* 128: 1804-1812, 1999.

CHU ZM, BEILIN LJ. Nitric oxide-mediated changes in vascular reactivity in pregnancy in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 110: 1184-1188, 1993.

CLINE JR, WH. Enhanced in vivo responsiveness of presynaptic angiotensin II receptor-mediated facilitation of vascular adrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 232, 661-669, 1985.

COELHO EB, BALLEJO G, SALGADO MCO. Nitric oxide blunts sympathetic response of pregnant normotensive and hypertensive rat arteries. *Hypertension.* 30: 587-588, 1997.

COLLIS MG, DE MEY C, VANHOUTTE PM. Enhanced release of noradrenaline in the kidney of the young spontaneously hypertensive rat. *Clin. Sci.* 57: 233s-234s, 1979.

DAN LI, WANG L, LEE CW, DAWSON TA, PATERSON DJ. Noradrenergic cell specific gene transfer with neuronal nitric oxide synthase reduces cardiac sympathetic neurotransmission in hypertensive rats. *Hypertension* 50: 69-74, 2007.

DAWSON TM, BRETT DS, FOTUHI M, HWANG PM, SNYDER SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7797-7801, 1991.

EKAS RD, LOKHANDWALA MF. Sympathetic nerve function and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 241: R379-R384, 1981.

FÉLÉTOU M, VANHOUTTE PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291: H985-H1002, 2006.

FERNANDES F, SALAICES M, SANCHEZ-FERRER CF, GARCIA-ROLDÁN JL, MARÍN J. effect of aging and hypertension on [³H]noradrenaline release in rat mesenteric artery. *J. Hypertens.* 10 S65, 1992.

FERRARIO CM, PAGE IH. Current views concerning cardiac output in the genesis of experimental hypertension. *Cir. Res.* 43: 821-831, 1978.

FERRER M, MARIN J, BALFAGON G. Diabetes alters neuronal nitric oxide release from rat mesenteric arteries. Role of protein kinase C. *Life Sci.* 66: 337-345, 2000.

FERRER M, SÁNCHEZ M, MINIVES N, SALAICES M, BALFAGON G. Aging increases neuronal nitric oxide release and superoxide anion generation in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *J. Vasc Res.* 40: 509-519, 2003.

FERRER M, SALAICES M, BALFAGON G. Endogenous prostacilin increases neuronal nitric oxide release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 506: 151-156, 2004.

FINCH L, HAEUSLER G. Vascular resistance and reactivity in hypertensive rats. *Blood Vessels* 11: 145-158, 1974.

FOLKOW B, HALLBÄCK M, LUNDGREN Y, WEISS L. Background of increased flow resistance and vascular reactivity in spontaneous hypertensive rats. *Acta Physiol. Scand.* 80: 93-106, 1970.

FOUDA AKL, ATKINSON J. Sensitivity to noradrenaline and electrical stimulation decreases with age in the rat tail artery. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 334: 37-39, 1986.

FURCHGOTT RF, VANHOUTTE PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J.* 3: 2007-2018, 1989.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.

GARTHWAITE J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14: 60-67, 1991.

GEROVA M, MASANOVA C, PAVLASEK J. Inhibition of NO synthase in the posterior hypothalamus increases blood pressure in the rat. *Physiol. Rev.* 44: 131-134, 1995.

GOZAL D, TORRES JE, GOZAL YM, LITWIN SM. Effect of nitric oxide synthase inhibition on cardiorespiratory responses in the conscious rat. *J. Appl. Physiol.* 81: 2068-2077, 1996.

GUO Y, WARD ME, BEASJOURS S, MORI M, HUSSAIN SN. Regulation of cerebellar nitric oxide production in response to prolonged in vivo hypoxia. *J. Neurosci. Res.* 49: 89-97, 1997.

HAEUSLER G, HAEFELY W. Pre- and postjunctional supersensitivity of the mesenteric artery preparation from normotensive and hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 266: 18-63, 1970.

HANDA RK, DUCKLES SP. Influence of age on norepinephrine content in arteries and veins of Fischer 344 rats. *Neurobiol. Aging* 8: 511-516, 1987.

HANDY RL, HARB HL, WALLACE P, GAFFEN Z, WHITHEAD KJ, MOORE PK. Inhibition of nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) in vitro: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br. J. Pharmacol.* 119: 423-431, 1996.

HATANAKA Y, HOBARA N, HONGHUA J, AKIYAMA S, NAWA H, KOBAYASHI Y, TAKAYAMA F, GOMITA Y, KAWASAKI H. Neuronal nitric oxide synthase inhibition facilitates adrenergic neurotransmission in rat mesenteric resistance arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316: 490-497, 2006.

HAYASHI Y, NISHIO M, NAITO Y, YOKOKURA H, NIMURA Y, HIDAKA H. Regulation of nitric oxide synthase by calmodulin kinases. *J. Biol. Chem.* 274: 20597-20602, 1999.

HAYNES WG, WEBB DJ. The endothelium family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease ?. Clin. Sci. 85: 485 - 500, 1993.

HEAD RJ. Hypernoradrenergic innervation: Its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. Blood Vessels 26: 1-20, 1989.

HERRING N, GOLDING S, PATERSON DJ. Pre-synaptic NO-cGMP pathway modulates vagal control of heart rate in isolated adult guinea pig atria. J. Mol. Cell Cardiol. 32: 1795-1804, 2000.

HORN T, SMITH PM, McLAUGHIN BE, BRUCE L, MARKS GS, PITTMAN QJ, FERGUSON AV. Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. Am. J. Physiol. 266: R306-R313, 1994.

HOBBS AJ, FUKUTO JM, IGNARRO LG. Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: Direct enhancement of generation by superoxide dismutase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 10992-10996, 1994.

HYNES MR, DANG H, DUCKLES SP. Contractile responses to adrenergic nerve stimulation are enhanced with removal of endothelium in rat caudal artery. Life Sci. 42: 357-365, 1988.

IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9265-9269, 1987.

JESÚS MARÍN, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol. Ther.* 75: 111-134, 1997.

JUMRUSSIRIKUL P, DINERMAN J, DAWSON TM, DAWSON VL, EKELUND U, GEORGAKOPOULOS D, SCHRAMM LP, CALKINS H, SNYDER SH, HARE JM, BERGER RD. Interaction between neuronal nitric oxide synthase and inhibitory G protein activity in heart rate regulation in conscious mice. *J. Clin. Invest.* 102: 1279-1285, 1998.

KIM S, IZUMI Y, YANO M, HAMAGUSHI A, MIURA K, YAMANAKA S, MIYAZAKI H, IWAO H. Angiotensin Blockade Inhibits Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Rat Balloon-Injured Artery. *Circulation* 97: 1731, 1998.

KOMERS R, OYAMA TT, CHAPMAN JG, ALLISON KM, ANDERSON S. Effects of systemic inhibition of neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats. *Hypertension* 35:655-661, 2000.

KONISHI M, SU C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension* 5: 881-886, 1983.

KUBO T. Increased pressor responses to pressor agents in spontaneously hypertensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57: 59-62, 1979.

KURIHARA N, ALFIE ME, SIGMON DH, RHALEB NE, SHESELY EG, CARRETERO OA. Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS null mutant mice. *Hypertension* 32: 856-861, 1998.

LEWIS SL, OHTA H, MACHADO H, BATES JN, TALMAN WT. Microinjection of S-nitrosocysteine into the nucleus tractus solitarii decreases arterial pressure and heart rate via activation of soluble guanyl cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 202: 135-136, 1991.

LI YJ, DUCKLES SP. Effect of endothelium on the actions of sympathetic and sensory nerves in the perfused rat mesentery. *Eur. J. Pharmacol.* 210: 23-30, 1992.

LOCKETT W, OTSUKA Y, CARRETERO O. A loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 8: 1161-1166, 1986

LÜSCHER TF, VANHOUTTE PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 8: 344-348, 1986.

MCGREGOR DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol.* 177:21, 1965.

MARAYANAN K, GRIFFITH OW. Synthesis of L-thiocitrulline, L-homothiocitrulline, and S-methyl-L-thiocitrulline: a new class of potent nitric oxide synthase inhibitors. *J. Med. Chem.* 37: 885-887, 1994.

MARÍN J, FERRER M, BALFAGÓN G. Role of protein kinase C in electrical-stimulation-induced neuronal nitric oxide release in mesenteric arteries from hypertensive rats. *Clin. Sci.* 99: 277-283, 2000.

MELKUMYANTS AM, BALASHOV AS, KLIMACHEV NA, KARTAMYSHEV SP, KHAYUTIN VM. Nitric oxide does not mediate flow induced endothelium arterial dilatation in the cat. *Card. Res.* 26: 256-260, 1996.

MULVANY MJ, HALPERN W. Contractile properties of small arteries resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ. Res.* 41: 19-26, 1977.

NELSON RJ, DEMAS GE, HUANG PL, FISHMAN MC, DAWSON VL, DAWSON TM, SNYDER SH. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* 378:383-386, 1995.

NISHIWAKI K, NYHAN DP, ROCK P, DESAI PM, PETERSON WP, PRIBBLE CG, MURRAY PA. N^w-nitro-l-arginine and pulmonary vascular pressure-flow relationship in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 262: H1331-H1337, 1992.

NILSSON H, FOLKOW B. Vasoconstrictor nerve influence on isolated mesenteric resistance vessels from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol. Scand.* 116: 205-208, 1982.

OLLERSTAM A, PITTNER J, PERSSON AEG, THORUP C. Increase blood pressure in rats after long-term inhibition of neuronal isoform nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 99: 2212-2218, 1997.

ORTIZ PA, GARVIN JL. Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284: R628-R638, 2003.

OSUKA K, WATANABE Y, USUDA N, NAKAZAWA A, FUKUNAGA K, MIYAMOTO E. Phosphorylation Of neuronal nitric oxide synthase at Ser847 by CaM-KII in the hippocampus of rat brain after transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22: 1098-1106, 2002

PALMER RMJ, REES DD, ASHTON DS, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.

PARTANEN M, WALLER SB, LONDON ED, HERVONEN A. Indices of neurotransmitter synthesis and release in aging sympathetic nervous system. *Neurobiol. Aging* 6: 227-232, 1985.

PICKERING TG. Pathophysiology of systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.* 58: 12D-15D, 1986.

PIECH A, DESSY C, HAVAUX X, FERON O, BALLIGAND JL. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 57: 456-467, 2003.

POHL U, LAMONTAGNE D, BASSENGE R, BUSSE R. Attenuation of coronary autoregulation in the isolated rabbit heart by endothelium derived nitric oxide. *Cardiovasc Res.* 28: 414-419, 1994.

POWERS-MARTIN K, McKITRIC DJ, ARNOLDA LF, PHILLIPS DJ. Distinct subpopulations of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) containing sympathetic preganglionic neurons in spontaneously hypertensive and wistar-kyoto rats. *J. Comp. Neurol.* 497:566-574, 2006.

RABELO FAW, RUSSO EM, SALGADO MCO, COELHO EB. Nonendothelial NO blunts sympathetic response of normotensive rats but not of SHR. *Hypertension.* 38 (part 2), 565-568, 2001.

RALEVIC V, BELAI A, BURNSTOCK G. Effects of streptozotocin-diabetes on sympathetic nerve, endothelial and smooth muscle function in the rat mesenteric arterial bed. *Eur. J. Pharmacol.* 286:193-199, 1995.

RALEVIC V, BURNSTOCK G. Mesenteric arterial function in the rat in pregnancy: role of sympathetic sensory-motor perivascular nerves, endothelium muscle, nitric oxide and prostaglandins. *Br. J. Pharmacol.* 117: 1463-1470, 1996,

REID JL: Vascular reactivity, adrenergic mechanisms, and arteriolar resistance in hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12 (suppl 3): S114-S120, 1988.

RIBEIRO ML, CELLA M, FARINA M, FRANCHI A. Crosstalk between nitric oxide synthase and cyclooxygenase metabolites in the estrogenized rat uterus. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 68: 285-290, 2003.

SCHIFFRIN EL. Small artery remodeling in hypertension: Can it be corrected? *Am. J. Med. Sci.* 322: 7-11, 2001.

SCHIMIDT HH, HOFMANN H, SCHINDLER U, SHUTENKO ZS, CUNNINGHAM DD, FEELISCH M. NO from NO synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14492-14497, 1996.

SHINOZUKA K, KOBAYASHI Y, SHIMOURA K, HATTORI. Role of nitric oxide from the endothelium on the neurogenic contractile responses of rabbit pulmonary artery. *Eur. J. Pharmacol.* 222: 113-120, 1992.

SHIRASAKI Y, KOLM P, NICKOLS GA, LEE TJF. Endothelial regulation of cyclic GMP and vascular responses in hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245: 53-58, 1988.

SONG Y, CARDOUNEL AJ, ZWEIER JL, XIA Y. Inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase by heart shock protein 90: Implication in nNOS regulation. *Biochemistry* 41: 10616-10622, 2002.

SONG T, HATANO N, HORII M, TOKUMITSU H, YAMAGUCHI F, TOKUDA M. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation. *Fesbs Lett.* 570: 133-137, 2004.

TAKIGUCHI Y, SATOH N, HASHIMOTO H, NAKASHIMA M. Changes in vascular reactivity in experimental diabetic rats: comparison with lipothyroid rats. *Blood Vessels* 25:250, 1988.

TSENG CJ, LIU HY, LIN HC, GER LP, TUNG CS, YEN MH. Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. *Hypertension* 27: 36-42, 1996.

TESFAMARIAM B, WEISBROD RM, COHEN RA. Endothelium inhibits responses of rabbit carotid artery to adrenergic nerve stimulation. *Am. J. Physiol.* 253: H792-H798, 1987.

TODA N, OKAMURA T. Modification by L-N^Gmonomethyl-L-arginine (L-NMMA) of the response to nerve stimulation in isolated dog mesenteric and cerebral arteries. *Jpn. J. Pharmacol.* 52: 170-173, 1990.

VALLON V, TRAYNOR T, BARAJAS L, HUANG YG, BRIGGS JP, SCHNERMANN J. Feedback control of glomerular vascular tone in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 1599-1606, 2001.

VANHOUTTE PM. Endothelial dysfunction in hypertension. *J. Hypertens.* 14: S83 - S93, 1996.

VANHOUTTE PM, LÜSCHER TF. Vascular endothelium and hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 10 (suppl 4): S19-S24, 1987.

VANHOUTTE PM, WEBB RC, COLLIS MG. Pre- and post-junctional adrenergic mechanisms and hypertension. *Clin. Sci.* 59 (Suppl 6): 211S - 223S, 1980.

VIALS AJ, CROWE R, BURNSTOCK G. A neuromodulatory role for neuronal nitric oxide in the rabbit renal artery. *Br. J. Pharmacol.* 121: 213-220, 1997.

VINCENT SR, KIMURA H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46: 755-784, 1992.

VO PA, REID JJ, RAND MJ. Attenuation of vasoconstriction by endogenous nitric oxide in rat caudal artery. *Br. J. Pharmacol.* 107: 1121-1128, 1992

VO PA, REID JJ, RAND MJ. Endothelial nitric oxide attenuates vasoconstrictor responses to nerve stimulation and noradrenaline in the rat tail artery. *Eur. J. Pharmacol.* 199: 123-125, 1991.

WANG X, TAY SS, NG YK. C-fos and c-Jun expressions in nitric oxide synthase immunoreactive neurons in the lateral geniculate nucleus of experimental glaucomatous rats. *Exp. Brain Res.* 144: 365-372, 2002.

WEBB RC. Vascular changes in hypertension. In *Cardiovascular pharmacology*, pg. 215 - 255, 2^a edition, Antoniaccio, M., Raven Press, NY - USA, 1984.

WEBB RC, VANHOUTTE PM, BOHR DF. Adrenergic neurotransmission in vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 3: 93-103, 1981.

WEI JY. Age and the cardiovascular system. *N Engl. J. Med.* 327: 1735-1739, 1992.

WINQUIST RJ, BUNTING PB, BASKIN EP, WALLACE AA. Decreased endothelium-dependent relaxation in New Zealand genetic hypertensive rats. *J. Hypertens* 2: 541-545, 1984.

YAMAMOTO, R; WADA, A; ASADA, Y; YUHI, T; YANAGITA, T; NIINA, H; SUMIYOSHI, S. Functional relation between nitric oxide and noradrenaline for the modulation of vascular tone in rat mesenteric vasculature. *Naunyn-Schmiederbergs Arch. Pharmacol.* 349: 362-366, 1994.

YAN XB, SONG B, ZHANG GY. Postsynaptic density protein 95 mediates Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II activated serine phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase during brain ischemia in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 355: 197-200, 2004.

ANEXOS

ROLE OF nNOS ON THE SYMPATHETIC RESPONSE IN MESENTERIC ARTERIES FROM SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Andréia Fernanda Carvalho Leone, Franklin Fernandes Pimentel e Eduardo Barbosa Coelho*

Department of Internal Medicine, Nephrology Division. School of Medicine of Ribeirão Preto. University of São Paulo – Brazil.

Short title: nNOS and sympathetic response in SHR

Key Words: neuronal nitric oxide, vascular reactivity, hypertension, autonomic nervous system, spontaneously hypertensive rat, mesenteric ganglia.

Corresponding author: Eduardo Barbosa Coelho. Department of Internal Medicine. FMRP-USP. Av. Bandeirantes 3900. CEP: 14049-900. Email: ebcoelho@fmrp.usp.br. Phone: +55 16 36022543; FAX: +55 16 36336695.

Abstract

The aim of the present investigation was to study the role of nNOS on sympathetic response observed in spontaneously hypertensive rats (SHR). Pre-hypertensive SHR (3-4 weeks, Y-SHR) and adult SHR (24-28 weeks, A-SHR) were compared with age-matched Wistar rats (Y-WR and A-WR, respectively), regarding the effect of S-methyl-L-thiocitrulline (SMTC, 20 μ M) on the periarterial nerve stimulation (PNS, 7-64 Hz) of mesenteric arteries. The inhibition of nNOS with SMTC did not produce any effect on the vasoconstrictor response induced by PNS in Y-WR. There was an increase in the sympathetic response after nNOS inhibition in A-WR with a reduction of F_{50} (median F_{50} =14.8 Hz [95%CI, 12.8 to 16.7 Hz] vs 18.8 Hz [95%CI, 14.4 to 22.1), $n=7$, $P<0.05$). In contrast, the effect of nNOS inhibition in SHR was only observed in Y-SHR (median F_{50} 15.3 Hz [95%IC, 13.1 to 17.7] vs 18.7 [95%IC, 15.4 to 22.0], $n=7$, $P<0.05$) and was blunted in A-SHR. The number of NADPH cells in the sympathetic ganglion was reduced in both Y-SHR ($P<0.001$) and A-SHR ($P<0.05$) compared with age-matched WR. nNOS protein expression was reduced with aging in both groups, but was more intense in A-SHR than in Y-SHR ($P<0.01$). These results show an augmented sympathetic response to PNS, counteracted by neuronal NO, in the mesenteric bed of pre-hypertensive SHR and A-WR. Also, our data showed a blunted effect of nNOS on the modulation of the sympathetic response in A-SHR, suggesting a role of nNOS in the development and maintenance of hypertension in this model.

Introduction

Nitric oxide (NO) plays an important role in the control of vascular tone, including the regulation of autonomic functions [1]. NO release by the neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) has been shown to be able to blunt the central sympathetic drive and to reduce the vascular tone. In this regard, sympathetic activity was increased by the blockade of central NO production [2] and blood pressure was also increased when nNOS was inhibited by S-methyl-L-thiocitrulline (SMTC), a specific nNOS inhibitor, in conscious Sprague-Dawley rats [3]. nNOS, and therefore presumably NO, also occur in the autonomic nerves in the outer adventitial layers of various blood vessels [4,5] and in preganglionic sympathetic neurons [6,7]. Augmented vasoconstrictor responses to perivascular nerve stimulation (PNS) have been consistently reported in isolated arteries of spontaneously hypertensive rats (SHR) [8-12]. In both humans and rats, hypertension is associated with endothelial dysfunction, i.e., reduced vasodilatation of NO released by endothelial cells [13]. In contrast, the influence of nNOS on the modulation of the sympathetic response induced by PNS has been poorly studied. There are some reports indicating that NO released by non-endothelial NOS is blunted in SHR compared with normotensive Wistar and Sprague-Dawley rats [11,14,15]. However, when compared with Wistar Kyoto rats (WKY), the response to NOS inhibition with L-NAME is enhanced in endothelium-denuded mesenteric arteries from SHR, suggesting an excess of NO release, probably by enhanced activation of nitrenergic nerves. These contrasting data could be explained by the differences in strains used as controls, i.e., Wistar and Sprague-Dawley vs. WKY. Another explanation, not yet extensively tested, could be related to the aging process. The increased NO release may be related to the enhanced adrenergic nerve activity observed with aging in both normotensive and hypertensive rats and may act as a compensatory mechanism. Since SHR have been reported to be a hyperadrenergic model of hypertension, the presence of nNOS dysfunction in a pre-hypertensive phase (3-4 weeks) could be related to the etiology of hypertension. On the other hand, the absence of nNOS changes in the pre-hypertensive phase may suggest a compensatory mechanism secondary to the development of hypertension. Accordingly, the present study was conducted to examine the influence of NO on neurally induced vasoconstrictor responses of the isolated

mesenteric arterial bed during two periods of development: in the pre-hypertensive phase (3-4weeks) and in the sustained hypertensive phase (24-30 weeks) of SHR. In addition, histochemical localization of NADPH-diaphorase staining [6] and Western blot of nNOS were also performed in the superior mesenteric ganglion of SHR and age-matched normotensive rats.

Methods

Animals

Experiments were performed using female SHR (inbred SHR originally obtained from Taconic Farms Inc, Germantown, NY) with 3-4weeks (young; 47 ± 1 g, n= 25) and with 24-30 weeks (adult, 205 ± 2 g, n=22) using age-matched young (Y-WR; 100 ± 1 g, n=24) and adult Wistar rats (A-WR; 370 ± 7 g, n=20) as normotensive controls. The rats had free access to standard rat chow and tap water. All experiments were conducted in accordance with institutional guidelines on the use of animals in research. Arterial blood pressure was measured by the tail-cuff method.

Periarterial Nerve Stimulation

The rats were anesthetized with 2% tribromoethanol (1 mL/100 g IP), and the mesenteric bed was removed and prepared for perfusion in a water-jacket organ bath maintained at 37°C, as previously described [16]. In brief, the mesenteric arteries were perfused with a modified Krebs's solution (in mmol/L: NaCl 120.0, KCl 4.7, NaHCO₃ 25.0, CaCl₂·2H₂O 3.0, MgCl₂·6H₂O 1.4, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11.0, and EDTA 0.03) equilibrated with a 95% O₂/5% CO₂ mixture, pH 7.4, at 37°C at a constant flow of 4 mL/min (LKB 2215 multiperplex pump, Sweden). The mesenteric perfusion pressure was monitored (Beckman R 511A, USA) with a pressure transducer (Grass P23XL, USA) connected to a sidearm of the mesenteric artery cannula. The output was connected to an analogical-digital converter (Dataq DI150, USA) and plugged into a personal computer serial port. PNS was achieved through 2 bipolar platinum ring electrodes placed around the superior mesenteric artery, and consisted of rectangular pulses (34 V, 3 milliseconds) of variable frequency (7 to 64 Hz) applied for 20 seconds at 3-minute intervals. The perfused mesenteric arterial bed was then allowed to equilibrate for 15 minutes, PNS (7 to 64 Hz) was applied, and the increases in perfusion

pressure were recorded. Guanethidine (5 mmol/L) or tetrodotoxin (1 mmol/L) added at the beginning of the perfusion period completely abolished the vasoconstrictor responses to electrical stimulation (data not shown), indicating their sympathetic origin, as previously described [10,17]. To investigate the influence of NO on the vasoconstrictor responses elicited by sympathetic stimulation, the nNOS inhibitor S-methyl-L-thiocitrulline (SMTC, 20 μ mol/L) was added to the perfusion solution after the first frequency-response curve and a second frequency-response curve was done using the same frequency range (7 to 64 Hz) of the first PNS stimulation. The perfusion of 20 μ M SMTC did not change the NO endothelial-dependent vasodilator effect of ionophore calcium (A23187) in mesenteric bed precontracted with 1 μ g/ml phenylephrine (data not shown).

NADPH-diaphorase

In a separate series of experiments, Y-SHR, A-SHR and age-matched WR were firstly perfused intracardially with 200 mL saline followed by 100 to 150 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1mol/L phosphate buffer. At the end of the perfusion, the superior mesenteric ganglion was removed and stored in 15% sucrose in 0.1mol/L phosphate buffer overnight, stored in frozen and liquid nitrogen. Twenty-mm sections were then cut with a cryostat, mounted on gelatin-coated slides and processed for NADPH-diaphorase histochemistry as follows: sections were incubated for 60 minutes at 37°C with a solution containing 0.1 mol/L phosphate buffer - pH 7.4, 0.3% Triton X100, 0.1 mg/mL nitrobluetetrazolium, and 1.0 mg/mL b-NADPH; washed with distilled water; and mounted for microscopic observation. The sections were examined with a computerized image analysis system. Images were captured from slides using a Carl Zeiss KS300 microscope and Sony DXC 107A camera together with the Image Pro Plus software (version 4.0. Media Cybernetics). An area of 100 μ^2 was delimited and the number of neurons surrounded by NADPH-diaphorase was measured. For each animal, fifteen sections were randomly counted along the mesenteric ganglion and an average number of neurons was obtained and expressed as number of cells NADPH+/100 μ^2 .

Western Blot

Analysis of nNOS protein expression was done according a previously published method [18], with small modifications. Briefly, 5 to 6 superior mesenteric ganglion were removed from each experimental group, homogenized in 2 ml lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl - pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, Triton X100 1%, deoxycholate 1%, SDS 0.01%, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 mmol/L sodium orthovanadate - pH 10.0, 1 mmol/L sodium pyrophosphate, 25 mmol/L fluoride sodium, and 1 mmol/L EDTA - pH 8.0, at 4°C). Homogenates of 30 µg protein were electrophoretically separated on 7.5% SDS-polyacrylamide gel and then transferred to polyvinyl difluoride membranes overnight. The nonspecific background was minimized by incubating the membranes for one hour with 5% non-fat powdered milk, Tris-buffer (10 mmol/L, pH 7.5), NaCl (100 mmol/L) and Tween20 (0.1 %). Next, the membranes were incubated with mouse polyclonal antibody for anti-nNOS (1/200) (Santa Cruz – Biotechnology, Santa Cruz, USA). The bands were detected using a chemoluminescence system (SuperSignal West pico Chemoluminescent substrate – Pierce, USA) and subjected to autoradiography (Kodak Biomax MS-2, USA). Signals on the immunoblot were quantified by densitometry using a ImageJ NIH computer program and are reported in arbitrary units [19]. The same membrane was used to determine anti- α_1 -tubulin (1/4000) (Sigma Aldrich Company, USA) expression, and the latter signal was used to correct nNOS expression in each sample.

Data Analysis

Results are expressed as median \pm SEM. Frequencies that elicited 50% of the maximal response (F_{50}) are reported as medians with their respective 95% confidence limits (95% CIs). The F_{50} and maximal effect (E_{max}) values were calculated by regression analysis from the complete frequency-response curves using the GraphPad Inplot (version 4.0) and were analyzed by the paired non-parametric Wilcoxon t-test or the unpaired non-parametric Mann-Whitney t-test as appropriate. Arterial blood pressure, weight, basal perfusion pressure of the mesenteric arterial bed, number of NADPH-positive cells, and Western Blot measurements were compared by non-parametric ANOVA (Kruskall-Wallis test). If differences were observed, the data were compared using Dunn correction. Differences were considered significant when $P>0.05$.

Results

Tail cuff blood pressure was elevated in Y-SHR compared with Y-WR (132 ± 1 , $n=25$ versus 116 ± 2 mmHg, $n=24$; $P<0.001$, respectively). In both rat strains blood pressure significantly increased with aging, with higher levels in A-SHR (183 ± 1 , $n=22$ versus 127 ± 3 mmHg, $n=20$; $P<0.01$ and $P<0.001$ compared with age-matched rats, WR versus SHR, respectively). The basal perfusion pressure of isolated mesenteric arteries was higher in A-SHR (27 ± 1 , $n=7$ versus 16 ± 0.4 , $n=6$ in A-WR, 15 ± 0.4 , $n=7$ in Y-SHR and 13 ± 1 mm Hg, $n=10$ in Y-WR; $P<0.01$) and did not change when SMTC was added to the Krebs solution. PNS (7 to 64 Hz) elicited frequency-dependent vasoconstrictor responses of the mesenteric beds isolated from all groups (Figure. 1). In both SHR groups, PNS produced higher responses, as noted by significantly higher E_{max} values in comparison with WR (Table 1). The frequency-response curve was shifted to the left in A-SHR, in which a lower frequency stimulus was required to elicit F_{50} (mean $F_{50}=14.3$ Hz [95% CI, 13.8 to 14.9 Hz], $n=6$) than in Y-SHR (18.7 Hz [95% CI, 15.4 to 22.0 Hz], $n=7$; $P<0.05$). In WR, F_{50} was the same when Y-WR were compared with A-WR, but the maximal vasoconstrictor response was significantly higher in the aged group (mean $E_{max} = 106.1$ mmHg [95%CI, 91.1 to 125.5 mmHg versus 78.2 mmHg [95% CI, 70.2 to 86.2 mmHg]; $P<0.05$).

The effect of perfusion with 20 μ M SMTC on the sympathetic vasoconstriction elicited by PNS is shown in Figure 2. In Y-WR, the inhibition of nNOS did not produce any effect on the vasoconstrictor response induced by PNS (7-64 Hz, Figure 2A). However, there was a discrete but significant increase in the sympathetic vasoconstrictor response after nNOS inhibition in A-WR (Figure 2B), with a reduction of F_{50} after SMTC perfusion (mean $F_{50}=14.8$ Hz [95%CI, 12.8 to 16.7 Hz] versus 18.8 Hz [95%CI, 14.4 to 22.1), $n=7$, $P<0.05$). In contrast, the effect of nNOS inhibition in SHR was only observed in Y-SHR (Figure. 2C) and was blunted in A-SHR (Figure 2D). In Y-SHR, the effect of nNOS inhibition was similar to that observed in A-WR, with a significant reduction of F_{50} after perfusion with SMTC (mean $F_{50} 15.3$ Hz [95%IC, 13.1 to 17.7] versus 18.7 [95%IC, 15.4 to 22.0], $n=7$, $P<0.05$).

In superior mesenteric ganglion, $\approx 50\%$ of the postganglionic neurons were surrounded by a very dense pericellular network of NADPH-diaphorase containing terminals, as described [6]. The number of neurons surrounded by NADPH-positive fibers was significantly ($P<0.001$) diminished in the superior mesenteric ganglion of Y-SHR compared with Y-WR (0.6 ± 0.2 , $n=8$ versus 2.8 ± 0.4 cells/ $10^3 \mu\text{m}^2$, $n=4$, Figure 3). The number of NADPH-positive fibers did not change with aging, keeping the same pattern as observed in young rats (data not shown). nNOS protein expression was detected in homogenates from fresh rat superior mesenteric ganglia (Figure 4). At 4 weeks of age, nNOS protein was expressed with the same pattern in SHR and WR. However, a marked decrease in nNOS expression was observed in A-SHR and A-WR. In contrast with data observed in young rats, there was a significant decrease ($P<0.05$) in nNOS protein abundance in A-SHR compared with A-WR.

Discussion

The present data demonstrate for the first time that the modulation of the sympathetic response by NO is related to the aging process and to the phase of development of arterial hypertension. The adrenergic response was higher in SHR compared to normotensive rats both during the pre-hypertensive phase and the established hypertension phase in the SHR model. These findings are comparable to previously published data [12] and confirm the hyperadrenergic state observed in SHR. Neuronal NO modulation of the peripheral adrenergic control of vascular tonus *in vitro* has been mainly studied after removal of the vascular endothelium. This approach does not eliminate the possible release of NO through the inducible NOS isoform expressed in the vascular wall. In the present study we used perfusion with a selective nNOS inhibitor (SMTC) at a dose that did not affect eNOS function. In addition, we used the mesenteric arterial bed, a preparation abundantly innervated by adrenergic nerve endings and rich in resistance vessels [20]. The present data show that the participation of nNOS in the modulation of the adrenergic response is relevant in older normotensive rats and appears to function as a compensatory mechanism for the increased adrenergic response observed in this situation. Supporting this view, we observed a correlation between adrenergic response and nitrenergic modulation with the increase in arterial

blood pressure occurring with aging in normotensive animals. It is interesting to note that in younger animals there was no effect of nNOS inhibition on the sympathetic vasoconstrictor response even though nNOS was present in the superior mesenteric ganglion, as could be noted by NADPH-diaphorase and Western blot. This phenomenon, previously observed in Wistar Kyoto rats [21], has been explained on the basis of the control of post-translational nNOS activity [22,23]. In the SHR, the observed effect of nNOS blockade presented in pre-hypertensive phase could suggest a premature activation of nNOS. In parallel, nNOS expression during this period is similar to normotensive animals although the smaller number of neurons surrounded by NADPH-positive fibers suggests that the relative expression of nNOS is increased. Taken together, our data strongly suggests that the smaller number of NADPH-positive neurons observed in Y-SHR leads to greater expression and activation of nNOS. This phenomenon may be related with the increase adrenergic response and with the development of arterial hypertension in the SHR model. These data agree with previously published results regarding the immunolocalization of nNOS in the central nervous system and in the intermediolateral region of the spinal cord, an area corresponding to the location of preganglionic sympathetic neurons [24], and extend these findings to the region of post-ganglionic sympathetic neurons in SHR. In the phase of sustained hypertension, we observed a reduced nNOS expression and the disappearance of the inhibitory modulation of sympathetic response by NO. These data are in contrast to those reported by Ferrer et al [12,25] who compared the response of nNOS inhibition and the generation of superoxide radicals in the mesenteric artery of SHR, observing an increase in NO release in this model. This apparent contradiction may be explained by the age at which the animals were studied (16 vs 24 weeks), the preparation used (mesenteric artery vs mesenteric bed), the sex of the animals (females vs males), and the control group used for comparison (WKY vs Wistar rats). Another possibility, which was not explored in our experiment, is that the increased nNOS expression and activity observed in the pre-hypertensive phase may be followed by generation of superoxide, as already observed by Ferrer et al [12]. The increase of free-radical formation could damage the nitrergic fibers, as already observed by Celtek et al [26] in diabetic animals, leading to a nNOS dysfunction observed in aged animals.

In conclusion, these results show an augmented sympathetic response to PNS, counteracted by neuronal NO in the mesenteric bed of pre-hypertensive SHR. In addition, this response pattern was also observed with aging in WR. Our data showed a blunted effect of nNOS on the modulation of the sympathetic response in the sustained phase of hypertension in SHR, suggesting a role of nNOS in the development and maintenance of hypertension in this model.

REFERENCES

1. Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142
2. Krukoff, T.L. (1998) Central regulation of autonomic function: no brakes? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **25**, 474-478
3. Wakefield, I.D., March, E.J., Kemp, P.A., Valentin, J.P., Bennett, T., Gardiner, S.M. (2003) Comparative regional haemodynamic effects of the nitric oxide synthase inhibitors, s-methyl-L-thiocitrulline and L-NAME, in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 1235-1243
4. Vials, A.J., Crowe, R., Burnstock, G. (1997) A neuromodulatory role for neuronal nitric oxide in the rabbit renal artery. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 213-220
5. Bredt, D.S., Hwang, P.M., Snyder, S.H. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide. *Nature* **347**, 768-770
6. Anderson, C.R., Edwards, S.L., Furness, J.B., Bredt, D.S., Snyder, S.H. (1993) The distribution of nitric oxide synthase-containing autonomic preganglionic terminals in the rat. *Brain Res.* **614**, 78-85
7. Tang, F.R., Tan, C.K., Ling, E.A. (1995) A comparative study of NADPH-diaphorase in the sympathetic preganglionic neurons of the upper thoracic cord between spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. *Brain Res.* **691**, 153-159

8. Kong, J.G., Taylor, D.A., Fleming, W.W. (1991) Mesenteric vascular responses of young spontaneously hypertensive rats. *J. Exp. Pharmacol. Ther.* **258**, 13-17
9. Nilsson, H., Folkow, B. (1982) Vasoconstrictor nerve influence on isolated mesenteric resistance vessels from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol. Scand.* **116**, 205-208
10. Coelho, E.B., Ballejo, G., Salgado, M.C.O. (1997) Nitric oxide blunts sympathetic response of pregnant normotensive and hypertensive rat arteries. *Hypertension* **30**, 587-588
11. Rabelo, F.A.W., Russo, E.M., Salgado, M.C.O., Coelho, E.B. (2001) Nonendothelial NO blunts sympathetic response of normotensive rats but not of SHR. *Hypertension* **38** (part 2), 565-568
12. Ferrer, M., Sánchez, M., Minives, N., Salaices, M., Balfagon, G. (2003) Aging increases neuronal nitric oxide release and superoxide anion generation in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *J. Vasc. Res.* **40**, 509-519
13. Félétou, M. and Vanhoutte, P.M. (2006) Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H985-H1002
14. Dickhout, J.G., Lee, R.M. (2000) Increased medial smooth muscle cell length is responsible for vascular hypertrophy in young hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H2085-94
15. Shirasaki, Y., Kolm, P., Nickols, G.A., Lee, T.I.F. (1988) Endothelial regulation of cyclic GMP and vascular responses in hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**, 53-58
16. Carvalho Leone, A.F., Coelho, E.B. (2004) Effects of prostanoids on phenylephrine-induced contractions in the mesenteric vascular bed of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Life Sci.* **76**, 239-47

17. Kawaski, H., Takasaki, K., Saito, A., Goto, K. (1988) Calcitonin-gene related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature (London)* **335**, 164-167
18. Kim, S., Izumi, Y., Yano, M., Hamagushi, A., Miura, K., Yamanaka, S., Miyazaki, H., Iwao, H. (1998) Angiotensin blockade inhibits activation of mitogen-activated protein kinases in rat balloon-injured artery. *Circulation* **97**, 1731
19. Volpini, R.A., Balbi, A.P., Costa, R.S., Coimbra, T.M. (2006) Increased expression of p38 mitogen-activated protein kinase is related to the acute renal lesions induced by gentamicin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **39**, 817-23
20. Marín, J., Balfagón, G. (1998) Effect of clenbuterol on non-endothelial nitric oxide release in rat mesenteric arteries and involvement of β -adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **124**, 473-478
21. Marín, J., Ferrer, M., Balfagón, G. (2000) Role of protein kinase C in electrical-stimulation-induced neuronal nitric oxide release in mesenteric arteries from hypertensive rats. *Clin. Sci.* **99**, 277-283
22. Song, T., Hatano, N., Horii, M., Tokumitsu, H., Yamaguchi, F., Tokuda, M. (2004) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation. *Febs Lett.* **570**, 133-137
23. Hayashi, Y., Nishio, M., Naito, Y., Yokokura, H., Nimura, Y., Hidaka, H. (1999) Regulation of nitric oxide synthase by calmodulin kinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 20597-20602
24. Powers-Martin, K., Mckitric, D.J., Arnolda, L.F., Phillips, D.J. (2006) Distinct subpopulations of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) containing sympathetic preganglionic neurons in spontaneously hypertensive and wistar-kyoto rats. *J. Comp. Neurol.* **497**, 566-574

25. Ferrer, M., Salaires, M., Balfagon, G. (2004) Endogenous prostacilin increases neuronal nitric oxide release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **506**, 151-156
26. Cellek, S., Rodrigo, J., Lobos, E., Fernandez, P., Serrano, J., Moncada, S. (1999) Selective nitrenergic neurodegeneration in diabetes mellitus - a nitric oxide-dependent phenomenon. *Br. J. Pharmacol.* **128**(8), 1804-1812

Table 1: Values of frequencies that elicited 50% of the maximal response (F_{50}) and maximal effect (E_{max}) for frequency-response curves (7-64Hz) of mesenteric arterial bed isolated from young and adult Wistar (Y-WR; A-WR) and young and adult SHR (Y-SHR; A-SHR)

GROUP	F_{50}	E_{max}
Y-WR	16,2	78,2
(10)	(14,1 – 18,2)	(70,2 – 86,2)
Y-SHR	18,7	183,1*
(7)	(15,4 – 22,0)	(153,3 – 212,9)
A-WR	18,8	106,1 [†]
(6)	(14,4 – 22,1)	(91,1 – 125,5)
A-SHR	14,3 [†]	171,1 [†]
(7)	(13,8 – 14,9)	(165,1 – 177,2)

Values expressed as median with their respective 95% confidence limits (95%IC). The number of animals is given in parenthesis. * $P < 0.001$ Y-WR versus Y-SHR (E_{max}); [†] $P < 0.05$ A-WR versus A-SHR (E_{max}); Y-WR versus A-WR (E_{max}) and A-SHR versus Y-SHR (F_{50}).

Figure Legends

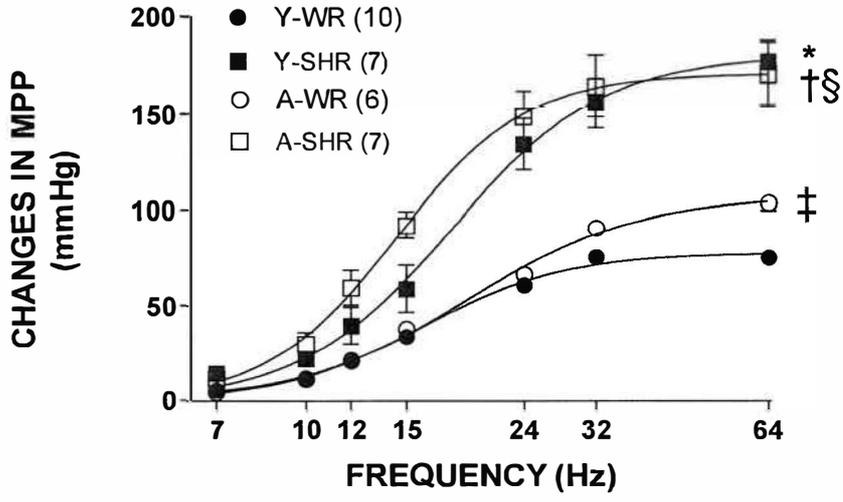
Figure 1. Sympathetic vasoconstrictor response induced by PNS in isolated mesenteric bed of young Wistar rats (Y-WR) (●); adult Wistar rats (A-WR) (○); young SHR (Y-SHR) (■); and adult SHR (A-SHR) (□). Data are presented as mean \pm SEM. The number of animals is given in parenthesis. * $P < 0.001$ Y-WR versus Y-SHR (E_{max}); † $P < 0.05$ A-WR versus A-SHR (E_{max}); ‡ $P < 0.05$ Y-WR versus A-WR (E_{max}); § $P < 0.05$ A-SHR versus Y-SHR (F₅₀), Mann-Whitney test. MPP = mean perfusion pressure (mmHg).

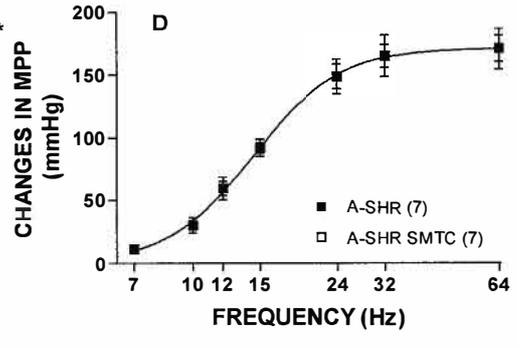
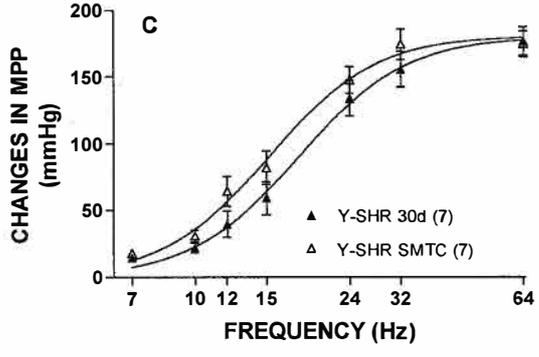
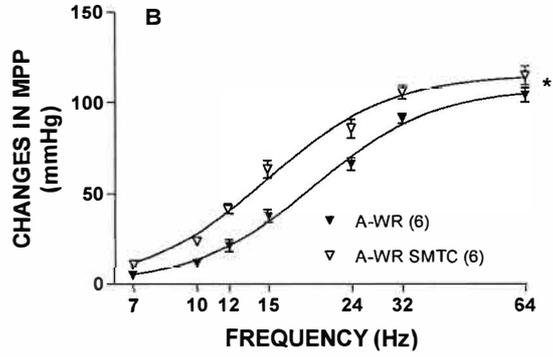
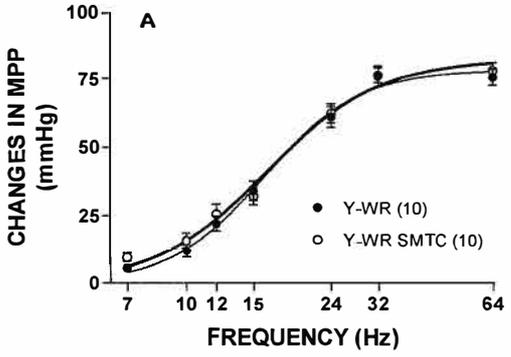
Figure 2. Effect of perfusion with 20 μ M S-methyl-thiocitrulline (SMTC) on the sympathetic vasoconstrictor response induced by PNS (7-64 Hz) in isolated mesenteric bed of young Wistar rats (Y-WR) (A); adult Wistar rats (A-WR) (B); young (Y-SHR) (C); and adult SHR (A-SHR) (D). Data are presented as mean \pm SEM. The number of animals is given in parenthesis. * $P < 0.05$ Y-SHR versus Y-SHR with SMTC (F₅₀) and A-WR versus A-WR with SMTC (F₅₀), Wilcoxon test. MPP indicates mesenteric perfusion pressure (mmHg).

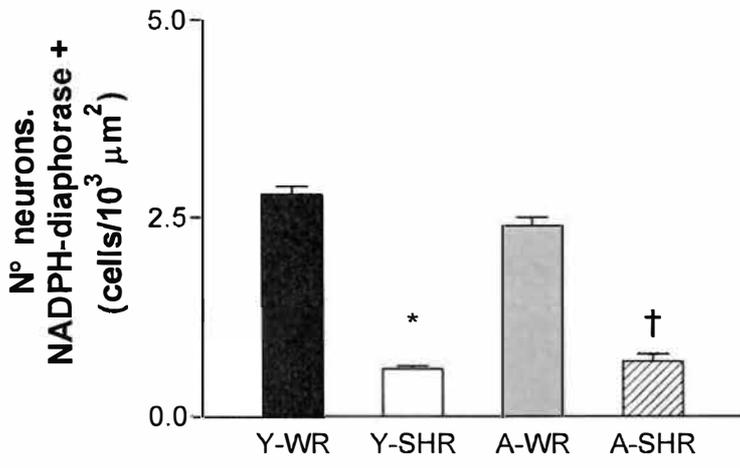
Figure 3. Number of positive NADPH-diaphorase neurons in mesenteric ganglion of young Wistar (Y-WR), adult Wistar (A-WR), young SHR (Y-SHR) and adult SHR (A-SHR) animals. The bars represent the means \pm SEM (* $P < 0.001$, Y-SHR versus Y-WR; † $P < 0.05$, A-SHR versus A-WR, Kruskal-Wallis test with Dunn correction).

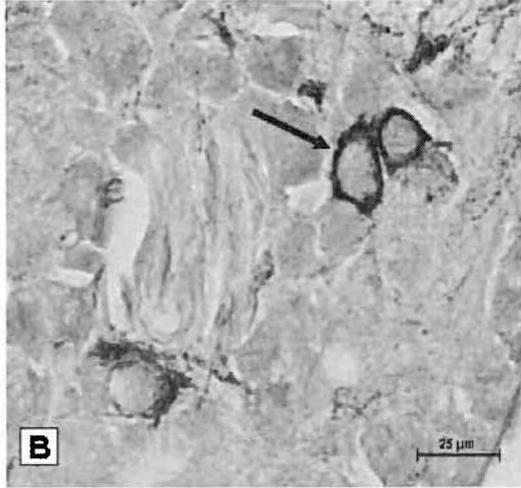
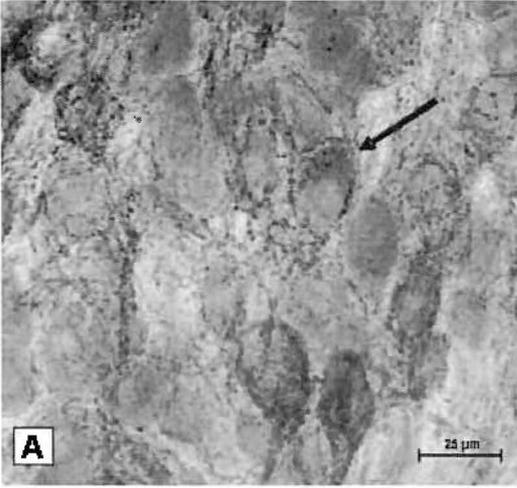
Figure 4. (A) Protein expression of neuronal nitric oxide synthase with respective α_1 -tubulin in superior mesenteric ganglia from young and adult WR (Y-WR and A-WR) and SHR (Y-SHR and A-SHR). **(B)** Data are reported as mean \pm SEM; * $P < 0.01$ (A-SHR and A-WR versus respective young controls); † $P < 0.05$ (A-SHR versus A-WR). Kruskal-Wallis test with Dunn correction.

Figure 5. Light microscopy images showing positive NADPH-diaphorase neurons (arrows) in mesenteric ganglion from (A) Y-WR and (B) Y-SHR. Note that the staining for nNOS (NADPH-diaphorase) is more intense in Y-WR than in Y-SHR. Scale bar = 25 μ m.

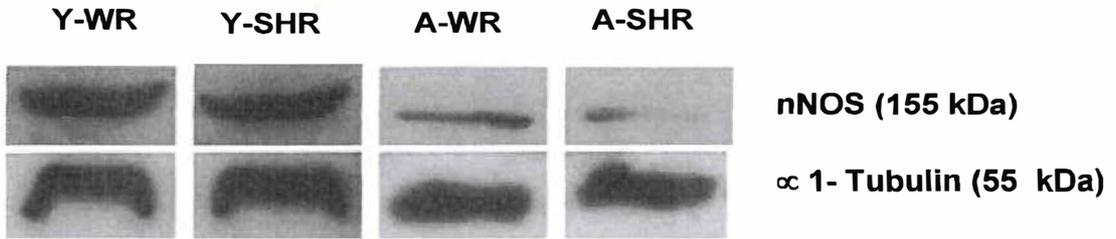








(A)



(B)

