

**EFEITOS DA TERAPIA GÊNICA COM A ÓXIDO NÍTRICO
SINTASE ENDOTELIAL EM CAMUNDONGOS COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C**

Ágata Lages Gava

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória – ES, 2005.**

ÁGATA LAGES GAVA

**EFEITOS DA TERAPIA GÊNICA COM A ÓXIDO NÍTRICO
SINTASE ENDOTELIAL EM CAMUNDONGOS COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^a Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles

Co-orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Vitória

2005

ÁGATA LAGES GAVA

**EFEITOS DA TERAPIA GÊNICA COM A ÓXIDO NÍTRICO
SINTASE ENDOTELIAL EM CAMUNDONGOS COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof Dr. Valdo José Dias da Silva
Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro – Membro Externo

Prof. Dr. Antônio de Melo Cabral
Universidade Federal do Espírito Santo – Membro Interno

Prof^a Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles
Universidade Federal do Espírito Santo - Orientadora

Vitória, _____ de _____ de _____.

MENSAGEM

É impressionante como a vida e a ciência são tão parecidas. À primeira vista, podemos pensar que sejam antagônicas, pois a vida é feita de sentimentos, emoções, vivências, enquanto que a ciência é feita de pensamentos, lógica e razão. Como pode coisas aparentemente opostas serem parecidas? Pois tento explicar-lhes:

Na vida temos objetivos. Planejamos o que queremos ser, o que vamos fazer e como chegaremos lá. Nossos objetivos são determinados através do nosso passado, da educação que recebemos, das emoções que experimentamos. E assim, esperamos encontrar no futuro aquilo que planejamos. Mas de repente tudo muda. Novos fatos surgem e os planos vão por água abaixo. Decepção. E pensamos: o que vou fazer agora? E é aí que surgem pessoas que estavam ali o tempo todo e você nem imaginava o quanto de bom elas poderiam te trazer. E estas pessoas te ajudam a reconstruir um novo objetivo (ou talvez até o mesmo, só que de forma diferente) e uma nova maneira de chegar lá. E então o entusiasmo renasce, e você experimenta novas emoções.

Assim também é a ciência. Traçamos um objetivo, que é construído através de conhecimentos prévios. Pensamos e determinamos como atingiremos este objetivo. E assim como na vida, às vezes as coisas não saem como você planeja. Decepção. Frente aos resultados inesperados, pensamos: o que vou fazer agora? E aí, quando analisamos cuidadosamente esses resultados, surgem novos fatos que você não buscava, mas que lhe ajudam a reconstruir a sua pesquisa. Eles também estavam ali o tempo todo, só que você não os via. Novamente o entusiasmo renasce e você experimenta novas emoções.

Vamos então racionalizar e vivenciar vida e ciência. Ambas são compostas de razão e emoção, cada qual com a sua dose perfeita.

À minha família que eu amo
tanto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Silvana. Minha orientadora, amiga e mãe. Elogiando e puxando orelha quando merecido. Sempre me questionando e desta forma me ensinando como um pesquisador deve ser. Dedicção inigualável, exemplo do que almejo um dia ser. Muito obrigada pela ajuda.

Ao professor Vasquez, uma pessoa que abriga tanto saber, obrigado por passá-lo adiante. Através de seus questionamentos sempre me fazia pensar sobre como poderia melhorar, como pesquisadora e como pessoa. Obrigada pela paciência, pelas respostas, pelas perguntas, pela ajuda.

À minha amiga Veronica. Minha orientadora de coração, não está no papel, mas fez muito por mim. A pessoa que estava lá quando tudo dava errado e me apoiava nestes momentos. Você é uma pessoa muito especial em minha vida, espero que possamos sempre trabalhar juntas.

Ao professor Cabral, por todo apoio incondicional. Sempre opinando e transformando este trabalho em algo cada vez melhor.

À pequena Marina, que mesmo tão novinha e sem saber, trouxe tantas coisas boas ao nosso laboratório.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me presenteado com uma vida tão boa e justa.

Aos meus pais, Francisco e Elizabeth, exemplos de família para mim. Vocês me transformaram na pessoa que sou hoje, e este momento de alegria é também de vocês.

À minha mana Lara, que não sabe o quanto a amo.

Ao meu mano Eugênio, que participou tanto da minha vida ultimamente. Meu companheiro dos rocks, confidente e amigo.

A todas as amigas que amo tanto: Alessandra, Débora, Fabiana, Leandra, Veronica, Michely, Bárbara, Juliana, Andresa, Rachel, Rita, Flavia, Aurélia, Catarine, Izabelle.

Aos amigos do Laboratório de Eletromecânica Cardíaca, minha segunda casa no PPGCF. Muito obrigada por toda ajuda prestada.

Aos amigos do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular: Veronica, que me apoiou nos momentos de cansaço; Débora, que me divertiu tanto; Michely, tão especial pra mim, coração de ouro, obrigado pelos papos e ajuda; Breno, que não sabe o quanto me ajudou simplesmente estando do meu lado; Thiago, e suas incomparáveis imitações; Robéria, pela companhia; Maine e Camille, sempre dispostas a ajudar.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1

Sistema do barorreflexo arterial em condições de pressão arterial normal.....25

Figura 2

Sistema do barorreflexo arterial em resposta a aumentos na pressão arterial.....26

Figura 3

Sistema do barorreflexo arterial em resposta a diminuições na pressão arterial.....27

Figura 4

Níveis dos componentes do sistema renina angiotensina e efeitos dependentes de angiotensina II ativados pela estenose unilateral renal.....34

Figura 5

Foto de um camundongo C57.....44

Figura 6

Foto do clipe de aço inox utilizado em nosso estudo.....46

Figura 7

Foto de um camundongo C57 logo após a cirurgia de canulação.....47

Figura 8

Fotos ilustrativas do procedimento da injeção sistêmica do adenovírus através da veia caudal.....49

Figura 9

Foto do registro de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) nos animais acordados, 24 horas após a cirurgia de canulação.....50

Figura 10

Valores basais de pressão arterial média (PAM) nos grupos Sham glicerol/ β gal, 2R1C β gal, Sham eNOS e 2R1C eNOS55

Figura 11

Valores basais de frequência cardíaca (FC) nos grupos Sham glicerol/ β gal, 2R1C β gal, Sham eNOS e 2R1C eNOS.....56

Figura 12

Relação peso cardíaco/peso corporal nos grupos Sham glicerol/ β gal, 2R1C β gal, Sham eNOS e 2R1C eNOS.....57

Figura 13
Relação peso do rim esquerdo/peso corporal nos grupos Sham glicerol/ β gal, 2R1C β gal, sham eNOS e 2R1C eNOS58

Figura 14
Relação peso do rim direito/peso corporal nos grupos Sham glicerol/ β gal, 2R1C β gal, sham eNOS e 2R1C eNOS.....59

Figura 15
Variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por fenilefrina e nitroprussiato de sódio nos grupos Sham glicerol/ β gal e 2R1C β gal.....60

Figura 16
Média dos ganhos frente às injeções de fenilefrina nos grupos Sham glicerol/ β gal e 2R1C β gal.....61

Figura 17
Média dos ganhos frente às injeções de nitroprussiato de sódio nos grupos Sham glicerol/ β gal e 2R1C β gal.....62

Figura 18
Registros típicos das respostas reflexas frente às variações de pressão arterial induzidas por fenilefrina.....63

Figura 19

Registros típicos das respostas reflexas frente às variações de pressão arterial induzidas por nitroprussiato de sódio.....64

Figura 20

Variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por fenilefrina e nitroprussiato de sódio nos grupos 2R1C β gal e 2R1C eNOS65

Figura 21

Média dos ganhos frente às injeções de fenilefrina nos grupos 2R1C β gal e 2R1C eNOS.....66

Figura 22

Média dos ganhos frente às injeções de nitroprussiato de sódio nos grupos 2R1C β gal e 2R1C eNOS.....67

Figura 23

Registros típicos das variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por fenilefrina nos grupos 2R1C β gal e 2R1C eNOS.....68

Figura 24

Registros típicos das variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por nitroprussiato de sódio nos grupos 2R1C β gal e 2R1C eNOS.....69

Figura 25

Variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por fenilefrina e nitroprussiato de sódio nos grupos Sham eNOS e 2R1C eNOS70

Figura 26

Média dos ganhos frente às injeções de fenilefrina nos grupos sham eNOS e 2R1C eNOS71

Figura 27

Média dos ganhos frente às injeções de nitroprussiato de sódio nos grupos sham eNOS e 2R1C eNOS.....72

Figura 28

Variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por fenilefrina nos grupos sham eNOS e 2R1C eNOS.....73

Figura 29

Variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por nitroprussiato de sódio nos grupos 2R1C β gal e 2R1C eNOS.....74

Figura 30

Fotomicrografias da imunohistoquímica do rim direito do animal sham que recebeu o adenovírus que expressa a β -galactosidase e do animal sham que recebeu o vírus que expressa a eNOS75

Figura 31

Fotomicrografias da imunohistoquímica do rim esquerdo do animal sham que recebeu o adenovírus que expressa a β -galactosidase e do animal sham que recebeu o vírus que expressa a eNOS.....76

Figura 32

Fotomicrografias da imunohistoquímica do fígado do animal sham que recebeu o adenovírus que expressa a β -galactosidase e do animal que sham recebeu o vírus que expressa a eNOS76

Figura 33

Fotomicrografias da imunohistoquímica do arco aórtico do animal que recebeu o adenovírus que expressa a β -galactosidase e do animal que recebeu o vírus que expressa a eNOS77

Figura 34

Fotomicrografias da imunohistoquímica do ventrículo esquerdo do animal sham que recebeu o adenovírus que expressa a β -galactosidase e do animal sham que recebeu o vírus que expressa a eNOS77

Tabela 1

Vantagens e desvantagens dos vetores não virais.....38

Tabela 2

Vetores virais de DNA: vantagens e desvantagens.....39

Tabela 3

Vetores virais de RNA: vantagens e desvantagens.....40

LISTA DE ABREVIATURAS

- μg : micrograma
- μl : microlitro
- $^{\circ}\text{C}$: grau Celsius
- β gal: β galactosidase
- AdenOS: adenovírus que expressa a eNOS
- Ad β gal: adenovírus que expressa a β -galactosidase
- ANG II: angiotensina II
- AMP_c : adenosina mono fosfato cíclica
- bpm: batimentos por minuto
- CVLM: bulbo ventrolateral caudal
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- DMX: núcleo dorsal motor do vago
- ECA: enzima conversora de angiotensina
- EPM: erro padrão da média
- FC: frequência cardíaca
- g: grama
- GABA: ácido gama amino butírico
- GMP_c : guanosina mono fosfato cíclica
- i.m.: intramuscular
- IML: coluna intermédio lateral
- i.v.: intravenosa

- Kb: quilobases
- Kg: quilograma
- L-NAME: L- nitroarginina metil éster
- mg: miligrama
- mmHg: milímetros de mercúrio
- NA: núcleo ambíguo
- Na⁺ : íon sódio
- NaCl: cloreto de sódio
- NO: óxido nítrico
- NTS: núcleo do trato solitário
- PAM: pressão arterial média
- PAP: pressão arterial pulsátil
- RNA: ácido ribonucléico
- RVLM: bulbo ventrolateral rostral

SUMÁRIO

RESUMO	19
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Mecanismos de Regulação da Pressão Arterial	24
1.1.1) Regulação Neural: Barorreflexo Arterial	24
1.1.2) Regulação Local: Óxido Nítrico.....	28
1.1.3) Regulação Humoral: Sistema Renina Angiotensina.....	29
1.2 Efeitos da Angiotensina II e Óxido Nítrico sobre o Barorreflexo Arterial.....	30
1.3 Hipertensão Arterial.....	33
1.4 Interações entre o Sistema Renina Angiotensina e o Óxido Nítrico.....	35
1.5 Terapia Gênica.....	36
1.6 Vetores.....	37
1.7 Terapia Gênica e Sistema Cardiovascular.....	41
2. OBJETIVOS	41
2.1 Gerais.....	42
2.2 Específicos.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Animais Experimentais.....	44
3.2 Construção e Obtenção do Adenovírus.....	45
3.3 Procedimentos Cirúrgicos.....	45
3.3.1) Cirurgia para o Desenvolvimento da Hipertensão Renovascular 2 rins-1 clipe de Goldblatt.....	45
3.3.2) Canulação.....	46

3.4) Protocolo Experimental.....	47
3.4.1) Grupos Experimentais.....	47
3.4.2) Administração Sistêmica do Adenovírus ou Veículo.....	48
3.4.3) Teste do Barorreflexo Arterial em Camundongos Acordados.....	49
3.4.4) Medida de Hipertrofia.....	51
3.4.5) Imunohistoquímica.....	51
3.5 Análise Estatística.....	53
4. RESULTADOS.....	53
4.1 Valores Basais de Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca.....	54
4.2 Hipertrofia Cardíaca e Renal	56
4.3 Barorreflexo Arterial.....	60
4.4 Análise da Expressão Gênica da eNOS.....	75
5. DISCUSSÃO.....	78
6. CONCLUSÕES.....	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado que a terapia gênica é uma abordagem eficaz para o tratamento e prevenção de diversos modelos de hipertensão arterial (HÁ). Portanto o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da terapia gênica com a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) sobre o desenvolvimento da hipertensão renovascular dois rins-um clipe (2R1C) e barorreflexo (BR) em camundongos.

Camundongos C57 machos, foram submetidos à cirurgia para colocação do clipe de aço inox (0,12 mm) na artéria renal esquerda ou cirurgia fictícia (sham-SH). Neste mesmo dia, os animais receberam uma injeção endovenosa do adenovírus que expressa a β -galactosidade (β gal), eNOS (10 μ L, 10^{12} pfu/mL) ou glicerol (10 μ L) Após 2 semanas, os animais foram anestesiados e cateteres foram implantados na veia jugular e artéria carótida para injeção de drogas e registros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), respectivamente. O BR foi testado em animais acordados através de injeção *in bolus* de fenilefrina (PHE-48 μ g/Kg) e nitroprussiato de sódio (NPS-24 μ g/Kg) e avaliado através da média dos ganhos das respostas bradicárdicas e taquicárdicas reflexas frente às variações na pressão arterial (5-25 mmHg). Ao fim dos experimentos, coração e rins foram retirados e pesados para análise de hipertrofia.

O grupo 2R1C β gal apresentou uma elevação de PAM ($125 \pm 1^{**}$ mmHg, $^{**}p < 0,01$) quando comparado ao grupo SH glicerol/ β gal (102 ± 4 mmHg). O desenvolvimento da HA foi prevenido no grupo 2R1C eNOS (109 ± 2 mmHg), enquanto que a PAM não apresentou alterações no grupo SH eNOS (110 ± 2 mmHg). Os animais hipertensos apresentaram taquicardia de repouso ($539 \pm 24^*$

bpm, $*p < 0,05$) quando comparados aos animais SH glicerol/ β gal (473 ± 13 bpm). O aumento da FC foi prevenido pela terapia gênica no grupo 2R1C eNOS (464 ± 10 bpm.), sendo que esta terapia não foi capaz de alterar a FC no grupo SH eNOS (482 ± 14 bpm). Os animais 2R1C β gal e 2R1C eNOS apresentaram tendência à hipertrofia cardíaca ($1,24 \pm 0,05$; $1,22 \pm 0,06$ mg/g respectivamente) quando comparados aos animais SH glicerol/ β gal ($1,11 \pm 0,03$ mg/g) e SH eNOS ($1,13 \pm 0,04$ mg/g). A relação peso do rim direito/peso corporal foi maior nos grupos 2R1C β gal ($1,82 \pm 0,08^{**}$ mg/g) e 2R1C eNOS ($1,85 \pm 0,05^{**}$ mg/g; $**p < 0,01$) quando comparados aos grupos controles (SH glicerol/ β gal: $1,50 \pm 0,06$ SH eNOS: $1,48 \pm 0,06$ mg/g). Por outro lado, os animais que receberam o clipe na artéria renal esquerda apresentaram uma atrofia do rim esquerdo (SH glicerol/ β gal: $1,42 \pm 0,05$; 2R1C β gal: $0,61 \pm 0,07^{**}$; SH eNOS: $1,38 \pm 0,05$; 2R1C eNOS: $0,76 \pm 0,10^{**}$ mg/g; $**p < 0,01$ vs. grupos SH). A média dos ganhos nas variações de PAM não se mostrou alterada no grupo 2R1C β gal quando comparado ao grupo SH glicerol/ β gal, tanto para as injeções de PHE (SH glicerol/ β gal: $-13 \pm 1,1$; 2R1C β gal: $-14 \pm 1,2$ bpm/mmHg), quanto para as injeções de NPS (SH glicerol/ β gal: $14 \pm 1,1$; 2R1C β gal: $13 \pm 1,0$ bpm/mmHg). Entretanto, nos grupos 2R1C eNOS e SH eNOS os animais apresentaram redução da bradicardia reflexa ($-9,5 \pm 1,3^*$; $-11 \pm 0,9^*$ bpm/mmHg respectivamente, $*p < 0,05$ vs. SH glicerol/ β gal e 2R1C β gal) e aumento da taquicardia reflexa (SH eNOS: $16 \pm 0,9^*$; 2R1C eNOS: $17 \pm 1,2^*$ bpm/mmHg, $*p < 0,05$ vs. SH glicerol/ β gal e 2R1C β gal).

Assim, podemos concluir que a superexpressão da eNOS foi capaz de prevenir o desenvolvimento da HA, entretanto, causou alterações no sistema do BR nos animais submetidos a esta terapia.

ABSTRACT

Several studies have demonstrated that gene therapy is an effective approach to prevention and treatment of arterial hypertension (AH). Therefore, the goal of this study was to evaluate the effects of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene therapy in the development of two kidney-one clip (2K1C) renovascular hypertension and baroreflex (BR) in mice.

C57 male mice received a stainless steel clip (0,12 mm) in the left renal artery or were submitted to a fictitious surgery (sham-SH). In this same day, the animals received an intravenous injection of adenovirus expressing β -galactosidase (β gal), eNOS ($10 \mu\text{L}$, 10^{12} pfu/mL) or glicerol ($10 \mu\text{L}$). After 2 weeks, the animals were anesthetized and catheters were implanted in jugular vein and carotid artery to drug injection and mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) measurements. The baroreflex was tested in conscious animals through *in bolus* injection of phenylephrine (PHE-48 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) and sodium nitroprusside (SNP-24 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) and evaluated through the mean gain to bradycardic and tachycardic reflex responses in arterial pressure variations (5-25 mmHg). At the end of the experiments, the heart and kidneys were removed and weighed to hypertrophy analysis.

2K1C β gal group presented an elevation in MAP ($125 \pm 1^{**}$ mmHg, $^{**}p < 0,01$) when compared to SH glicerol/ β gal group (102 ± 4 mmHg). The development of AH was prevented in 2K1C eNOS group (109 ± 2 mmHg), and MAP did not presented alterations in SH eNOS group (110 ± 2 mmHg). The hypertensive animals presented resting tachycardia ($539 \pm 24^*$ bpm, $^*p < 0,05$) when compared to SH glicerol/ β gal animals (473 ± 13 bpm). The increase in HR was prevented by gene transfer in 2K1C eNOS group (464 ± 10 bpm.). eNOS gene therapy did not cause

alterations of resting HR in SH eNOS group (482 ± 14 bpm). The 2K1C β gal and 2K1C eNOS animals presented a tendency to cardiac hypertrophy ($1,24 \pm 0,05^*$; $1,22 \pm 0,06^*$ mg/g respectively, $*p < 0,05$) when compared to SH glicerol/ β gal animals ($1,11 \pm 0,03$ mg/g) and SH eNOS ($1,13 \pm 0,04$ mg/g). The right kidney weight/body weight ratio was higher in 2K1C β gal ($1,82 \pm 0,08^{**}$ mg/g) and 2K1C eNOS ($1,85 \pm 0,05^{**}$ mg/g, $**p < 0,01$) when compared to control groups (SH glicerol/ β gal: $1,50 \pm 0,06$; SH eNOS: $1,48 \pm 0,06$ mg/g). On the other hand, the animals that received the clip in the left renal artery presented smaller values of left kidney weight/body weight ratio (SH glicerol/ β gal: $1,42 \pm 0,05$; 2R1C β gal: $0,61 \pm 0,07^{**}$; SH eNOS: $1,38 \pm 0,05$; 2R1C eNOS: $0,76 \pm 0,10^{**}$ mg/g; $**p < 0,01$ vs SH groups). The mean gain was not altered in 2K1C β gal group when compared to SH glicerol/ β gal group, to PHE injections (SH glicerol/ β gal: $-13 \pm 1,1$; 2K1C β gal: $-14 \pm 1,2$ bpm/mmHg), and to SNP injections (SH glicerol/ β gal: $14 \pm 1,1$; 2K1C β gal: $13 \pm 1,0$ bpm/mmHg). However, in 2K1C eNOS and SH eNOS groups, the animals presented decreased reflex bradycardia ($-9,5 \pm 1,3^*$; $-11 \pm 0,9^*$ bpm/mmHg respectively, $*p < 0,05$ vs. SH glicerol/ β gal and 2K1C β gal) and increased reflex tachycardia (SH eNOS: $16 \pm 0,9^*$; 2R1C eNOS: $17 \pm 1,2^*$ bpm/mmHg, $*p < 0,05$ vs. SH glicerol/ β gal and 2K1C β gal).

Therefore, we can conclude that eNOS overexpression was able to prevent the development of renovascular hypertension, however, caused alterations in the BR system in mice.

INTRODUÇÃO

1.1) Mecanismos de Regulação da Pressão Arterial

1.1.1) Regulação Neural: Barorreflexo Arterial

Os barorreceptores são mecanorreceptores localizados no arco aórtico e seio carotídeo, que são locais estratégicos, pois se encontram na saída do coração e entrada do cérebro. A cada batimento cardíaco os barorreceptores são estirados e potenciais de ação são gerados. Este estiramento ativa os canais de Na^+ mecano-sensíveis localizados na membrana neuronal. Com a entrada de sódio, ocorre mudança da voltagem da membrana celular e canais de sódio voltagem dependentes são abertos, e assim, os potenciais de ação são disparados. Estes potenciais de ação são enviados para o núcleo do trato solitário (NTS) via nervo vago e glossofaríngeo onde ocorre a primeira sinapse (Chalmers e Pilowsky, 1991).

O NTS envia projeções para o núcleo ambíguo (NA) e dorsal motor do vago (DMX) e estes quando são ativados geram um aumento da atividade parassimpática para o coração. Simultaneamente, neurônios provenientes do NTS se dirigem para o bulbo ventrolateral caudal (CVLM) o qual envia neurônios inibitórios para o bulbo ventrolateral rostral (RVLM). Este por sua vez, se comunica com os neurônios simpáticos da coluna intermédio lateral (IML) (Reis, 1999). Assim, toda vez que houver inibição do CVLM, o RVLM aumenta a atividade simpática para a coração e vasos.

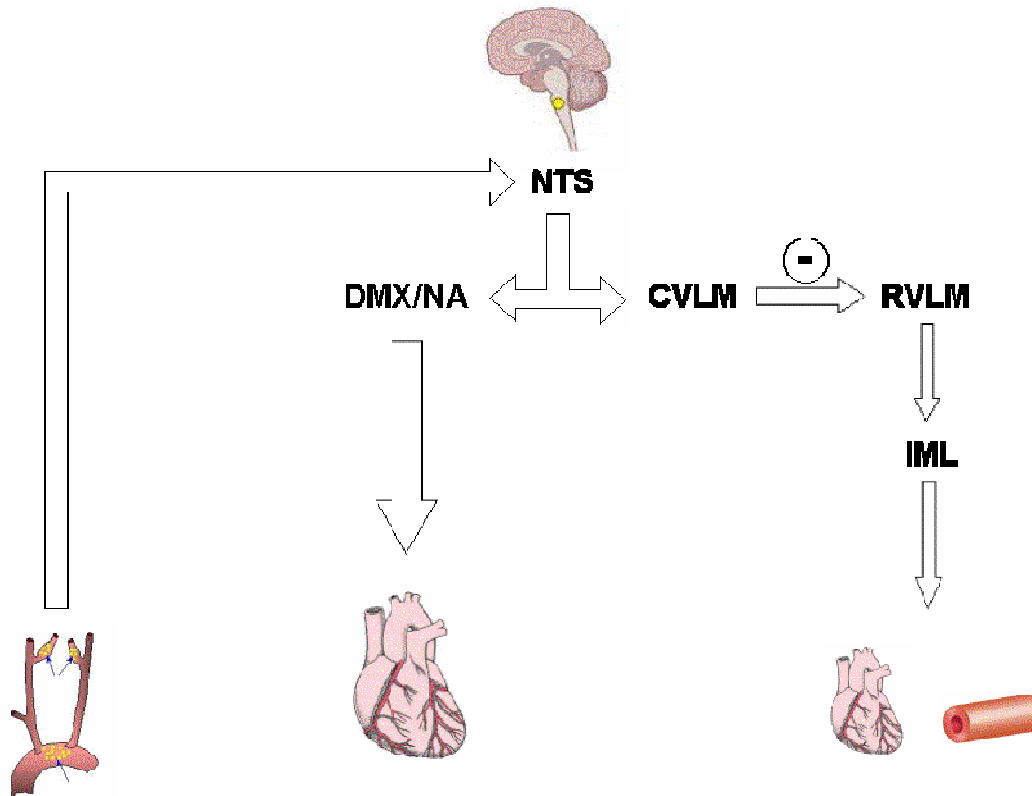


Figura 1: Sistema do barorreflexo arterial em condições de pressão arterial normal. NTS: núcleo do trato solitário; DMX: núcleo dorsal motor do vago; NA: núcleo ambíguo; CVLM: bulbo ventrolateral caudal; RVLM: bulbo ventrolateral rostral; IML: coluna intermédia lateral.

Frente a um aumento da pressão arterial, mais potenciais de ação são enviados para o NTS. Assim, maior é a estimulação sobre o NA e DMX, resultando em aumento da atividade parassimpática para a periferia. Também é maior a estimulação sobre CVLM, fato este que aumenta sua inibição sobre RVLM, gerando então diminuição da atividade simpática para a periferia.

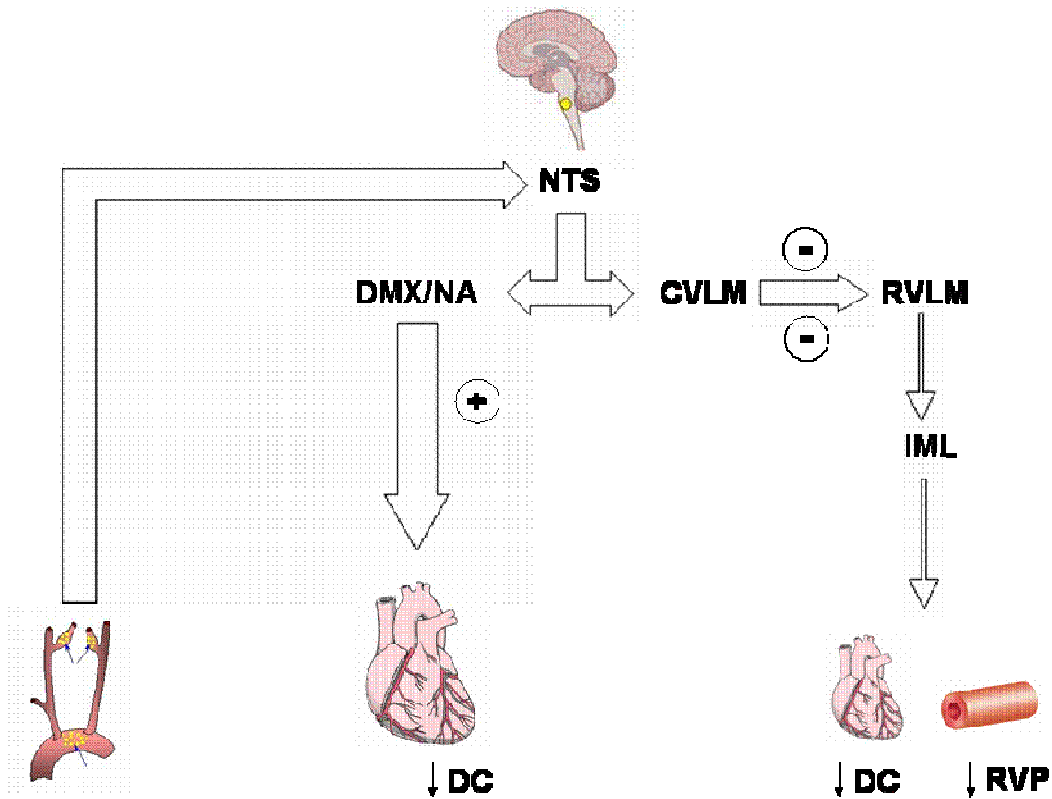


Figura 2: Sistema do barorreflexo arterial em resposta a aumentos na pressão arterial. NTS: núcleo do trato solitário; DMX: núcleo dorsal motor do vago; NA: núcleo ambíguo; CVLM: bulbo ventrolateral caudal; RVLM: bulbo ventrolateral rostral; IML: coluna intermédia lateral; DC: débito cardíaco; RVP: resistência vascular periférica.

Por outro lado, frente a uma diminuição da pressão arterial, um menor número de potenciais de ação são enviados para o NTS, diminuindo a estimulação sobre o NA e DMX, resultando em diminuição da atividade parassimpática para a periferia. Também é menor a estimulação sobre CVLM, e assim, RVLM fica livre para atuar. Ocorre então um aumento da atividade simpática para a periferia. Assim sendo, o barorreflexo constitui um sistema de extrema

importância para homeostasia corporal, pois é o responsável pelo ajuste momento a momento da pressão arterial, mantendo-a em níveis estáveis.

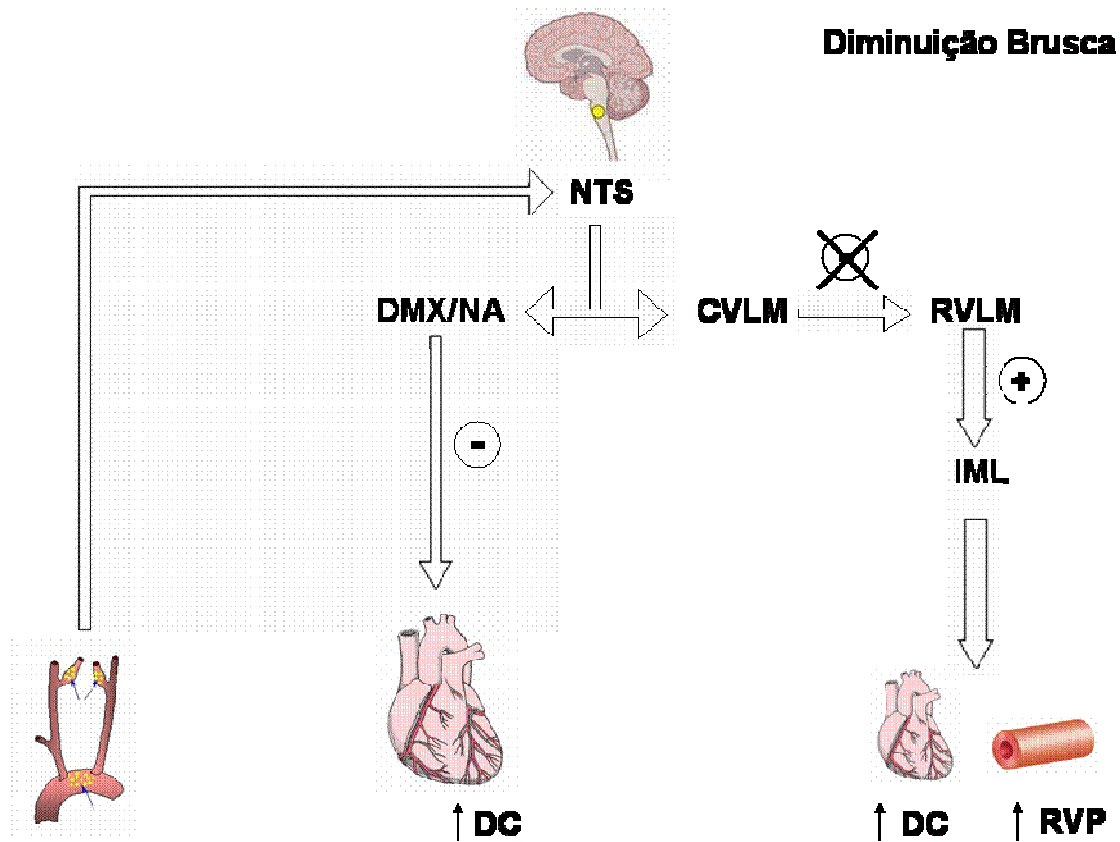


Figura 3: Sistema do barorreflexo arterial em resposta a diminuições na pressão arterial. NTS: núcleo do trato solitário; DMX: núcleo dorsal motor do vago; NA: núcleo ambíguo; CVLM: bulbo ventrolateral caudal; RVLM: bulbo ventrolateral rostral; IML: coluna intermédio lateral, DC: débito cardíaco; RVP: resistência vascular periférica.

1.1.2) Regulação Local: Óxido Nítrico

O endotélio vascular compreende um órgão de regulação local da pressão arterial, produzindo tanto fatores vasoconstritores (angiotensina II, endotelina, tromboxano A_2) quanto fatores vasodilatadores (fator hiperpolarizante derivado do endotélio, prostaciclina e óxido nítrico).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula que possui diversas funções em nosso organismo. Agindo autocrina ou paracrinamente, o NO está envolvido no relaxamento do músculo liso vascular, sinalização neuronal e respostas imunológicas. A deficiência de sua produção está envolvida na formação e manutenção de diversos estados patológicos como aterosclerose, diabetes mellitus e hipertensão. (Sreeharan et al., 1986; Durante et al., 1988; Lockette et al., 1986)

O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina através da ação da enzima NO sintase (NOS), a qual se apresenta em 3 isoformas: NOS neuronal (ou tipo I), NOS induzível (tipo II) ou NOS endotelial (tipo III). Nesta reação estão envolvidos uma série de cofatores como calmodulina, tetrahydrobiopterina, FAD e NADPH.

O papel do óxido nítrico na manutenção da pressão arterial em níveis normais se torna evidente no modelo de hipertensão experimental L-NAME. Neste modelo temos a inibição crônica das três isoformas das NO sintases, e, portanto, não há produção de NO. O resultado é um aumento significativo da pressão arterial (Gardiner et al., 1990).

1.1.3) Regulação Humoral: Sistema Renina Angiotensina

Os sistemas de regulação humoral da circulação são de extrema importância para manutenção da pressão arterial. Dentre eles destacam-se o hormônio antidiurético (ADH), adrenalina, bradicinina, serotonina, histamina e o sistema renina-angiotensina.

O sistema renina angiotensina é composto por uma cascata de reações enzimáticas que culminam com a formação da angiotensina II, peptídeo de maior importância deste sistema. A cascata se inicia com a clivagem do angiotensinogênio através da ação da renina, transformando-o em angiotensina I. A renina é produzida pelas células justaglomerulares e armazenada em grânulos de secreção. Sua liberação ocorre em resposta a 3 estímulos principais associados ou independentes: diminuição da pressão de perfusão renal; diminuição do aporte de sódio para as células da mácula densa e estimulação dos receptores β_1 das eferências nervosas simpáticas renais.

Uma vez liberada, a renina entra na corrente sanguínea e atua sobre o angiotensinogênio, levando à formação do decapeptídeo angiotensina I. Esta, por sua vez, é transformada no octapeptídeo angiotensina II através da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) produzida principalmente pelo endotélio pulmonar. A angiotensina II constitui um peptídeo de grande importância na regulação humoral da circulação, pois exerce diversos efeitos hemodinâmicos diretos e indiretos (Peach, 1977)

Além desta via clássica de formação de angiotensina II (sistema renina angiotensina sistêmico) recentes estudos demonstraram a existência de todos os componentes do sistema em diversos órgãos, como coração, endotélio e

cérebro. Estes sistemas foram então denominados sistemas renina angiotensina teciduais, e estes parecem participar de forma significativa de diversas fisiopatologias cardiovasculares, como insuficiência cardíaca (Schulz e Heusch, 2005), aterosclerose (Mazzolai et al., 2004) e hipertensão arterial (Shariff et al., 2005).

1.2) Efeitos da Angiotensina II e Óxido Nítrico sobre o Barorreflexo Arterial

Tanto a angiotensina II quanto o óxido nítrico podem exercer ação modulatória sobre o barorreflexo.

Diversos estudos já demonstraram os efeitos deletérios da angiotensina II sobre o barorreflexo, sendo que este peptídeo parece modular o barorreflexo de maneira indireta, via aumento da pressão arterial e direta, via angiotensina II sobre o barorreflexo.

Níveis elevados de angiotensina II levam a hipertensão arterial. Esta por sua vez, desensibiliza o barorreflexo, pois os barorreceptores se adaptam ao novo nível pressórico. Assim, na hipertensão renovascular 2R1C o barorreflexo está prejudicado e esta diminuição do barorreflexo parece ser secundária ao aumento de pressão arterial (Moysés et al., 1994).

Porém, a angiotensina II pode alcançar estruturas cerebrais desprovidas da barreira hematoencefálica (órgãos circumventriculares) e exercer ações diretas sobre as mesmas. Além disso, ela pode se ligar a receptores AT₁ em áreas importantes no controle barorreflexo da pressão arterial, como NTS, CVLM e RVLM para exercer suas ações (Head et al., 2002).

A injeção central de angiotensina II sobre o NTS parece causar desensibilização do barorreflexo (Castro e Phillips, 1986), na qual pode estar envolvida um aumento na liberação de GABA e óxido nítrico (Paton e Kasparov, 2000).

Poucos estudos se destinaram a investigar sobre o efeito da angiotensina II sobre CVLM. Um dos mais importantes foi desenvolvido por Saigusa e colaboradores (1996) no qual foi demonstrado que a infusão de angiotensina II em CVLM de coelhos anestesiados diminui a atividade simpática e inibe a atividade do nervo simpático renal, enquanto que o bloqueio dos receptores AT₁ aumenta o componente simpático do barorreflexo.

Em relação aos efeitos da angiotensina II sobre RVLM, está claro que esta parece exercer um efeito simpatoexcitatório sobre o mesmo. A microinjeção de angiotensina II em RVLM causa facilitação do componente simpático do barorreflexo (aumento da atividade simpática renal) e esta facilitação é reproduzida após injeção de glutamato, indicando que a mesma possa ser devido a um aumento deste neurotransmissor (Saigusa et al., 2002).

Em relação aos efeitos do óxido nítrico sobre o barorreflexo, estudos imunohistoquímicos revelaram que altas concentrações de NO sintases estão presentes em regiões específicas envolvidas no controle da pressão arterial e barorreflexo, indicando que o mesmo parece exercer um papel modulador sobre os mesmos (Vicent e Kimura, 1992).

Os efeitos do NO sobre barorreflexo parecem ser primordialmente inibitórios, tanto na periferia quanto no sistema nervoso central.

Em estruturas periféricas envolvidas no controle barorreflexo da pressão arterial, Meyrelles e colaboradores (2003) demonstraram que a superexpressão da eNOS na adventícia do seio carotídeo causa diminuição da atividade aferente barorreceptora, sendo que esta inibição é revertida após administração de L-NAME.

Paton et al. (2001) mostraram que injeções de L-arginina ou doadores de NO no NTS reduziram o componente vagal do barorreflexo no modelo coração-tronco cerebral isolado. Dois anos depois, Waki e colaboradores (2003) propuseram uma teoria para explicar esta atenuação: o óxido nítrico estimula a liberação de GABA nos interneurônios GABAérgicos do NTS, prejudicando assim este sistema de controle da pressão arterial.

Assim como o NO inibe o componente vagal do reflexo, no SNC ele também parece possuir ações simpatoinibitórias. A injeção de L-NMMA no NTS causa aumento da pressão arterial e da atividade do nervo simpático renal em animais com os barorreceptores intactos e desnervados, enquanto que a injeção de L-arginina leva a uma diminuição da pressão arterial e da atividade simpática (Harada et al., 1993; Tseng et al., 1996).

1.3) Hipertensão Arterial

Apesar da eficiência dos três sistemas acima em regular a pressão arterial, em diversas patologias, como por exemplo, a hipertensão arterial pode estar modificando o funcionamento dos mesmos.

Experimentalmente podemos produzir a hipertensão arterial com altos níveis de angiotensina II, que é o modelo de hipertensão renovascular dois rins-um clipe de Goldblatt (Goldblatt et al., 1934). Neste modelo inserimos um

clipe de abertura pré-estabelecida na artéria renal do animal, com o objetivo de causar a diminuição de fluxo para um dos rins. Esta diminuição do fluxo leva a liberação de renina e conseqüentemente, formação de angiotensina II. Esta, por sua vez, eleva a resistência vascular periférica, aumentando assim os níveis pressóricos.

Devido ao aumento dos níveis pressóricos, o fluxo para o rim clipado é normalizado, e o mesmo passa a produzir e liberar níveis normais de angiotensina II, normalizando assim seus níveis plasmáticos. Vale a pena ressaltar que este rim sofre atrofia devido à diminuição de fluxo para o mesmo.

O rim não clipado, por sua vez, possui níveis baixos de renina e desenvolve hipertrofia compensatória, ambos efeitos mediados pelo aumento de fluxo para este rim. Mas se, na fase crônica, o rim não clipado possui baixos níveis de renina e os níveis de angiotensina II plasmáticos estão normais, como esta hipertensão se mantém?

A manutenção da hipertensão renovascular 2R1C reside na inabilidade do rim não clipado de excretar o excesso de sódio. Assim, aumenta-se a volemia e se mantém a hipertensão. Por muito tempo não se soube porque o rim contralateral era incapaz de excretar o excesso de sódio. Hoje em dia já se sabe que esta disfunção é causada pelo acúmulo de angiotensina II intra-renal. A angiotensina II se liga ao receptor AT_1 e é internalizada e acumulada dentro do rim na fase em que se encontra elevada, permitindo assim que a hipertensão se mantenha cronicamente (Navar et al., 1998).

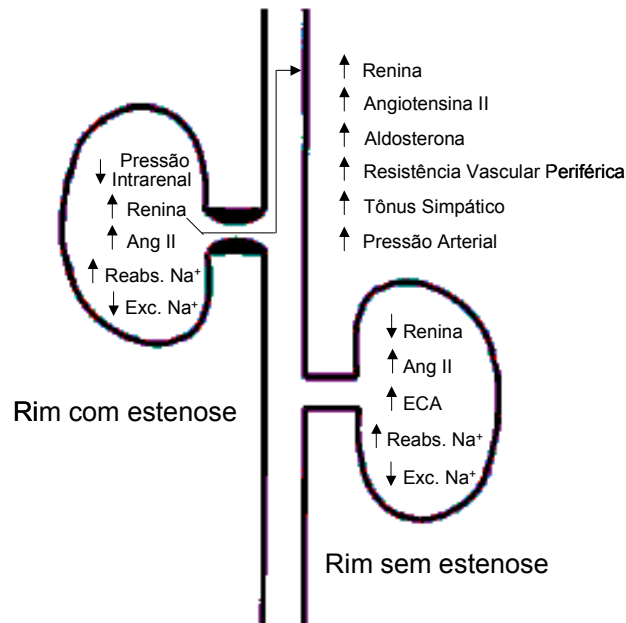


Figura 4: Níveis dos componentes do sistema renina angiotensina e efeitos dependentes de angiotensina II ativados pela estenose unilateral renal. Ang II: angiotensina II; ECA: enzima conversora de angiotensina; Reabs.: reabsorção; Exc.: excreção. Modificado de Navar et al, 1998.

1.4) Interações entre o Sistema Renina Angiotensina e o Óxido Nítrico

Diversos estudos têm demonstrado interações entre o sistema renina angiotensina e o óxido nítrico. Estas interações acontecem tanto entre renina e NO e angiotensina II e NO.

O papel do óxido nítrico sobre a secreção de renina pode ser tanto estimulatório quanto inibitório. O efeito estimulatório do NO sobre a liberação de renina está relacionado com um aumento dos níveis de AMPc induzidos pela inibição da fosfodiesterase 3, a qual transforma o AMPc em AMP (Chiu et

al., 1996). Este AMP estimula a proteína quinase A, a qual promove liberação de renina. A estimulação da secreção de renina pelo NO via inibição da degradação do AMPc necessita de uma formação prévia deste AMPc via adenilato ciclase. Esta estimulação tônica da adenilato ciclase nas células justaglomerulares pode ser dada por fatores locais como catecolaminas, prostaglandinas, adrenomedulina, entre outros (Jensen et al., 1997; Kurtz, 1989). O efeito inibitório do NO sobre a secreção de renina ocorre via guanilato ciclase, que aumenta os níveis de GMPc, levando a ativação de uma enzima G quinase, a qual inibe a liberação de renina (Gambaryan et al., 1996). Assim sendo, um balanço entre as proteínas A e G quinase determina o efeito do óxido nítrico sobre a secreção de renina.

As interações entre NO e angiotensina II são de extrema importância para o sistema cardiovascular e o balanço entre estas duas substâncias pode gerar um papel protetor ou prejudicial para órgãos alvo. Estudos têm demonstrado que o papel do NO sobre a angiotensina II parece ser primordialmente inibitório. O NO pode causar *downregulation* da síntese de ECA no endotélio (Takemoto et al., 1997) e dos receptores AT₁ no músculo liso vascular (Ichiki et al., 1998), levando então uma diminuição na produção e efeitos da angiotensina II. Por outro lado, um excesso na produção de angiotensina II leva a produção de ânions superóxidos via NADPH oxidase. Estes ânions superóxidos inativam o óxido nítrico, diminuindo então a sua biodisponibilidade. Esta situação de desbalanço entre NO, Ang II e O₂⁻ está envolvida na manutenção de diversos estados patológicos, como por exemplo na aterosclerose. (Saini et al 2005)

1.5) Terapia Gênica

Nos últimos anos, o avanço das técnicas de biologia molecular tem permitido uma análise ao nível celular da fisiologia e várias patologias em diversos organismos. Dentre estas técnicas, a terapia gênica tem se tornado particularmente importante para o entendimento de diversas patologias, incluindo as do sistema cardiovascular.

A terapia gênica consiste na inserção de um ou mais genes com o objetivo de prevenir ou tratar o desenvolvimento de um processo patológico e pode ser realizada tanto em células somáticas quanto em células germinativas. Nas células somáticas, a manipulação celular não é passada para os descendentes, enquanto que na terapia gênica de células germinativas isto acontece.

1.6) Vetores

Para que o gene desejado alcance o meio intracelular se torna necessária a utilização de vetores. O sucesso da terapia gênica depende, em grande parte, da efetividade do vetor em transferir para a célula do hospedeiro o gene desejado. O vetor ideal deve ser seguro e gerar um efeito terapêutico máximo com o mínimo de efeitos colaterais (Verma et al., 1997). De maneira geral, existem duas categorias de vetores: os vetores não virais e os vetores virais (Kay et al., 2001; Nishikawa et al., 2001).

Os vetores não virais compreendem partículas de DNA puro (naked DNA) ou DNA ligado à conjugados (lipossomos, conjugados moleculares). Estes tipos de vetores são mais seguros, pois não desencadeiam um resposta

imunológica. Entretanto, estes tipos de vetores possuem uma baixa capacidade de transdução celular. A tabela 1 mostra os tipos de vetores não virais existentes, com suas vantagens e desvantagens:

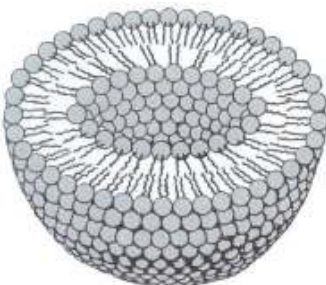

		
	Lipossomo	Plasmídeo de DNA
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> - Não é imunogênico - Abriga grandes quantidades de DNA 	<ul style="list-style-type: none"> - Não é imunogênico
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa taxa de transfecção - Tempo de expressão curto 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa taxa de transfecção - Tempo de expressão curto

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos vetores não virais.

Os vetores virais, por sua vez, possuem alta capacidade de transdução celular, mas desencadeiam uma resposta imunológica. Estes vetores são recombinantes, ou seja, é retirado a sua região de replicação e substituída pelo gene de interesse (Volpers e Kochanek, 2004). Dentre os vetores virais mais utilizados estão os retrovírus, lentivírus, herpes vírus, adenoassociados e

adenovírus. As tabelas 2 e 3 mostram os vetores virais (de DNA e RNA, respectivamente) mais utilizados bem com suas vantagens e desvantagens.

VETORES DE DNA

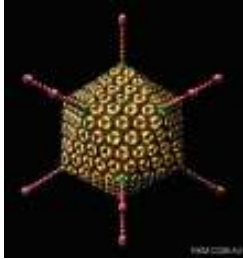

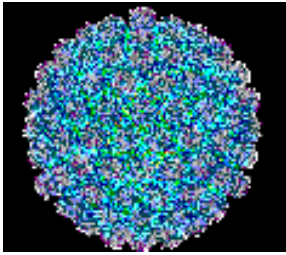
			
	Adenovírus	Adenoassociado	Herpes Vírus
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> - Alta taxa de transfecção - Não se integra ao genoma do hospedeiro - Infectam células que se dividem ou não - Abriga 32 Kb de DNA - Fácil produção 	<ul style="list-style-type: none"> - Não contém genes virais - Não é patogênica - Longo tempo de expressão - Infecta vários tipos celulares 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta taxa de transfecção - Especificidade celular (neurônios) - Abriga 50 Kb de DNA
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> - Alta resposta imunológica - Tempo de expressão curto 	<ul style="list-style-type: none"> - Abriga apenas 4,8 Kb - Difícil produção 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta resposta imunológica - Alta toxicidade

Tabela 2 – Vetores virais de DNA: vantagens e desvantagens

VETORES DE RNA



Retrovírus



Lentivírus

	Retrovírus	Lentivírus
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> - Alta capacidade de transfecção - Se integra ao genoma do hospedeiro - Longo tempo de expressão - Resposta imune baixa 	<ul style="list-style-type: none"> - Infecta células que se dividem ou não - Se integra ao genoma do hospedeiro - Longo tempo de expressão
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> - Abriga apenas 8Kb - Infecta apenas células que se dividem - Integração aleatória no genoma pode causar mutações insercionais 	<ul style="list-style-type: none"> - Abriga apenas 8Kb - Integração aleatória no genoma pode causar mutações insercionais - Alta toxicidade

Tabela 3 – Vetores virais de RNA: vantagens e desvantagens

1.7) Terapia Gênica e Sistema Cardiovascular

A terapia gênica é uma das mais promissoras estratégias para prevenção e melhora do quadro clínico de diversas patologias do sistema cardiovascular. Várias doenças são potenciais candidatas para utilização da terapia gênica, como a hipercolesterolemia familiar, estágios iniciais da aterosclerose, insuficiência cardíaca congestiva, reestenose após angioplastia, infarto do miocárdio (Parissis e Nikolao, 2003).

Dentre as patologias do sistema cardiovascular, a utilização da terapia gênica na hipertensão têm aumentado. Vários estudos têm testado a superexpressão de genes vasodilatadores como o óxido nítrico (Lin et al., 1997) e a inibição de genes vasoconstritores como o angiotensinogênio (Kimura et al., 2001). Entretanto, nenhum estudo utilizou a terapia gênica para a superexpressão da óxido nítrico sintase endotelial em um modelo de hipertensão arterial com altos níveis de angiotensina II.

OBJETIVOS

2.1) Objetivo Geral

- Estudar os efeitos da terapia gênica com o adenovírus carreando a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) sobre a hipertensão arterial em camundongos.

2.2) Objetivos Específicos

- Verificar se a terapia gênica com o AdeNOS é capaz de prevenir o desenvolvimento da hipertensão renovascular 2-rins 1-clipe;
- Verificar os efeitos da hipertensão arterial renovascular sobre coração e rins dos camundongos tratados ou não com a terapia gênica;
- Estudar os efeitos da terapia gênica com eNOS sobre o barorreflexo arterial dos camundongos hipertensos e seus respectivos controles;
- Verificar por meio de análise imunohistoquímica a expressão da eNOS no arco aórtico, coração, fígado e rins dos camundongos submetidos a terapia gênica.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos C57 BL/6, machos, pesando entre 21 e 28 gramas. Os animais foram criados e fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Estes animais eram mantidos em sala com controle de temperatura e ciclo claro/escuro de 12 horas, e recebiam água e ração *ad libitum*. A criação e o manuseio experimental dos animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) e American Physiological Society (APS), respectivamente. A foto abaixo mostra um camundongo C57 utilizado em nosso estudo.



Figura 5 – Foto de um camundongo C57

3.2) Construção e Obtenção do Adenovírus

Os vetores adenovirais foram construídos no Núcleo de Vetores da Universidade de Iowa. Através da deleção das seqüências E1A, E1B e E3 do DNA viral, o adenovírus serotipo 5 humano foi transformado em replicante deficiente. Os cDNAs para o gene da β -galactosidase ou óxido nítrico sintase endotelial foram clonados em vetores transportadores que continham as seqüências do adenovírus serotipo 5 humano. De forma a assegurar expressão gênica no núcleo da célula transfectada, um sinal de localização nuclear foi adicionado na construção do adenovírus. Células embrionárias humanas (HEK 293) foram transfectadas com o plasmídeo transgênico. A expressão gênica foi promovida pela região promotora do citomegalovírus (CMV). Adenovírus replicante deficientes foram produzidos por recombinação homóloga dentro das células HEK 293. Cada adenovírus foi preparado através de uma dupla purificação através de cesium, suspensos em uma solução de glicerol/BSA (10^{12} unidades formadoras de placa) e congelados a -20°C .

3.3) Procedimentos Cirúrgicos

3.3.1) Cirurgia para o desenvolvimento da hipertensão renovascular 2 rins-1 clipe de Goldblatt

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina com xilazina (91 mg/Kg: 9,1 mg/Kg) i.p. e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Através de uma incisão no flanco esquerdo via retroperitoneal, a cavidade peritoneal era exposta e o rim esquerdo era gentilmente afastado para visualização da artéria renal esquerda. Esta era então dissecada e

separada do tecido conjuntivo circundante. Após este procedimento, a artéria recebia um clipe de aço inox de dimensões 3x2x1 mm (Exidel SA, Suíça) com abertura de 0,12 mm em região próxima a aorta abdominal. Ao fim da cirurgia, eram feitas as suturas peritoniais e abdominais. A foto abaixo ilustra o clipe utilizado em nosso estudo.

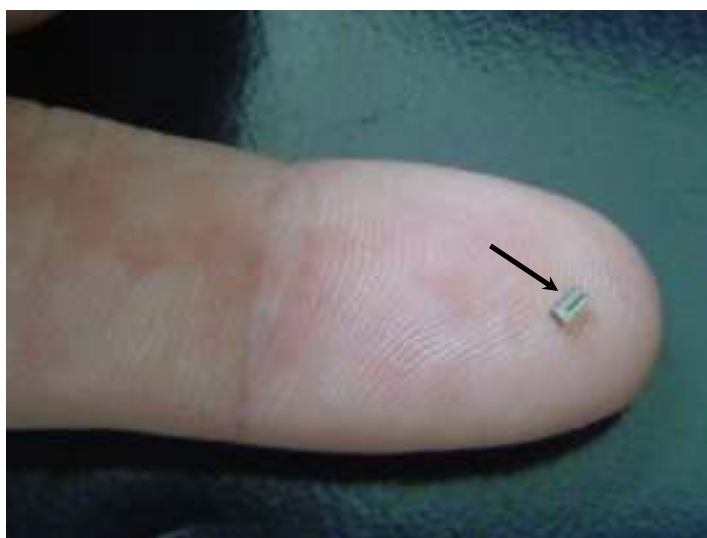


Figura 6 – Foto do clipe de aço inox utilizado em nosso estudo.

3.3.2) Cateterização

Ao fim de 2 semanas, os animais eram anestesiados com uma mistura de ketamina (91 mg/Kg) e xilazina (9,1 mg/Kg), i.p. Com o auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto Eletrônica S/A, modelo 2002, Brasil) os animais tiveram sua artéria carótida e veia jugular separadas dos tecido conectivo e cateterizadas para medidas hemodinâmicas e administração drogas respectivamente. Foram utilizados cateteres de microrenathane.04 O.D. X .025 I.D. esticados por aquecimento para redução do lúmen (Braintree

Scientific, USA). Ambos os cateteres eram preenchidos com solução NaCl 0,9% heparinizada e ocluídos com pinos de metal.

A foto abaixo nos mostra um animal logo após a cirurgia de canulação.

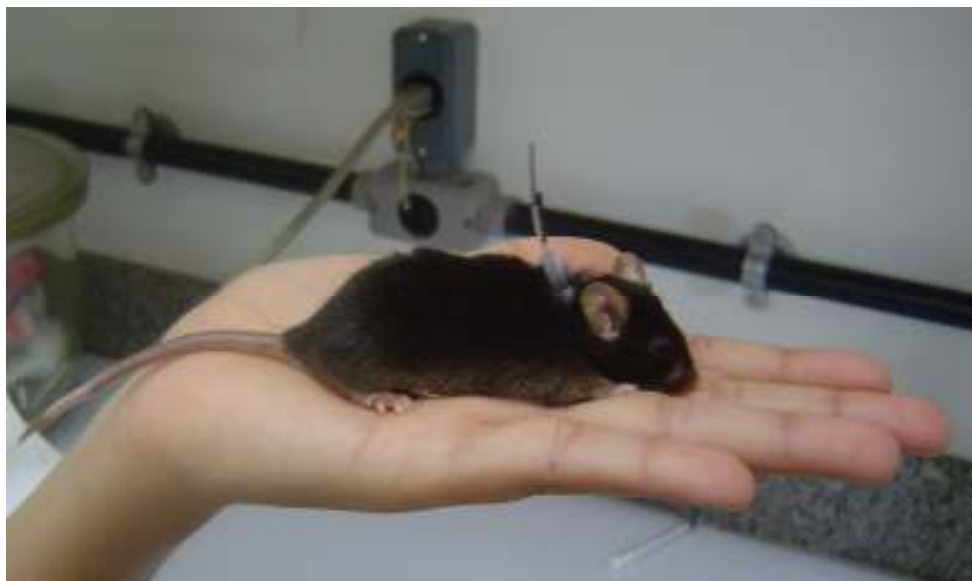


Figura 7 – Foto de um camundongo C57 logo após a cirurgia de canulação.

3.4) Protocolo Experimental

3.4.1) Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- 2R1C eNOS – estes animais recebiam no mesmo dia o clipe de aço para o desenvolvimento da hipertensão renovascular e o adenovírus que expressa a óxido nítrico sintase endotelial (Ad eNOS) sistemicamente através da veia caudal.

- 2R1C β gal – estes animais recebiam no mesmo dia o clipe de aço para o desenvolvimento da hipertensão renovascular e o adenovírus que expressa a β -galactosidase (Ad β gal) sistemicamente através da veia caudal.

- Sham glicerol/ β gal – estes animais foram submetidos à uma cirurgia fictícia de desenvolvimento da hipertensão renovascular (sem a colocação do clipe) e receberam uma injeção sistêmica do veículo no qual o adenovírus está dissolvido (glicerol) ou adenovírus que expressa a β -galactosidase através da veia caudal.

- Sham eNOS - estes animais foram submetidos à uma cirurgia fictícia de desenvolvimento da hipertensão renovascular (sem a colocação do clipe) e receberam uma injeção sistêmica do adenovírus que expressa a óxido nítrico sintase endotelial (Ad eNOS) através da veia caudal.

3.4.2) Administração sistêmica do adenovírus ou veículo

Após a cirurgia de colocação do clipe, ainda em decúbito lateral, os animais recebiam através uma injeção sistêmica na veia caudal o adenovírus (1×10^{10} placas formadoras de unidades em 35 μ L) que expressa a eNOS, β gal ou apenas veículo (glicerol), através da utilização de uma seringa Hamilton de 100 μ L.

A figura abaixo ilustra o procedimento da injeção do adenovírus através da veia caudal.

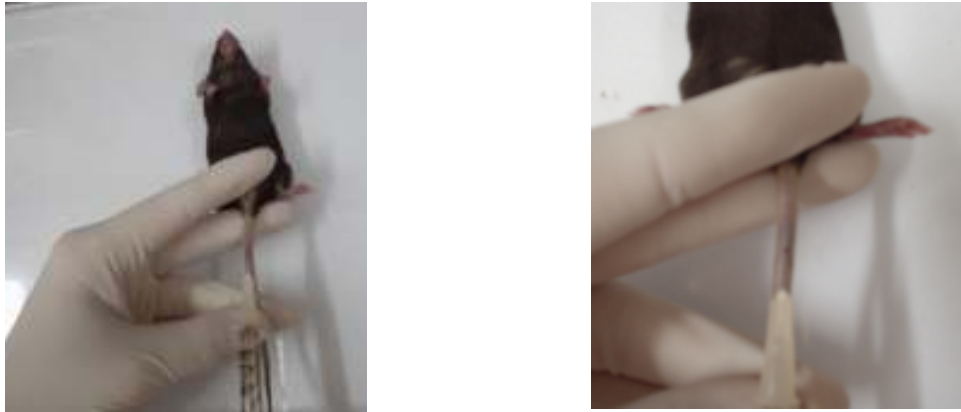


Figura 8 – Fotos ilustrativas do procedimento da injeção sistêmica do adenovírus através da veia caudal.

3.4.3) Teste do Barorreflexo Arterial em Camundongos Acordados

Duas semanas depois após a colocação do clipe e injeção do adenovírus, os animais foram anestesiados e tiveram a sua artéria carótida e veia jugular cateterizadas. Vinte e quatro horas após a cirurgia de canulação, os animais foram colocados em uma gaiola onde podiam se movimentar livremente.

O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão conectado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems, USA) para a medida da pressão arterial e a veia jugular foi conectada a um cateter extensor para a administração de drogas.

A figura abaixo nos mostra o sistema de registros hemodinâmicos nos animais 24 horas após a cirurgia de cateterização.



Figura 9 – Foto do registro de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) nos animais acordados, 24 horas após a cirurgia de canulação.

Para o teste do barorreflexo arterial, os animais recebiam uma única dose *in bolus* de fenilefrina (48 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, Sigma Chemical Company, USA) e após 40 minutos, uma única dose *in bolus* de nitroprussiato de sódio (24 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, Sigma Chemical Company, USA). A ordem das injeções era invertida a cada animal: o primeiro animal recebia fenilefrina e depois nitroprussiato de sódio. No próximo animal, o experimento se iniciava com a dose de nitroprussiato de sódio, posteriormente era feita a injeção de fenilefrina. Em cada injeção, o volume administrado era de 70 μL , de forma que o animal não sofresse uma sobrecarga de volume.

Para a análise do barorreflexo arterial foram consideradas as variações de pressão arterial média (1-25 mmHg) correlacionadas aos valores de variação de frequência cardíaca. Além disto, nestes pontos foi calculado o ganho (sensibilidade do barorreflexo), e posteriormente, foi feita uma média dos ganhos.

3.4.4) Medida de hipertrofia

Ao fim dos experimentos os animais tinham seus corações e rins removidos e colocados na estufa para secar. Após 24 horas os órgãos eram pesados e o índice de hipertrofia era calculado através da relação peso do órgão/peso corporal (mg/g).

3.4.5) Imunohistoquímica

Para confirmação da eficiência da transdução celular pelo adenovírus AdeNOS foi feito um estudo piloto em um animal controle transfectado com o AdeNOS e um animal controle transfectado com o Ad β gal.

Os animais foram sacrificados com uma superdosagem de tiopental sódico e perfundidos com PBS (30 ml) e paraformaldeído 4% (30 ml). O ventrículo, rim direito, rim esquerdo, fígado e arco aórtico foram removidos e montados em gelatina a 25% (Dr. Oetker, Brasil) e imediatamente congelados à -16°C. Após 24 horas as amostras foram seccionados a 16 μ m (ventrículos e fígado), 20 μ m (rins) e 8 μ m (arco aórtico) de espessura em micrótomo criostato a -20°C (ANCAP, Campinas, SP) e analisados através de técnicas de imunohistoquímica para a presença da enzima eNOS. Os cortes histológicos

dos órgãos foram tratados com H₂O₂ a 0.3% em PBS, para bloquear a atividade da peroxidase endógena, e em seguida os cortes foram incubados com albumina sérica bovina 4% (BSA; Sigma-Aldrich) durante 30 min. Os cortes foram então incubados durante 1 h a temperatura ambiente com o anticorpo policlonal primário de coelho contra eNOS (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) em uma diluição de 1:50. Após lavar os cortes histológicos com PBS, os mesmos Após a lavagem em PBS 1X os cortes foram tratados por 15 minutos com um anticorpo secundário biotinizado anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra, para evitar ligações inespecíficas. Após esta etapa, os cortes foram lavados com PBS 1X e tratados com estreptavidina, um conjugado de peroxidase por 15 minutos. Após a estreptavidina peroxidase, as amostras foram lavadas em PBS 1X e incubadas com uma solução cromogênica por 5 minutos. Todos as soluções utilizadas no protocolo de imunohistoquímica faziam parte do *kit*, exceto o anticorpo. Por último todos os cortes histológicos serão coloridos com o hematoxilina-eosina (Sigma-Aldrich) e examinados ao microscópio.

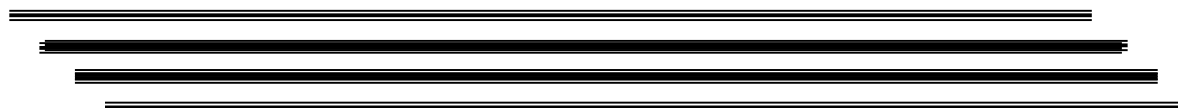
3.5) Análise Estatística

Todos os dados estão expressos como média \pm EPM. Para a análise estatística foram utilizados teste t de Student e ANOVA 2 vias para medidas repetidas seguida do teste de Tuckey. Os valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4.1) Valores Basais de Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca

Nosso primeiro resultado diz respeito aos valores pressão arterial média nos diferentes grupos estudados. Como esperado, os animais 2R1C β gal apresentaram maiores valores de PAM (125 ± 1 mmHg $**p < 0,01$) quando comparados ao grupo controle Sham glicerol/ β gal (102 ± 4 mmHg), comprovando assim, que a cirurgia de indução da hipertensão renovascular foi eficaz. A hipertensão arterial que foi observada no grupo 2R1C β gal foi prevenida nos animais 2R1C eNOS (109 ± 2 mmHg) devido a superexpressão da óxido nítrico sintase endotelial. É interessante notar que a administração do adenovírus eNOS não causa nenhuma queda de pressão arterial nos animais sham eNOS (110 ± 2 mmHg) quando comparados aos animais sham glicerol/ β gal. Os valores de pressão arterial média nos diferentes grupos estudados está demonstrado na figura 10.



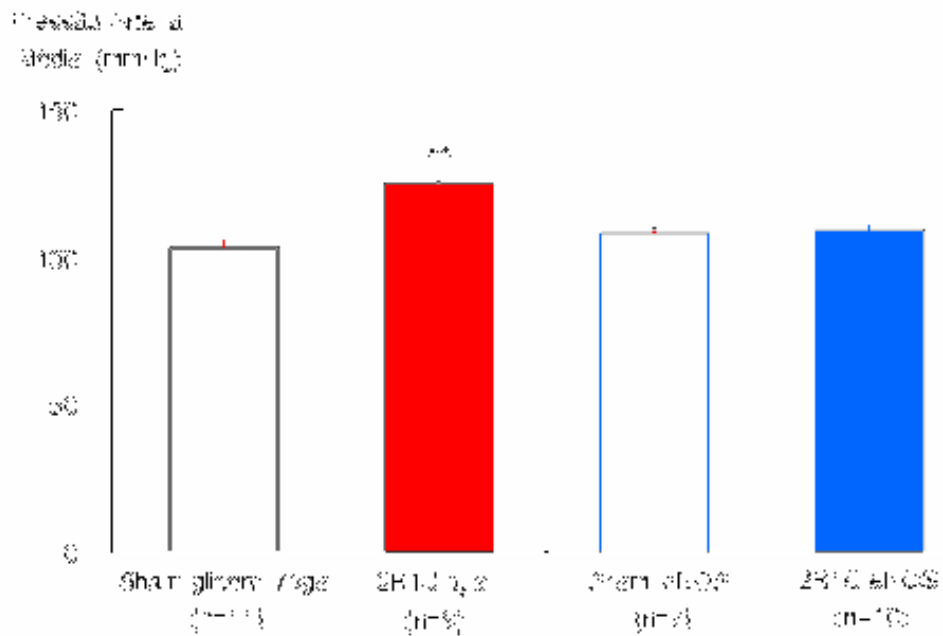


Figura 10 – Valores basais de pressão arterial média (PAM) nos grupos Sham glicerol/βgal, 2R1C βgal, Sham eNOS e 2R1C eNOS **p<0,01 vs todos os grupos

Em relação aos valores de frequência cardíaca, podemos observar que os animais hipertensos apresentaram um aumento da FC basal (539 ± 24 bpm *p<0,05) quando comparados ao grupo controle Sham glicerol/βgal (473 ± 13 bpm). Assim como aconteceu com a hipertensão, a taquicardia observada nos animais hipertensos também foi prevenida pela superexpressão da eNOS no grupo 2R1C eNOS (464 ± 10 bpm). Além disto, a superprodução de óxido nítrico em um animal controle não alterou os valores basais de frequência cardíaca (Sham eNOS: 482 ± 14 bpm). Este resultado está demonstrado na figura 11.

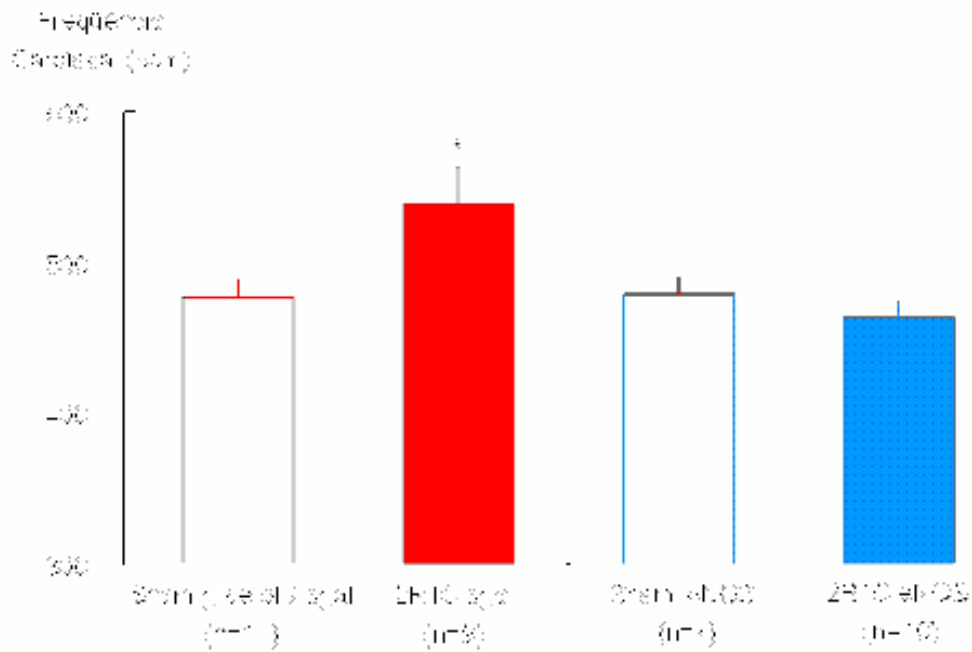


Figura 11 – Valores basais de frequência cardíaca (FC) nos grupos Sham glicerol/βgal, 2R1C βgal, Sham eNOS e 2R1C eNOS. *p<0,05 vs todos os grupos.

4.2) Hipertrofia Cardíaca e Renal

Neste estudo também avaliamos a presença de hipertrofia cardíaca, através da relação peso do coração/peso corporal (índice de hipertrofia cardíaca). Na figura 12 podemos observar que esta relação é a mesma para os grupos Sham glicerol e 2R1C βgal, indicando que a hipertensão renovascular 15 dias após a colocação do clipe, não gerou hipertrofia cardíaca. (Sham glicerol/βgal: $1,11 \pm 0,03$; 2R1C βgal: $1,24 \pm 0,05$ mg/g). Além disto, quando comparamos os grupos 2R1C βgal e 2R1C eNOS, vemos que, apesar de

existir uma clara tendência à hipertrofia cardíaca ($p=0,07$), não houve diferença neste parâmetro (2R1C β gal: $1,24\pm 0,05$; 2R1C eNOS: $1,22\pm 0,06$ mg/g), indicando que a terapia gênica com eNOS não causou nenhuma alteração estrutural no coração dos animais e que a tendência à hipertrofia provavelmente se deve apenas aos efeitos da angiotensina II. Estes resultados estão demonstrados na figura a seguir.

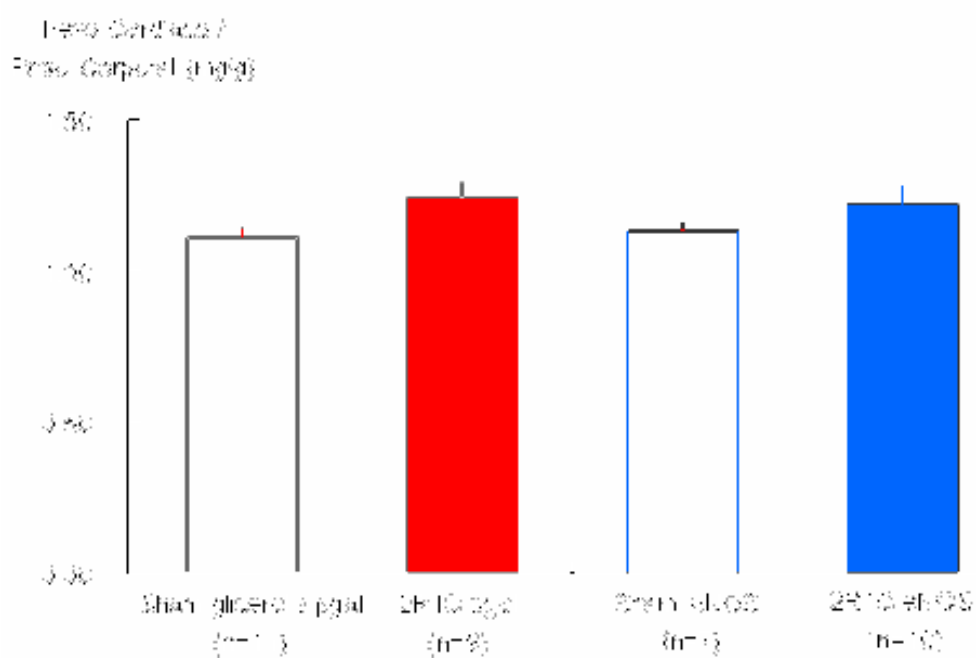


Figura 12 – Relação peso cardíaco/peso corporal nos diferentes grupos estudados.

Em relação aos resultados de hipertrofia renal, os animais que receberam o clipe na artéria renal esquerda apresentaram uma atrofia do rim esquerdo, decorrente da diminuição de fluxo para o mesmo. (Sham glicerol/ β gal: $1,42 \pm 0,05$; 2R1C β gal: $0,61 \pm 0,07^{**}$; Sham eNOS: $1,38 \pm 0,05$; 2R1C eNOS: $0,76 \pm 0,10^{**}$ mg/g; $^{**}p < 0,01$ vs. grupos sham), sendo que esta atrofia foi igual entre os grupos 2R1C eNOS e 2R1C β gal, indicando a superexpressão da eNOS não altera o estímulo mecânico para a produção da hipertensão renovascular. Este resultado está demonstrado na figura 13.

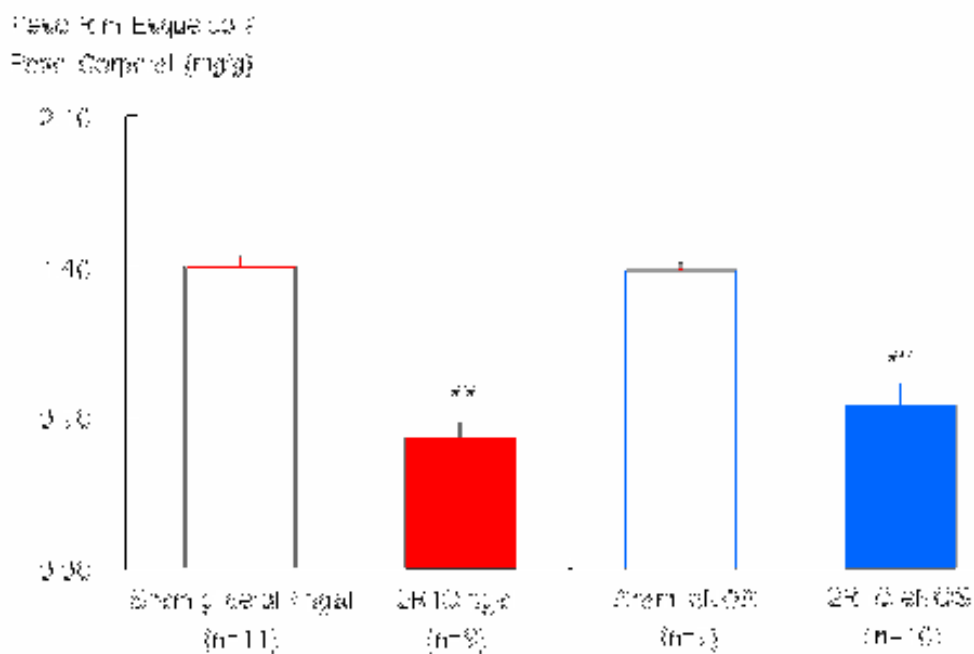


Figura 13 – Relação peso do rim esquerdo/peso corporal nos grupos Sham glicerol/ β gal, 2R1C β gal, sham eNOS e 2R1C eNOS. $^{**}p < 0,01$ vs Sham glicerol/ β gal e Sham eNOS

Em contrapartida, também nos animais que receberam o clipe, o rim direito apresenta uma hipertrofia decorrente do aumento de fluxo para o mesmo. (Sham glicerol/ β gal: $1,50 \pm 0,06$; 2R1C β gal: $1,82 \pm 0,08^{**}$; Sham eNOS: $1,48 \pm 0,06$; 2R1C eNOS: $1,85 \pm 0,05$ mg/g ** ; $^{**}p < 0,01$ vs. grupos sham). Esta hipertrofia também não é diferente entre os animais 2R1C β gal e 2R1C eNOS, indicando mais uma vez que a superexpressão da eNOS não altera o estímulo mecânico para a produção da hipertensão renovascular em camundongos. Este resultado encontra-se na figura 14.

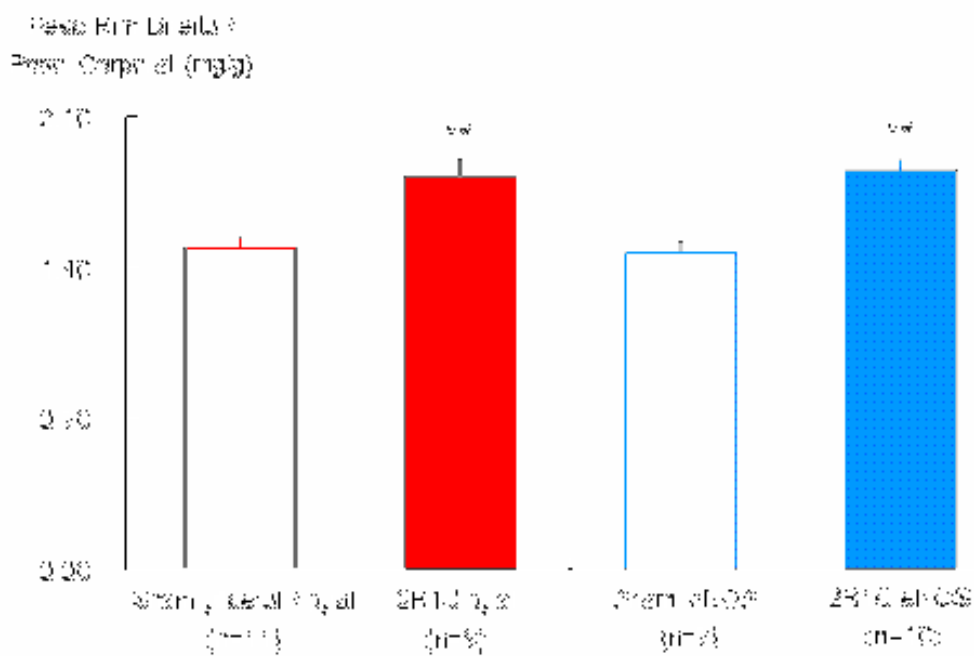


Figura 14 – Relação peso do rim direito/peso corporal nos diferentes grupos estudados. $^{**}p < 0,01$ vs Sham glicerol/ β gal e Sham eNOS

4.3) Barorreflexo Arterial

Na figura abaixo podemos visualizar as alterações reflexas da FC frente às diferentes variações de PAM (5-25 mmHg). Podemos observar que tanto para as injeções de fenilefrina (painel A) quanto pra as injeções de nitroprussiato de sódio (painel B), os animais hipertensos não apresentam alterações do barorreflexo 15 dias após a indução da hipertensão renovascular.

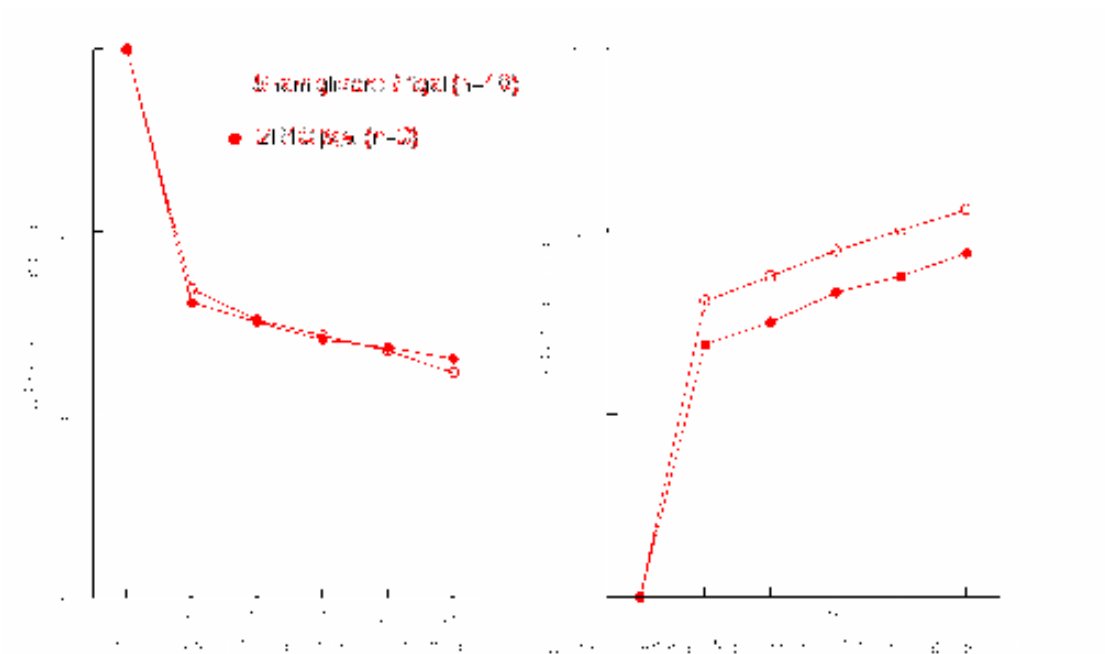


Figura 15 – Variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por fenilefrina (A) e nitroprussiato de sódio (B) nos grupos Sham glicerol/βgal e 2R1C βgal.

Uma outra forma de se avaliar o barorreflexo é através do ganho ou sensibilidade deste sistema, que é expresso através do número de batimentos cardíacos variados por mmHg de PAM (bpm/mmHg). Na figura 14 observamos que de acordo com a análise anterior, os animais hipertensos (2R1C β gal) não possuem ganho diferente dos animais sham glicerol/ β gal tanto pra as injeções de fenilefrina (Sham glicerol/ β gal: $13 \pm 1,1$; 2R1C β gal: $14 \pm 1,2$ bpm/mmHg) quanto para as injeções de nitroprussiato de sódio (Sham glicerol/ β gal: $14 \pm 1,1$; 2R1C β gal: $13 \pm 1,0$ bpm/mmHg), indicando que a hipertensão renovascular 15 dias após a colocação do clipe não altera o sistema do barorreflexo. Este resultado encontra-se nas figuras 16 e 17.

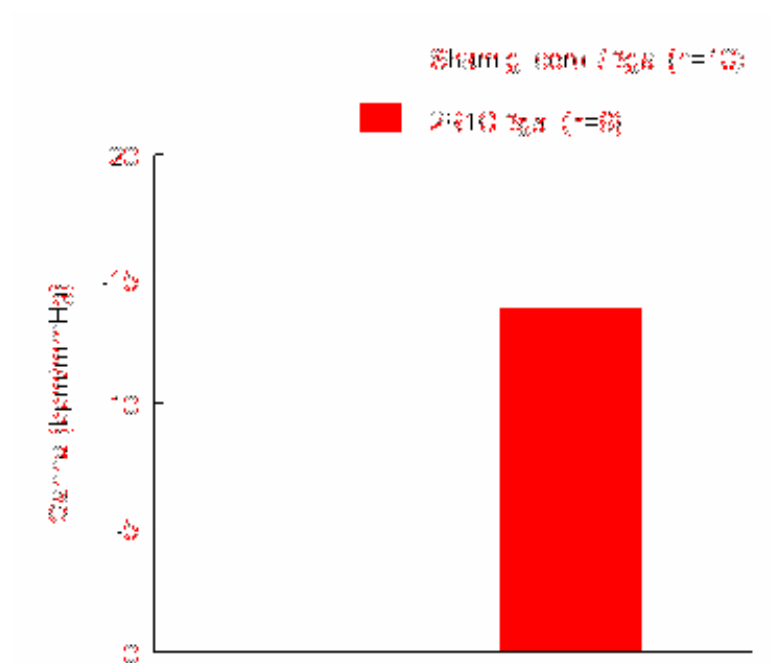


Figura 16 – Média dos ganhos frente às injeções de fenilefrina nos grupos Sham glicerol/ β gal e 2R1C β gal.

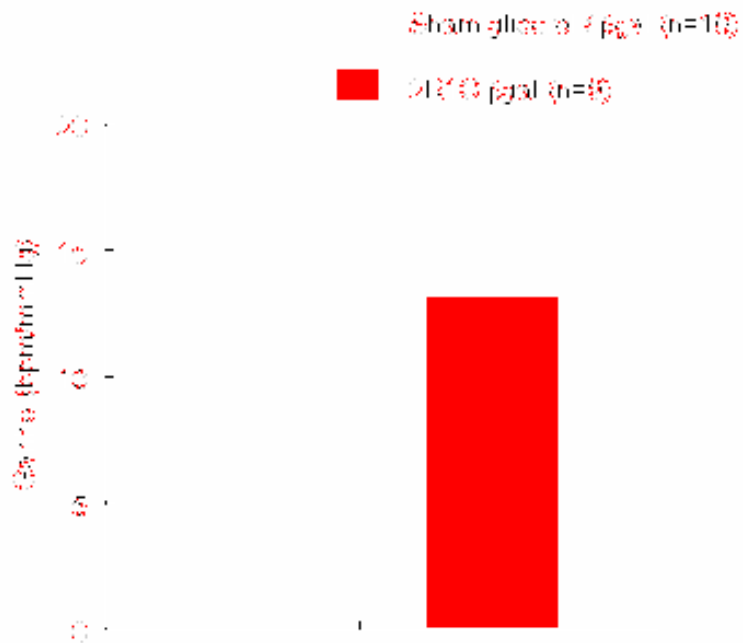


Figura 17 – Média dos ganhos frente às injeções de nitroprussiato de sódio nos grupos Sham glicerol/βgal e 2R1C βgal.

A figura 18 mostra os registros típicos com a bradicardia reflexa decorrente do aumento de pressão arterial induzido pela injeção *in bolus* de fenilefrina e na figura 19 podemos observar os registros típicos com a taquicardia reflexa decorrente da diminuição de pressão arterial induzida pela injeção *in bolus* de nitroprussiato de sódio nos grupos sham glicerol/βgal e 2R1C βgal. Note como as respostas reflexas são iguais nos dois grupos tanto para as injeções de fenilefrina quanto para as injeções de nitroprussiato de sódio.

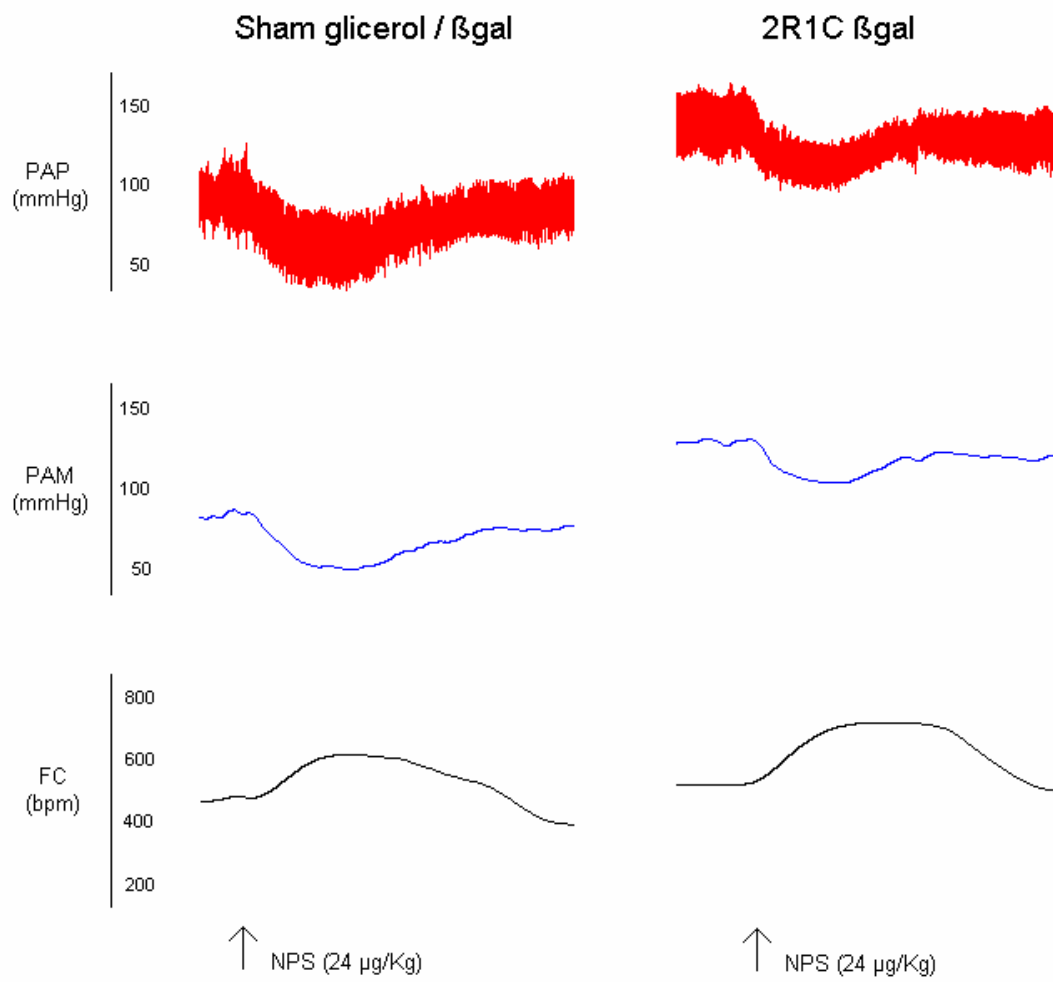


Figura 18 – Registros típicos das respostas reflexas frente às variações de pressão arterial induzidas por fenilefrina. PAP: pressão arterial pulsátil, PAM: pressão arterial média, FC: frequência cardíaca

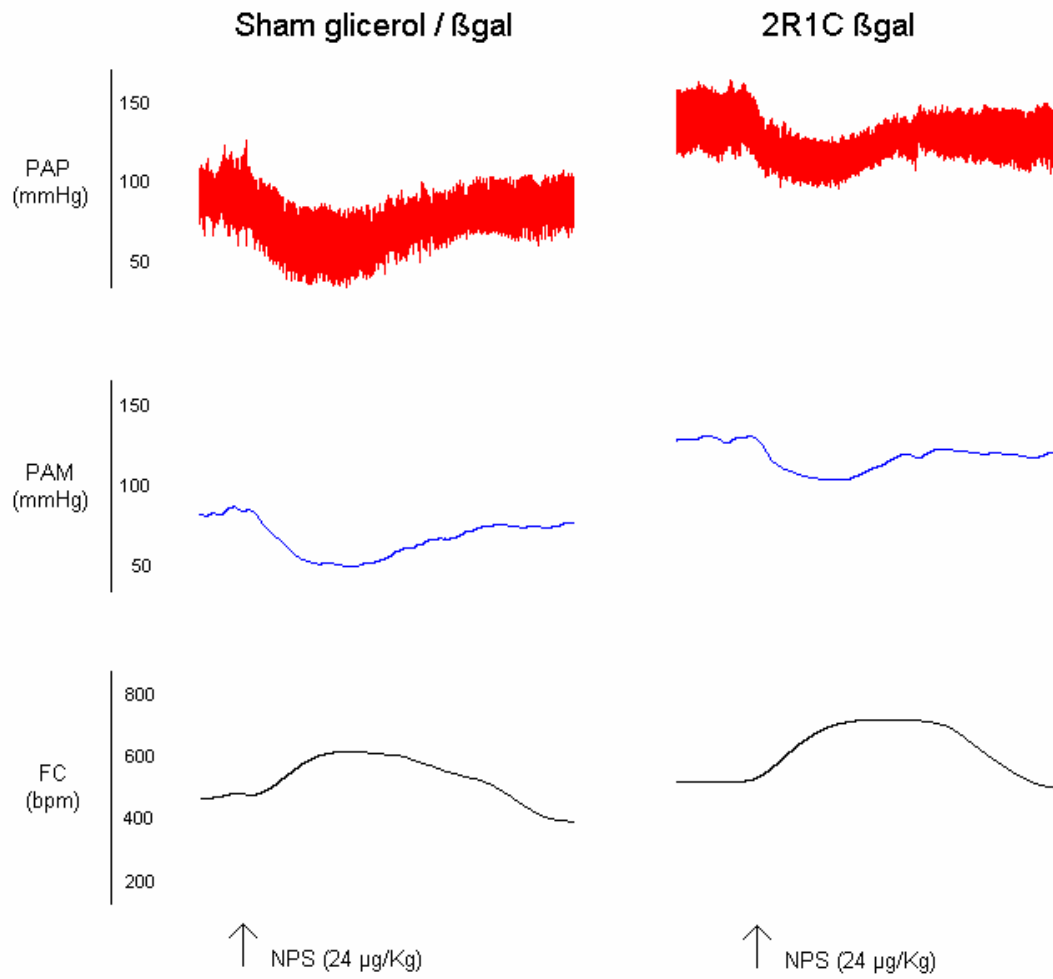


Figura 19 – Registros típicos das respostas reflexas frente às variações de pressão arterial induzidas por nitroprussiato de sódio. PAP: pressão arterial pulsátil, PAM: pressão arterial média, FC: frequência cardíaca

Por outro lado, os animais que receberam a terapia gênica com eNOS apresentaram uma menor bradicardia reflexa frente à injeção do agente vasoconstritor fenilefrina. Estes mesmos animais também mostraram uma maior taquicardia reflexa frente às injeções de nitroprussiato de sódio (vasodilatador) quando comparados aos animais 2R1C β gal, como podemos observar na figura abaixo.

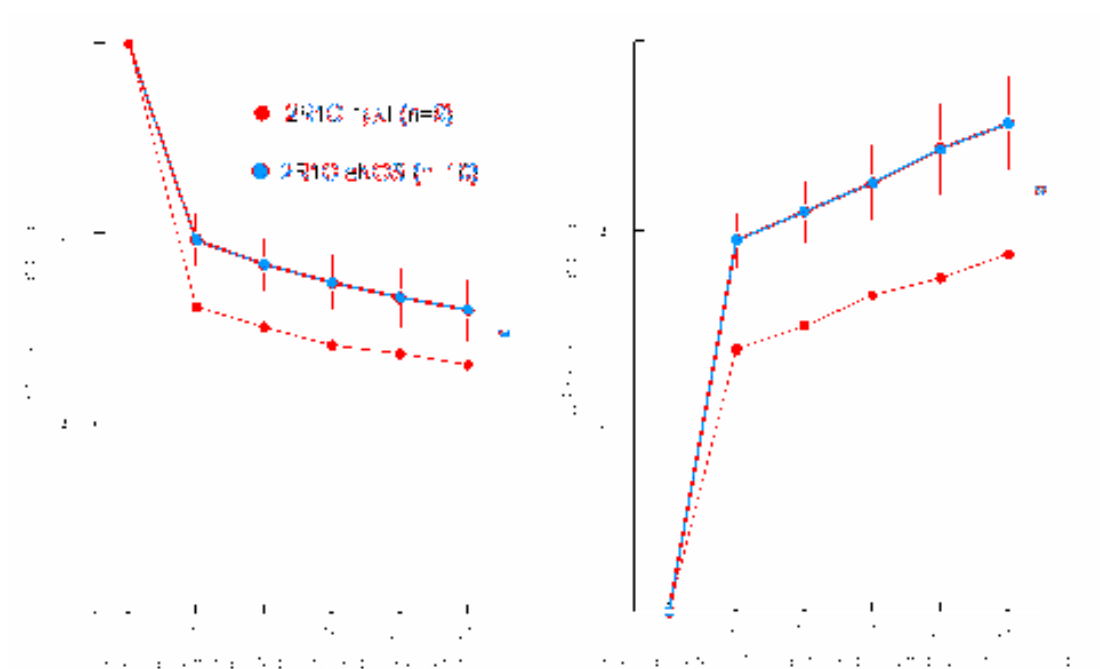


Figura 20 – Variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por fenilefrina (A) e nitroprussiato de sódio (B) nos grupos 2R1C β gal e 2R1C eNOS. * $p < 0,05$ entre grupos

Também de acordo com a análise anterior, os animais que receberam a terapia gênica para eNOS apresentaram menor ganho para as injeções de fenilefrina (2R1C β gal: $14 \pm 1,2$; 2R1C eNOS: $10 \pm 1,3^*$ bpm/mmHg; $p < 0,05$ vs. 2R1C β gal) e maior ganho para as injeções de nitroprussiato de sódio (2R1C β gal: $13 \pm 1,0$; 2R1C eNOS: $17 \pm 1,2^*$; $*p < 0,05$ vs. 2R1C β gal). Estes resultados encontram-se nas figuras 21 e 22.

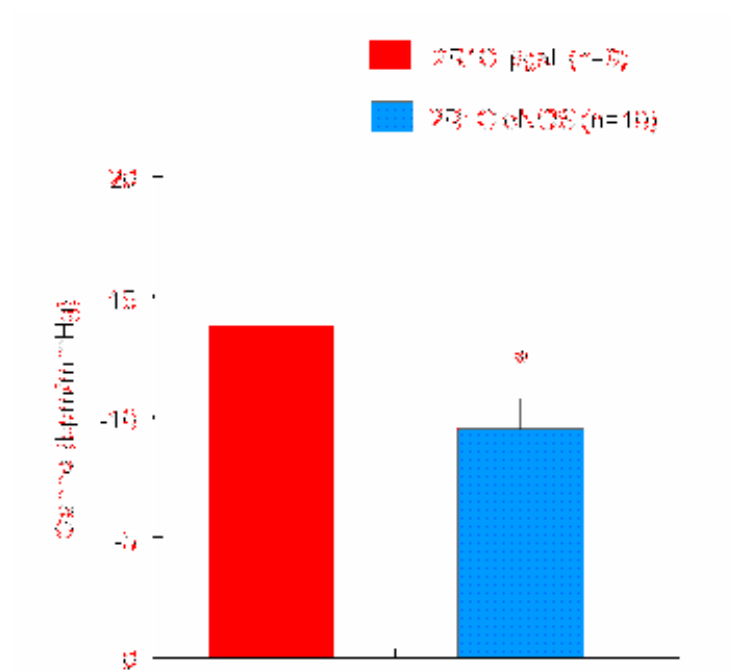


Figura 21 – Média dos ganhos frente às injeções de fenilefrina nos grupos 2R1C β gal e 2R1C eNOS. $*p < 0,05$ vs 2R1C β gal.

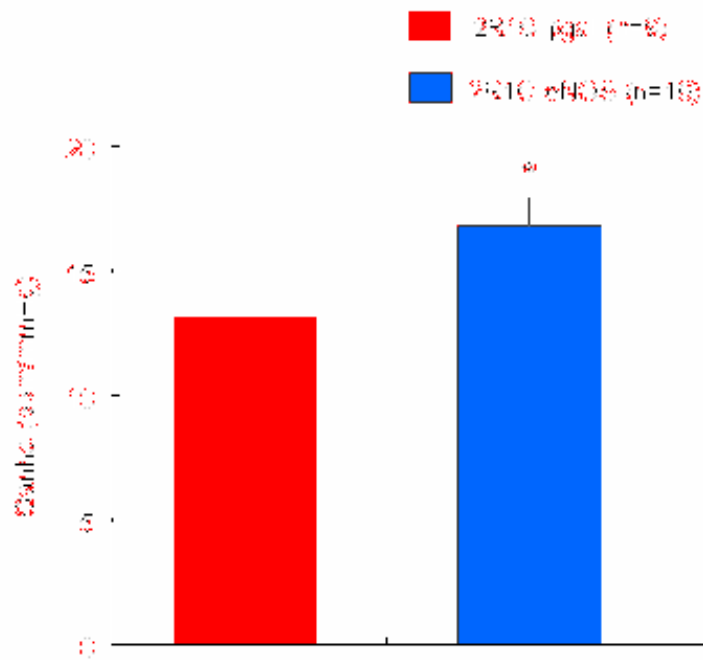


Figura 22 – Média dos ganhos frente às injeções de nitroprussiato de sódio nos grupos 2R1C βgal e 2R1C eNOS. *p<0,05 vs 2R1C βgal.

Na figura 23 podemos observar o registro típico do teste do barorreflexo nos grupos 2R1C βgal e 2R1C eNOS frente à injeção de fenilefrina. Podemos observar claramente que as respostas bradicárdicas são menores nos animais que receberam a terapia gênica com eNOS. Por outro lado, as respostas taquicárdicas são maiores nos animais 2R1C eNOS quando comparados aos animais 2R1C βgal . Na figura 24 podemos observar o registro típico do teste do barorreflexo nos grupos 2R1C βgal e 2R1C eNOS frente à injeção de nitroprussiato de sódio.

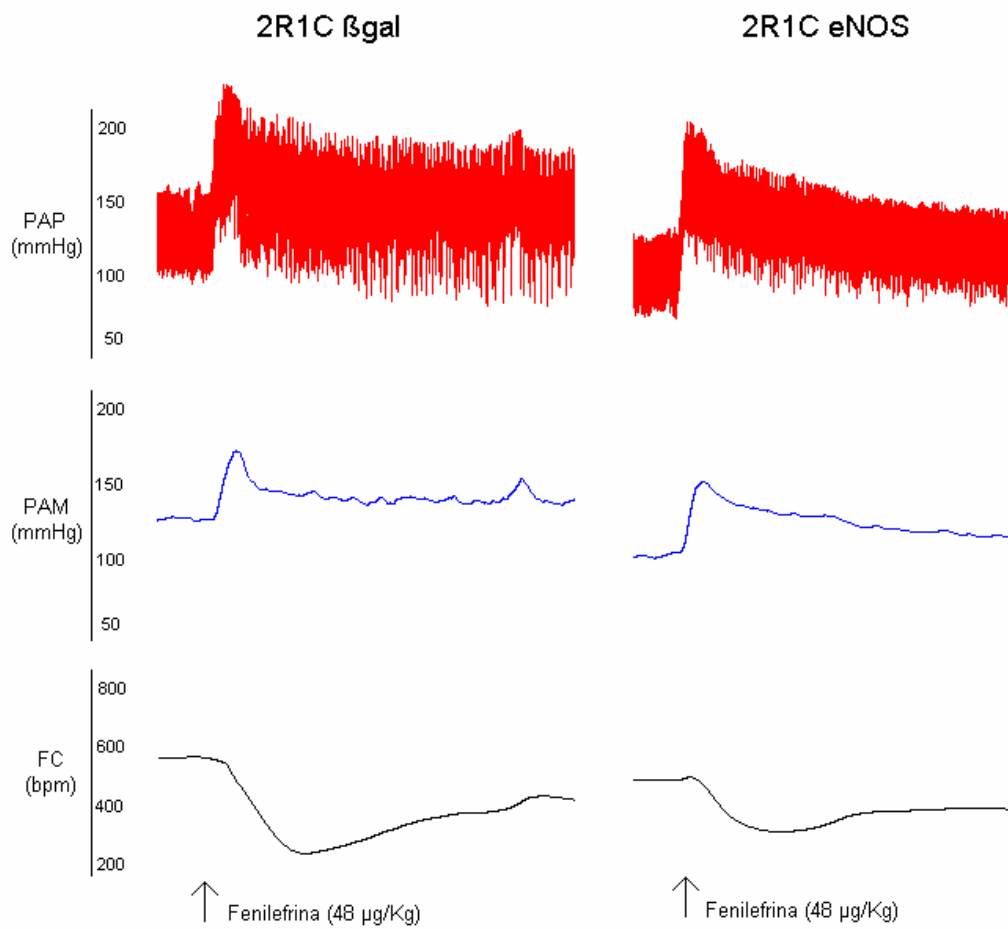


Figura 23 – Registros típicos das variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por fenilefrina nos grupos 2R1C β gal e 2R1C eNOS.

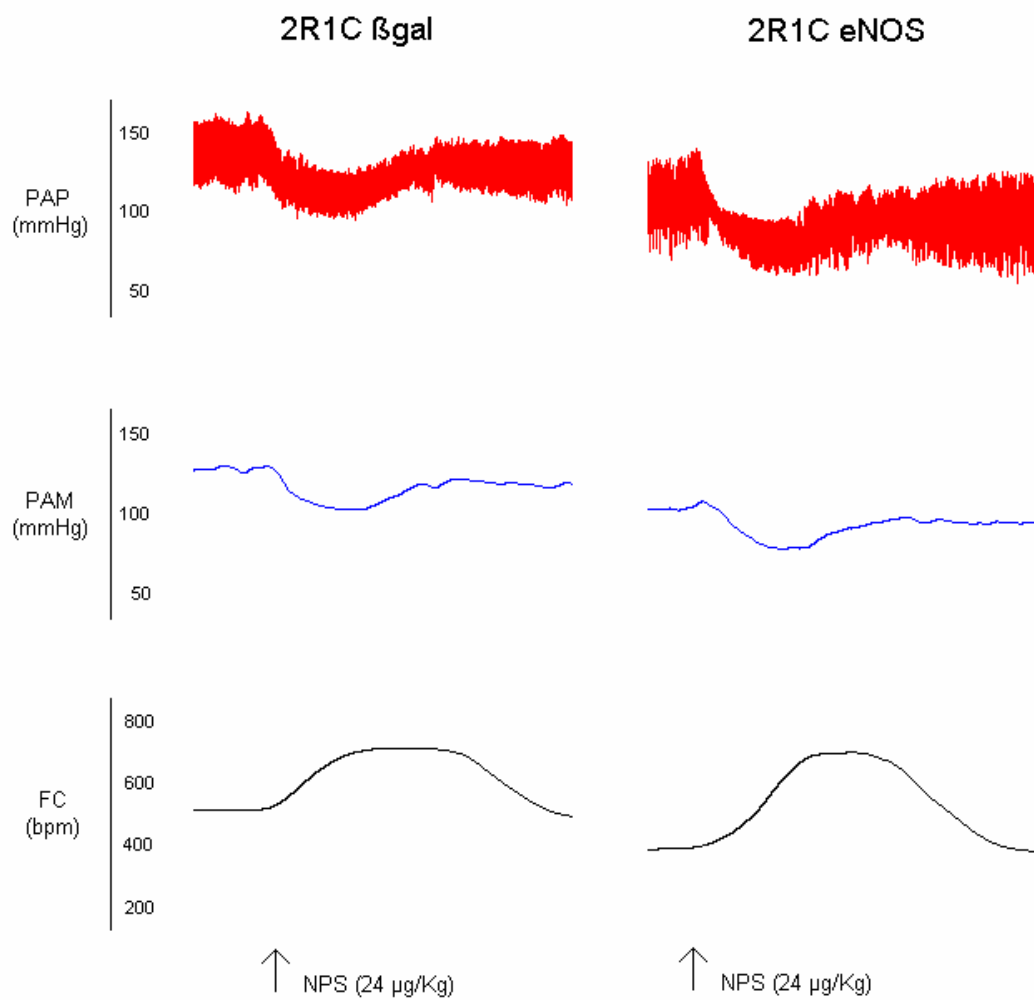


Figura 24 – Registros típicos das variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por nitroprussiato de sódio nos grupos 2R1C β gal e 2R1C eNOS.

Quando comparamos os grupos sham eNOS e 2R1C eNOS, podemos perceber a resposta do barorreflexo destes grupos são iguais, comprovando assim que a diminuição do barorreflexo é devido a superexpressão da eNOS. Este resultado está demonstrado na figura abaixo.

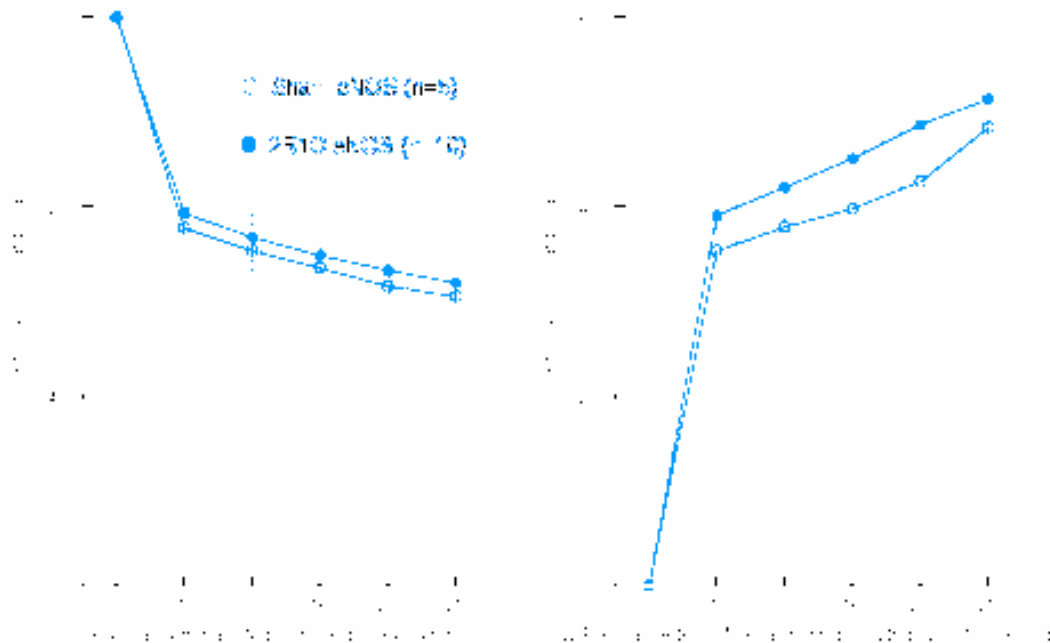


Figura 25 – Variações reflexas de freqüência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por fenilefrina (A) e nitroprussiato de sódio (B) nos grupos sham eNOS e 2R1C eNOS.

O mesmo resultado encontrado na análise ponto a ponto também foi encontrado na média dos ganhos para os grupos sham eNOS e 2R1C eNOS, confirmando que a superexpressão da eNOS provoca modificações no barorreflexo que são iguais nos grupos sham eNOS e 2R1C eNOS (Fenilefrina

- Sham eNOS: $-11 \pm 0,9$; 2R1C eNOS: $9,5 \pm 1,3$ bpm/mmHg; Nitroprussiato de sódio - Sham eNOS: $16 \pm 0,9$; 2R1C eNOS: $17 \pm 1,2$ bpm/mmHg). Podemos visualizar este resultado nas figuras 26 e 27.

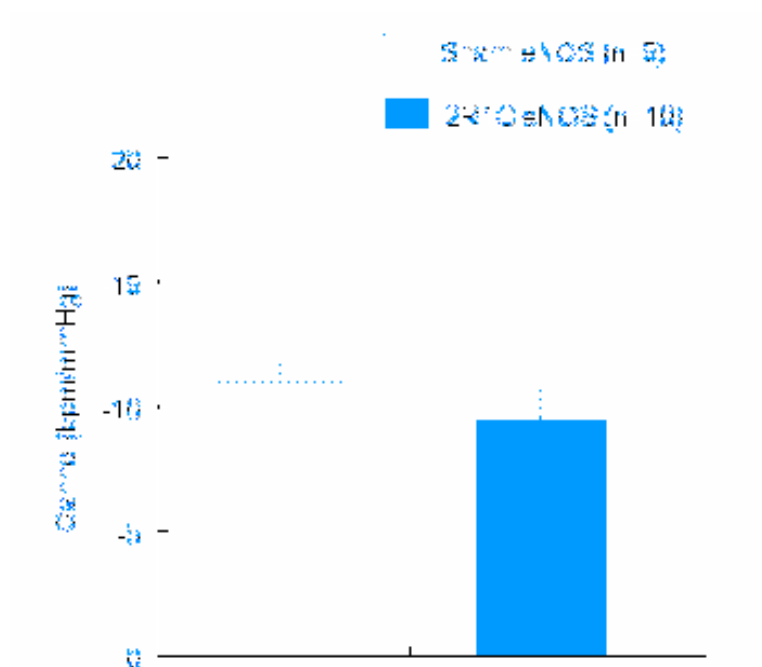


Figura 26 – Média dos ganhos frente às injeções de fenilefrina nos grupos sham eNOS e 2R1C eNOS.

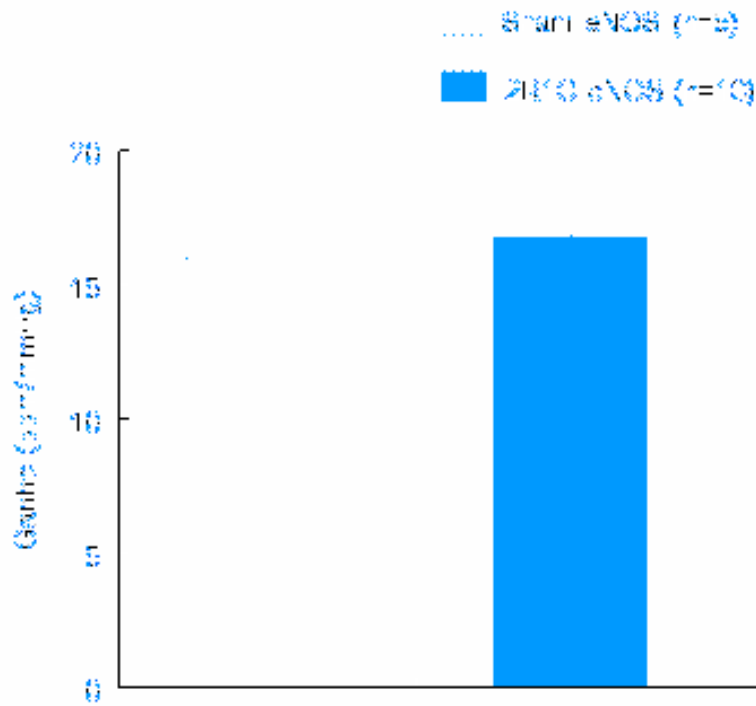


Figura 27 – Média dos ganhos frente às injeções de nitroprussiato de sódio nos grupos sham eNOS e 2R1C eNOS.

A figura 28 mostra os registros típicos com a bradicardia reflexa decorrente do aumento de pressão arterial induzido pela injeção *in bolus* de fenilefrina e a figura 29 mostra os registros típicos com a taquicardia reflexa decorrente da diminuição de pressão arterial induzida pela injeção *in bolus* de nitroprussiato de sódio nos grupos sham eNOS e 2R1C β gal. Note como as respostas reflexas são iguais nos dois grupos tanto para as injeções de fenilefrina quanto para as injeções de nitroprussiato de sódio.

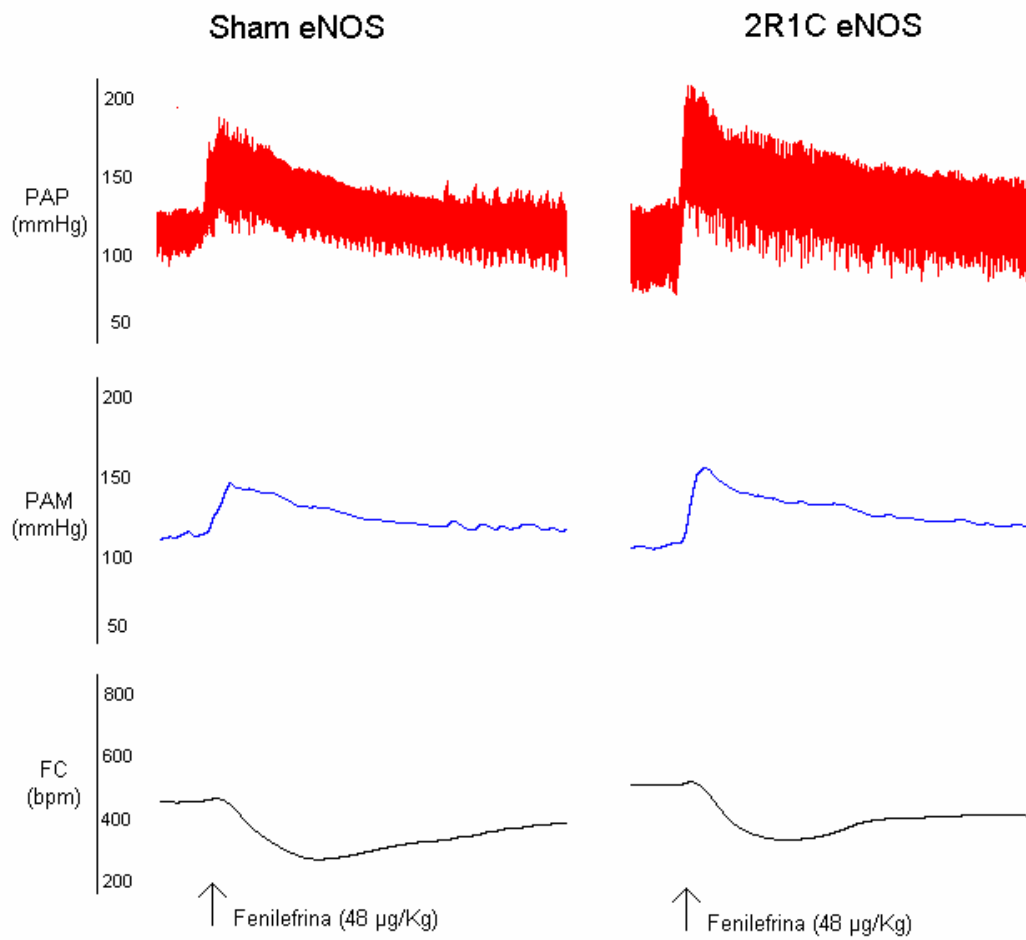


Figura 28 – Variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por fenilefrina nos grupos sham eNOS e 2R1C eNOS.

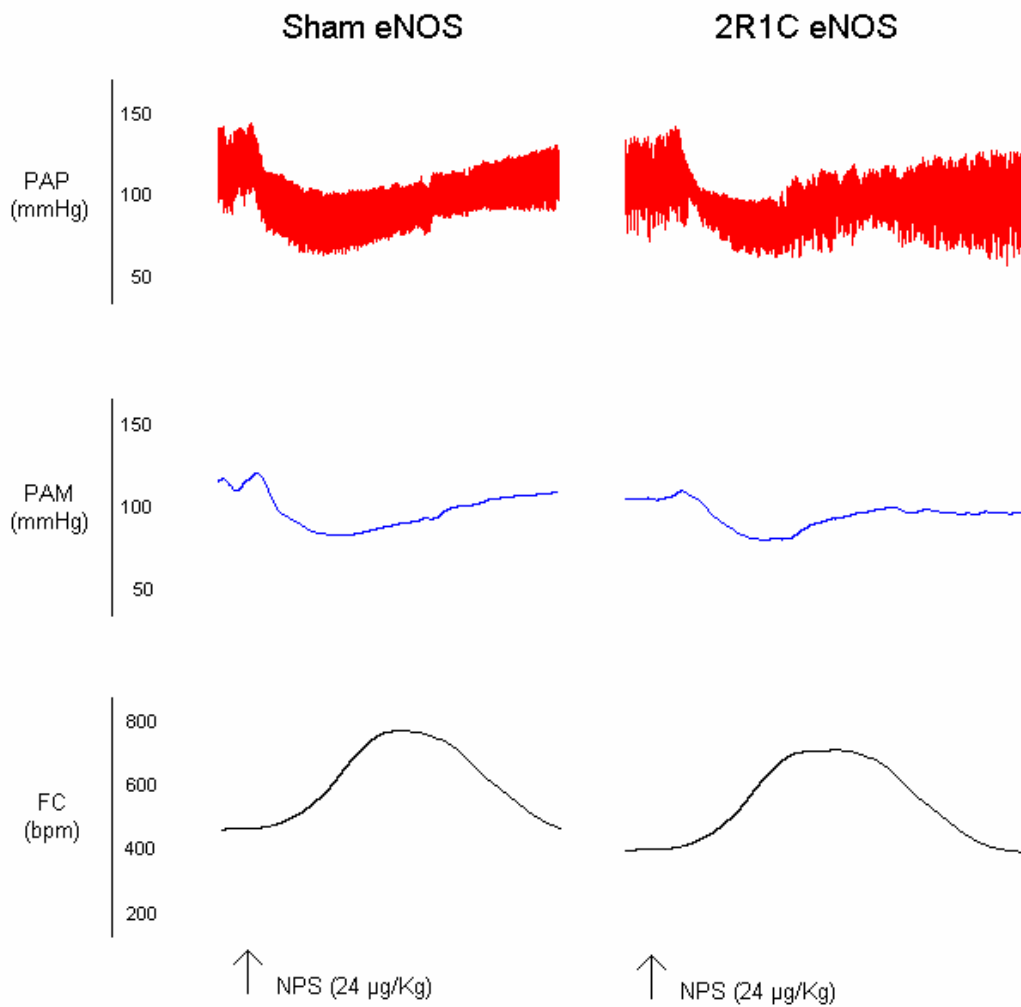


Figura 29 – Variações reflexas de frequência cardíaca frente às variações de pressão arterial induzidas por nitroprussiato de sódio nos grupos 2R1C βgal e 2R1C eNOS

4.4) Análise da Expressão Gênica da eNOS

A superexpressão gênica da óxido nítrico sintase endotelial foi confirmada através da técnica de imunohistoquímica. E como podemos perceber nas figuras abaixo, o animal sham que recebeu o adenovírus que expressa a eNOS apresenta maior expressão desta enzima no fígado e nos rins, quando comparado ao animal sham que recebeu o adenovírus que expressa a β -galactosidase.

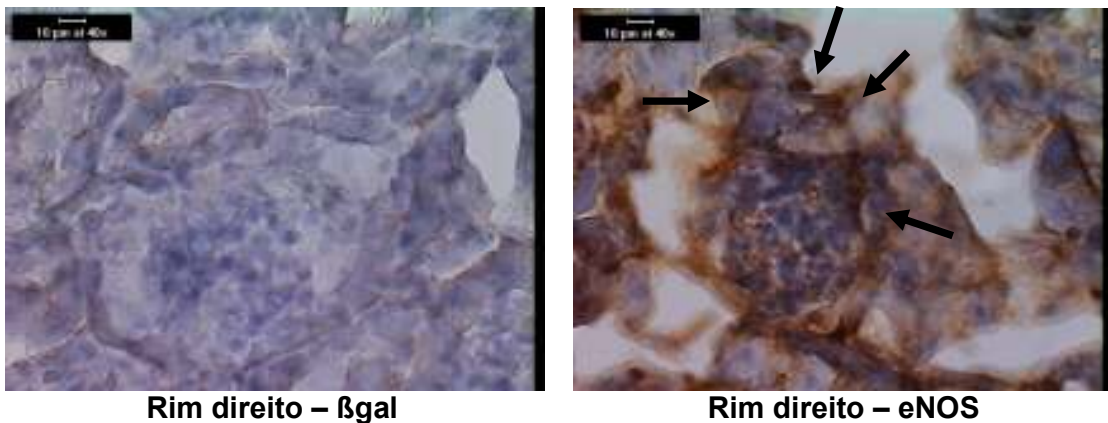
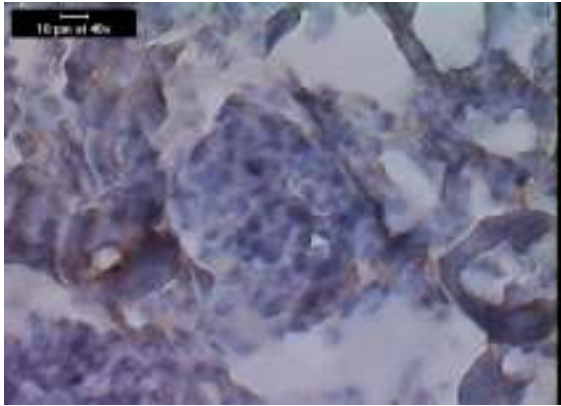
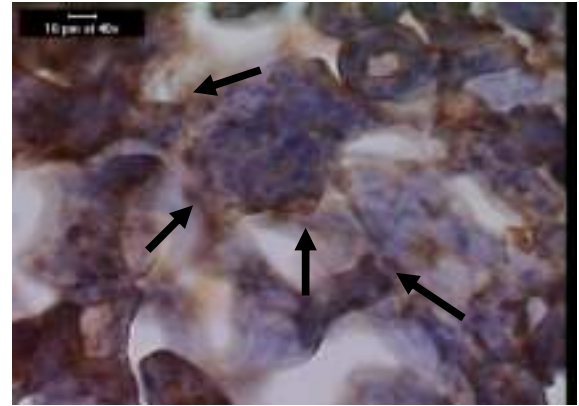


Figura 30 – Fotomicrografias da imunohistoquímica do rim direito do animal sham que recebeu o adenovírus que expressa a β -galactosidase e do animal sham que recebeu o vírus que expressa a eNOS. As setas indicam locais de expressão da eNOS. Aumento de 400 X

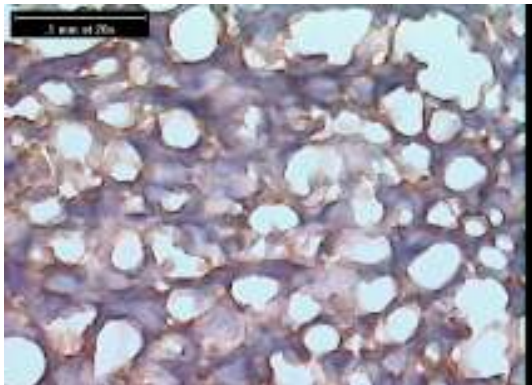


Rim Esquerdo - β gal

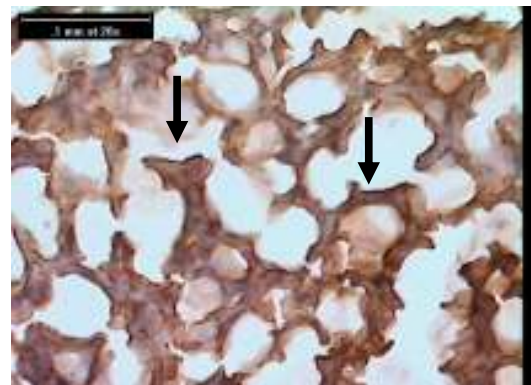


Rim Esquerdo - eNOS

Figura 31 – Fotomicrografias da imunohistoquímica do rim esquerdo do animal sham que recebeu o adenovírus que expressa a β -galactosidase e do animal sham que recebeu o vírus que expressa a eNOS. As setas indicam o local de expressão da eNOS. Aumento 400 X.



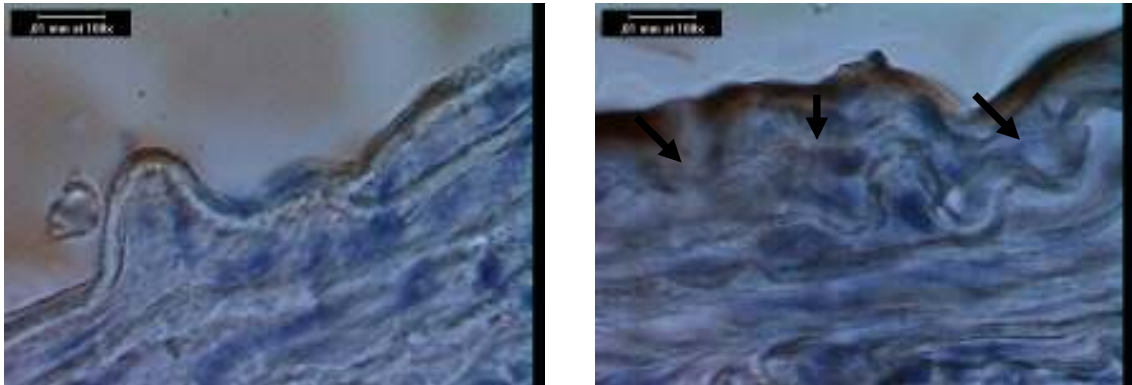
Fígado - β gal



Fígado- eNOS

Figura 32– Fotomicrografias da imunohistoquímica do fígado do animal sham que recebeu o adenovírus que expressa a β -galactosidase e do animal que

sham recebeu o vírus que expressa a eNOS. As setas indicam locais de



expressão da eNOS. Aumento de 200 X

Arco aórtico – β gal

Arco aórtico - eNOS

Figura 33 – Fotomicrografias da imunohistoquímica do arco aórtico do animal que recebeu o adenovírus β -galactosidase e do animal que recebeu o adenovírus eNOS. As setas indicam locais de expressão da eNOS. Aumento de 100X

No entanto, no ventrículo dos animais que receberam o adenovírus eNOS, a expressão é a mesma que nos animais que receberam o adenovírus β -galactosidase. Este resultado pode ser observado abaixo.



Ventrículo Esquerdo – β gal

Ventrículo Esquerdo - eNOS

Figura 34 – Fotomicrografias da imunohistoquímica do ventrículo esquerdo do

animal sham que recebeu o adenovírus que expressa a β -galactosidase e do animal sham que recebeu o vírus que expressa a eNOS. Aumento de 1000 X

DISCUSSÃO

O resultado mais importante de nosso estudo diz respeito à prevenção da hipertensão arterial nos animais 2R1C eNOS.

A idéia de se utilizar genes para o tratamento de doenças foi discutida pela primeira vez em 1966 em um simpósio na Universidade de Columbia, o qual se intitulava “Reflexões sobre a pesquisa e o futuro da medicina”. No ano posterior, Tatum e colaboradores (1967) publicaram um livro com as bases genéticas sobre como funcionaria a terapia gênica. Desde então, vários estudos foram desenvolvidos utilizando a transferência gênica seja para a prevenção e/ou tratamento de doenças, ou para estudar a função modulatória de uma determinada proteína sobre o organismo.

No sistema cardiovascular, a terapia gênica tem sido muito utilizada no infarto do miocárdio (Most et al., 2004), aterosclerose (Benoit et al., 1999) e reestenose após angioplastia (Varenne et al., 1998). Entretanto, poucos estudos avaliaram o efeito da terapia gênica na hipertensão arterial.

A hipertensão arterial é uma doença poligênica, causada tanto por fatores ambientais quanto por fatores genéticos, fato este que dificulta a utilização da terapia gênica nesta patologia. Entretanto, a superexpressão de genes vasodilatadores ou a inibição da expressão de genes vasoconstritores têm sido eficaz no tratamento e prevenção da hipertensão arterial.

O primeiro trabalho experimental que utilizou a terapia gênica para tratamento da hipertensão arterial foi realizado em 1995 por Wang e colaboradores. Utilizando um plasmídeo de DNA, este grupo produziu a

superprodução da calicreína em ratos SHR, e através desta técnica conseguiu reduzir os níveis de pressão arterial sistólica. (Wang et al., 1995). No mesmo modelo de hipertensão arterial utilizado no nosso estudo (2R1C), Yayama et al (1998) fizeram uso da administração sistêmica do adenovírus que superexpressa a calicreína. E assim, como no nosso trabalho, o desenvolvimento da hipertensão foi prevenido pela superprodução deste vasodilatador. Em 1997, Lin e colaboradores demonstraram uma redução do desenvolvimento da hipertensão após a administração da óxido nítrico sintase endotelial em ratos SHR. Estes dados corroboram nossos resultados, qual a superexpressão de um vasodilatador foi capaz de prevenir a hipertensão arterial.

Quanto ao vetor utilizado, em nosso estudo utilizamos o adenovírus. Existem na literatura outros estudos que utilizaram adenovírus como vetor para terapia gênica na hipertensão. Wang et al (2000) utilizaram adenovírus para superexpressar a adrenomedulina, a qual é uma molécula vasodilatadora, e obtiveram sucesso na terapia gênica para hipertensão no modelo experimental DOCA-sal. Entretanto, outros tipos de vetores, sejam eles virais ou não virais, parecem também funcionar na terapia gênica para hipertensão arterial. Em um estudo publicado em 2001, Kimura e colaboradores utilizaram um vetor adenoassociado pra expressão de um antisense para o angiotensinogênio e obtiveram sucesso na redução da pressão arterial. Utilizando retrovírus, Wang et al. (2000) provocaram a superexpressão de um antisense para a enzima conversora angiotensina e também conseguiram reduzir a pressão arterial em ratos SHR. Um outro estudo utilizou lipossomos para superexpressar o

antisense para o receptor β_1 e reduziu a pressão arterial em ratos SHR (Zhang et al., 2000). Assim sendo, independente do vetor utilizado, a terapia gênica têm se mostrado uma ferramenta eficaz no tratamento da hipertensão arterial.

Em nosso estudo, utilizamos a via de administração endovenosa para injeção do adenovírus, e dessa maneira conseguimos obter sucesso na prevenção da hipertensão arterial. Entretanto, outros estudos utilizando terapia gênica também obtiveram sucesso na prevenção ou tratamento da hipertensão arterial fazendo uso de outras vias de administração do gene desejado. Xiong e colaboradores (1995) utilizaram via intramuscular para injeção de plasmídeo de DNA que expressava o gene da calicreína. A superexpressão deste gene foi eficaz e diminuiu os valores de pressão arterial sistólica em ratos SHR. Em um outro trabalho publicado em 2000 (Wang et al.), foi utilizada uma única injeção intracardíaca de um oligonucleotídeo antisense para a enzima conversora de angiotensina com o objetivo de tratar a hipertensão arterial e a terapia foi eficaz. Assim sendo, outras vias de administração dos vetores senão a via endovenosa também se mostraram eficientes no tratamento da hipertensão arterial.

Em relação à produção da hipertensão renovascular, podemos dizer que a nossa técnica foi eficaz. Os camundongos isogênicos utilizados, assim como os humanos, possuem somente um gene para a produção de renina. Assim sendo, nosso modelo experimental de hipertensão se assemelha ao modelo de hipertensão renovascular em humanos (Field e Gross, 1985). Existem na literatura poucos trabalhos que utilizam o modelo de hipertensão experimental 2R1C em camundongos. O primeiro trabalho que utilizou esta técnica em

camundongos C57 foi desenvolvido por Wiesel e colaboradores (1997), e nele foram testados diferentes aberturas do clipe, que variavam entre 0,04 e 0,18 mm. Neste trabalho foi demonstrado que aberturas de clipe menores que 0,10 mm resultavam em infarto do rim clipado, enquanto que aberturas maiores que 0,13 mm não resultavam em aumento da pressão arterial. A abertura do clipe que produziu melhores resultados foi de 0,12mm, calibração que utilizamos em nosso estudo. O fato de utilizarmos cliques industrializados nos dá maior segurança, pois a abertura é a mesma pra todos os cliques. Outro aspecto interessante que não podemos deixar de levantar é que 15 dias após a colocação do clipe os animais 2R1C β gal apresentam os mesmos valores de pressão arterial que os animais com 28 dias de colocação do clipe. Este resultado encontra-se de acordo com a literatura, Cervenka e colaboradores (2002) demonstraram que ao 14º dia de colocação do clipe os valores pressóricos já são os mesmos que ao 28º dia. Este resultado também aparece no trabalho publicado por Wiesel et al. (1997), inclusive utilizando a mesma abertura do clipe que utilizamos em nossos experimentos. É importante ressaltar que a injeção sistêmica do adenovírus Ad β gal mostrou-se inerte nos animais testados, uma vez que os valores de pressão arterial do grupo 2R1C β gal foram iguais aos valores de animais submetidos à hipertensão renovascular sem a utilização de terapia gênica (Peotta et al., 2004). Não ocorreram episódios de óbito após a administração do adenovírus tanto do Ad eNOS quanto do Ad β gal, sugerindo que a mesma foi segura e não gerou toxicidade. Trabalhos anteriores já utilizaram dose igual ou maior que a utilizada em nosso estudo (1×10^{10} pfu) e mostraram expressão satisfatória

sem problemas inflamatórios ou tóxicos decorrentes da administração do adenovírus (Waki et al., 2003; Chu et al., 2003).

Estudos anteriores (Wiesel et al., 1997) demonstraram que em camundongos, duas semanas após a colocação do clipe, os níveis de renina encontram-se elevados no rim clipado e normais no rim contralateral e que quatro semanas após a colocação do clipe os níveis plasmáticos de renina ainda encontram-se elevados. Apesar de não termos medido os níveis de expressão da renina, podemos especular que a prevenção da hipertensão arterial pode ter acontecido devido a uma inibição direta da síntese desta enzima, já que outros autores já demonstraram que o óxido nítrico pode inibir a produção de renina (Gambaryan et al., 1996). Porém, não podemos comprovar que este seja o mecanismo pelo qual ocorra prevenção da hipertensão, já que não medimos os níveis plasmáticos nem de renina, nem de angiotensina II.

A hipótese mais provável é de que os efeitos vasodilatadores do óxido nítrico estejam contrabalançando os efeitos vasoconstritores da angiotensina II. Provavelmente o óxido nítrico atue sobre as veias causando venodilatação e conseqüentemente diminuindo débito cardíaco e também sobre as artérias, levando a uma diminuição da resistência vascular periférica. A redução destes parâmetros provavelmente levou à diminuição da pressão arterial.

Como esperado, os animais sham eNOS e 2R1C eNOS apresentaram os mesmos valores de pressão arterial, indicando que a superexpressão da eNOS nos animais controles não provoca queda da pressão arterial basal. Estes animais encontram-se em situação fisiológica normal em relação aos níveis de pressão arterial e uma superprodução de óxido nítrico provavelmente

não tenha afetado os valores de pressão arterial devido à ativação de mecanismos compensatórios. De acordo com os nossos resultados, Gouvêa e colaboradores demonstraram em 2003 que o tratamento com L-arginina, substrato para a formação do NO, diminui os valores de pressão arterial em ratos com hipertensão renovascular, mas não altera este parâmetro em ratos normotensos. Desta forma, a superprodução de óxido nítrico em animais controles parece não alterar os valores de pressão arterial basal.

Ao contrário do que é observado no modelo 2R1C em ratos, em camundongos, os animais hipertensos apresentam taquicardia. Este resultado já foi demonstrado por outros autores anteriormente, seja 14 ou 28 dias após a indução da hipertensão renovascular (Wiesel et al., 1997; Madeddu et al., 1998, Peotta et al., 2004). Esta é uma característica do modelo 2R1C em camundongos e talvez possa ser explicada devido à predominância do tônus simpático basal nestes animais (Jumrussirikul et al., 1998; Wickman et al., 1998; Janssen et al., 2000). Some-se a isso, a hipertensão 2R1C que é dependente de angiotensina II, sendo que esta aumenta a atividade simpática (Kobayashi et al., 1978), provavelmente, seja este o motivo pelo qual os camundongos com hipertensão renovascular 2R1C desenvolvem taquicardia.

Entretanto, os animais 2R1C eNOS não apresentam taquicardia. Provavelmente o óxido nítrico possa inibir ou contrabalançar os efeitos simpatoexcitatórios da angiotensina II, e por isso, os animais que recebem a terapia gênica com eNOS não tenham se tornado taquicárdicos.

Os animais sham eNOS apresentam os mesmos valores de frequência cardíaca que os grupos sham glicerol/ β gal e 2R1C eNOS, indicando que a

superprodução do óxido nítrico não provoca alterações nos valores basais de frequência cardíaca. Apesar da investigação de diversos estudos sobre os efeitos do óxido nítrico sobre as condições basais de frequência cardíaca, os resultados ainda permanecem controversos. Em cultura de miócitos ventriculares neonatais, análogos do GMPc ou NO derivado das NO sintases endógenas possuem efeito cronotrópico negativo, reduzindo a frequência cardíaca (Balligand et al., 1993). Trabalhos utilizando camundongos eNOS knockout mostraram tanto aumento (Barouch et al., 2002) quanto diminuição da frequência cardíaca basal (Shesely et al. 1996; Kojda et al. 1999; Yang et al. 1999; Liu et al., 2002). O verdadeiro efeito da superprodução de óxido nítrico sobre a frequência cardíaca basal dos camundongos ainda permanece indefinido e serão necessários mais estudos pra esclarecer esta questão.

Em relação aos valores da relação peso cardíaco/peso corporal, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no índice de hipertrofia cardíaca. Entretanto, observamos em nossos resultados uma tendência à hipertrofia cardíaca nos animais 2R1C β gal e 2R1C eNOS. Dados de nosso laboratório (Peotta et al, 2004) já demonstraram que 28 dias após a indução da hipertensão renovascular, os camundongos que receberam o clipe apresentam uma alteração deste parâmetro. Estudos anteriores também já demonstraram que o modelo 2R1C em camundongos apresenta hipertrofia cardíaca ao 28º dia de colocação do clipe (Wiesel et al., 1997; Cervenka et al., 2002).

Estudos anteriores demonstraram que o tempo ótimo de expressão do gene carregado pelo adenovírus é cerca de uma semana após sua

administração (Meyrelles et al., 1997), portanto, em nosso estudo, nós interrompemos a hipertensão 15 dias após a colocação do clipe, pois ao 28º dia a expressão do adenovírus seria menor que no 15º dia. Talvez por isso os nossos valores de relação peso cardíaco/peso corporal não tenham mostrado uma diferença estatisticamente significativa. Somente um estudo mediu o peso cardíaco aos 15 dias de hipertensão renovascular, e este grupo (Madeddu et al., 1998) encontrou hipertrofia cardíaca nos camundongos 2R1C. Entretanto, neste estudo foram utilizados animais híbridos (C57BL/6J x 129 Sv) geneticamente modificados para o gene da bradicinina, fato este que pode explicar a presença de hipertrofia cardíaca aos 15 dias de hipertensão renovascular. Esta tendência à hipertrofia cardíaca encontrada em nosso estudo provavelmente se deva às ações estimulatórias da angiotensina II sobre a síntese de proteínas e DNA em células cardíacas via receptores AT₁ (Sadoshima e Izumo, 1993), já que o grupo 2R1C eNOS também apresenta um aumento deste parâmetro e possui níveis pressóricos normais. Este fato reforça a idéia de que o óxido nítrico não esteja interferindo na síntese de angiotensina II, e sim, contrabalançando os efeitos vasoconstritores da mesma, prevenindo assim, o desenvolvimento da hipertensão.

Em relação à hipertrofia renal, o resultado apresentado já era esperado, ou seja, a atrofia do rim esquerdo e hipertrofia do rim direito são conseqüências já bem estabelecidas deste modelo de hipertensão arterial e já foi demonstrado por outros autores em ratos e cães (Goldblatt et al., 1934; Miksche et al., 1970), sendo que este resultado também é válido para camundongos (Wiesel et al., 1997). A atrofia do rim esquerdo ocorre devido à diminuição de fluxo sanguíneo

para o mesmo, e a hipertrofia do rim direito ocorre devido ao fato deste rim ter que filtrar todo o volume que deixa de ser filtrado pelo rim estenosado, gerando assim, hipertrofia. Todavia, não houve diferença no tamanho dos rins esquerdo e direito entre os grupos 2R1C β gal e 2R1C eNOS, provando então, que a superexpressão desta última enzima não altera o estímulo mecânico para produção da hipertensão renovascular.

Uma vez que a superprodução do óxido nítrico preveniu o desenvolvimento da hipertensão renovascular, nossa hipótese era de que ela também poderia prevenir uma possível alteração do barorreflexo causada pela hipertensão arterial. Entretanto, quinze dias após a indução da hipertensão renovascular ainda não havia alteração do barorreflexo nos animais hipertensos. Provavelmente por não haver tempo suficiente de hipertensão para provocar alterações nos barorreceptores destes animais, uma vez que já foi demonstrado que em camundongos, a hipertensão renovascular se estabelece somente 10 dias após a colocação do clipe (Cervenka et al., 2002). Peotta et al. (2004) demonstraram que, 28 dias após a colocação do clipe, os camundongos apresentam uma resposta bradicárdica exagerada frente aos aumentos de pressão arterial induzidos por fenilefrina, assim como uma resposta taquicárdica reflexa atenuada frente às diminuições de pressão arterial induzidas por nitroprussiato de sódio.

Para a nossa surpresa, os animais 2R1C eNOS apresentaram uma resposta bradicárdica reflexa diminuída frente aos aumentos de pressão arterial, e uma resposta taquicárdica reflexa aumentada frente às diminuições

de pressão arterial. Estaria então, o NO por si só, provocando alterações no barorreflexo arterial?

Esta pergunta foi respondida com o teste do barorreflexo no grupo sham eNOS, uma vez que estes animais não possuíam alterações no sistema renina angiotensina, e mesmo assim, apresentavam a mesma alteração no barorreflexo que os animais 2R1C eNOS. Assim sendo, a superprodução do óxido nítrico tanto no grupo sham eNOS quanto no grupo 2R1C eNOS modificou o barorreflexo arterial destes animais.

Um estudo realizado por Meyrelles et al (2003) mostrou claramente os efeitos modulatórios do óxido nítrico sobre o sistema dos barorreceptores. Neste estudo foi feita uma aplicação tópica do adenovírus que expressa a eNOS no seio carotídeo dos animais e nestes foi verificado que havia uma diminuição da atividade dos barorreceptores.

O óxido nítrico parece atuar de maneira inibitória sobre os canais de sódio voltagem dependentes ativados por estiramento dos barorreceptores (Bielefeldt et al., 1999, Li et al., 1998). Além disto, o óxido nítrico ativa canais de potássio dependentes de cálcio, provocando hiperpolarização da membrana e dificultando o disparo do potencial de ação (Bolotina et al., 1994). Desta forma, o óxido nítrico inibe a atividade dos baroceptores. Esta teoria poderia explicar porque os nossos animais 2R1C eNOS apresentam um menor resposta bradicárdica reflexa. Como a sensibilidade aferente barorreceptora está diminuída, ao se aumentar a pressão arterial, menos potenciais de ação são enviados aos NTS do que quando os barorreceptores estão funcionando

normalmente. Como o NTS é menos ativado, temos uma menor resposta eferente de bradicardia.

Para as diminuições de pressão, o mesmo mecanismo ocorreria. Como temos um menor número de canais ativados, quando injetamos nitroprussiato de sódio, proporcionalmente temos uma queda de pressão arterial que é interpretada como sendo maior que na situação normal, pois percentualmente temos desativação de um maior número de canais. Assim, observamos uma resposta taquicárdica reflexa exagerada. Além disto, estudos já demonstraram que o óxido nítrico é capaz de facilitar a neurotransmissão nos gânglios simpáticos (Matsuda et al., 1995), fato este que explicaria a resposta taquicárdica aumentada.

Apesar de não termos comprovado a expressão do adenovírus no SNC, não podemos descartar a hipótese de que o adenovírus tenha exercido ação central. Moon e colaboradores realizaram um estudo publicado em 2003 para identificar a distribuição do adenovírus no SNC após injeção sistêmica. O adenovírus utilizado neste estudo é bem semelhante ao nosso e, apesar deste vírus ser maior que o poro da barreira hematoencefálica, o adenovírus foi encontrado em regiões do SNC. Portanto, não podemos descartar os efeitos centrais do óxido nítrico.

Diversos estudos já comprovaram a ação inibitória do óxido nítrico sobre o SNC. Matsumura e colaboradores demonstraram em 1998 que a inibição central do óxido nítrico através da injeção intracerebroventricular de L-NAME gerou um aumento da sensibilidade do barorreflexo para a frequência cardíaca

e atividade do nervo simpático renal, indicando que o óxido nítrico exerce um efeito inibitório sobre o barorreflexo.

Esta ação inibitória do óxido nítrico sobre o barorreflexo parece ocorrer tanto sobre o sistema nervoso parassimpático quanto o sistema nervoso simpático.

Em relação ao componente parassimpático do reflexo, Liu et al. (1996) demonstraram em coelhos acordados, que a injeção de L-NNA leva a um aumento do ganho do barorreflexo, e este aumento foi revertido pela injeção de L-arginina. Neste estudo, o bloqueio com atropina preveniu o aumento de sensibilidade do barorreflexo, enquanto que o bloqueio com metoprolol não gerou nenhuma alteração da resposta, confirmando então que o óxido nítrico atenua o componente vagal do barorreflexo. Este estudo está em concordância com nossos dados, já que os animais 2R1C eNOS possuem uma resposta bradicárdica diminuída quando comparados aos animais Sham glicerol/ β gal e 2R1C β gal.

Assim como o NO inibe o componente vagal do reflexo, no SNC ele também parece possuir ações simpatoinibitórias. Um trabalho realizado por Zanzinger e colaboradores (1995) demonstrou que em gatos a administração de L-NNA (bloqueador da síntese de óxido nítrico) leva a um aumento do tônus simpático basal e das respostas reflexas, indicando que o óxido nítrico parece exercer um papel inibitório sobre o este núcleo.

Contrariando os trabalhos acima citados, Kishi e colaboradores demonstraram em 2003 que a superexpressão da eNOS em RVLM provoca melhora no controle barorreflexo da pressão arterial em ratos SHR Stroke

Prone. Após o bloqueio com metoprolol, o ganho máximo não diferiu entre os grupos, indicando que o efeito de melhora do barorreflexo se deve a um efeito simpatoinibitório do óxido nítrico em RVLM. De acordo com este trabalho, Wang e colaboradores (2003) mostraram que a transferência gênica de nNOS em RVLM melhora o barorreflexo em ratos com insuficiência cardíaca.

Entretanto, nestes dois últimos trabalhos foi utilizada a terapia com NO em situações patológicas, nas quais o barorreflexo já está prejudicado. Assim, devemos ter cuidado ao extrapolar estes dados pra a situação fisiológica.

Assim sendo, podemos especular então que as ações periféricas do óxido nítrico se sobrepõem às ações centrais do mesmo em nosso estudo, já que encontramos um aumento da resposta taquicárdica reflexa.

Um aspecto interessante a se levantar é o fato de que no modelo de hipertensão experimental L-NAME, que é exatamente a situação oposta de nosso estudo, uma inibição crônica da síntese de óxido nítrico, Vasquez e colaboradores (1994) demonstraram que o barorreflexo encontra-se exatamente na situação oposta à nossa, ou seja, com seu componente parassimpático aumentado e o simpático diminuído. Este resultado também é encontrado quando se usa este modelo experimental de hipertensão em camundongos. Peotta e colaboradores (2001) também demonstraram um aumento da resposta simpática e diminuição da resposta parassimpática em camundongos com hipertensão L-NAME. Este fato está de extrema concordância com o nosso, já que na superexpressão de eNOS encontramos exatamente a resposta contrária, ou seja, diminuição da resposta parassimpática e aumento da atividade simpática. Além disto, a injeção

sistêmica de L-NAME leva a um aumento do ganho de barorreflexo, que pode ser revertido pela injeção de NPS (Minami et al., 1995). Estas são fortes evidências do papel inibitório do óxido nítrico sobre o componente parassimpático e estimulatório sobre o componente simpático do barorreflexo.

Nossos resultados da imunohistoquímica mostraram uma maior expressão da eNOS nos rins direito e esquerdo, no fígado e no arco aórtico dos animais sham eNOS quando comparados aos animais sham β gal. Este resultado já era esperado, pois estes os animais receberam uma injeção endovenosa do adenovírus Ad eNOS, e, portanto, devem ter maior expressão desta enzima. Com isso comprovamos que a injeção endovenosa do adenovírus é eficaz para a superexpressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial. Outros trabalhos já comprovaram uma superexpressão do adenovírus que expressa a eNOS após injeção intravenosa do mesmo (Hayashi et al., 2004).

Um aspecto interessante é que no ventrículo dos animais eNOS a expressão é a mesma que no ventrículo dos animais β gal; Este resultado não era esperado, entretanto, outros trabalhos na literatura já haviam feito esta observação. Wang e colaboradores (1995) utilizaram injeção endovenosa de adenovírus e não encontraram expressão nem no coração nem no cérebro dos animais. Este resultado também foi observado por Stratford-Perricaudet et al (1992), no qual a injeção endovenosa de adenovírus em camundongos não resultou em expressão no tecido cardíaco. Provavelmente o miocárdio deve possuir menor quantidade de receptores adenovirais, fato este que diminui transdução celular neste tecido. Este dado reforça a idéia de que o óxido nítrico

não esteja interferindo na prevenção da taquicardia nos animais 2R1C eNOS via ação local no miocárdio e sim, via ação simpatoinibitória central.

Diante de nossos resultados, podemos afirmar que a terapia gênica com eNOS constitui uma importante ferramenta na prevenção da hipertensão renovascular em camundongos.

CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados podemos concluir que:

- Quinze dias após a colocação do clipe, os animais hipertensos não apresentaram hipertrofia cardíaca nem alterações no barorreflexo arterial;
- A superexpressão da eNOS por meio da terapia gênica foi capaz de prevenir o desenvolvimento da hipertensão renovascular nos camundongos;
- A terapia gênica com eNOS diminuiu a resposta bradicárdica reflexa e aumentou a resposta taquicárdica reflexa frente às variações de pressão arterial nos animais 2R1C;
- A superexpressão da eNOS nos animais sham não modificou os parâmetros hemodinâmicos destes animais, mas modificou as respostas do barorreflexo similar aos animais 2R1C;

Portanto, a terapia gênica com eNOS apesar de ter sido um método eficaz para prevenir o desenvolvimento da hipertensão renovascular em camundongos, também causou alterações no sistema do barorreflexo arterial destes animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW & Michel T (1993). Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A*, 90:347–351.

Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE & Hare JM (2002). Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*, 416:337–339.

Benoit P, Emmanuel F, Cailland JM, Bassinet L, Castro G, Gallix P, Fruchart JC, Branellec D, Den P, Duverger N (1999). Somatic gene transfer of human Apo A1 inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation*, 99:105-110

Bielefeldt K, Whiteis CA, Chappleau MW, Abboud FM (1999). Nitric oxide enhances slow inactivation of voltage-dependent sodium currents in rat nodose neurons. *Neuroscience Letters*, 271:159-162

Bolotina VM, Najibi S, Palaccino JJ, Pagano JP, Cohen RA (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368:850-853

Castro R, Phillips MI (1986). Angiotensin II attenuates baroreflexes at nucleus tractus solitarius of rats. *American Journal of Physiology*, 250:R193-R198

Chalmers J, Pilowsky P (1991). Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. *Journal of Hypertension*, 9:675-694

Cervenka L, Horacek V, Vaneckova I, Hubacek JA, Oliverio MI, Coffman TM, Navar G (2002). Essential role of AT_{1A} receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension*, 40:735-741

Chiu T, Reid IA (1996). Role of cyclic CMP-inhinbitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, 278:793-799

Chu Y, Iida S, Lund DD, Weiss RM, DiBona GF, Watanabe Y, Faraci FM, Heistad DD (2003). Gene Transfer of Extracellular Superoxide Dismutase Reduces Arterial Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Circulation Research*, 92: 461-468

Durante W, Sen AK, Sunahara FA (1988). Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *British Journal of Pharmacology*, 94(2): 463-468

Field LJ, Gross KW (1985). *Ren-1* and *Ren-2* loci are expressed in mouse kidney. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, 82: 6196-6200

Gambaryan S, Hausler T, Markert T, Pohler D, Jarchau T, Walter U, Haase W, Kurtz A, Lohmann SM (1996). Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *Journal of Clinical Investigation*, 98:662-670

Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RM, Moncada S (1990). Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. *British Journal of Pharmacology*, 101(1): 10-12

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal R (1934). Studies on experimental hypertension: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *Journal of Experimental Medicine*, 59:347:37

Gouvêa SA, Moysés MR, Bissoli NS, Pires JGP, Cabral AM, Abreu GR (2003). Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36:943-040

Harada S, Tokunaga S, Momohara M (1993). Inhibition of nitric oxide formation in the nucleus tractus solitarius increases renal sympathetic nerve activity in rabbits. *Circulation Research*, 72:511-516

Hayashi T, Sumi D, Juliet PAR, Hirai HM, Tanaka YA, Kano H, Fukatsu A, Tsunekawa T, Miyazaki A, Iguchi A, Ignarro LJ (2004). Gene transfer of

endothelial NO synthase, but not eNOS plus inducible NOS, regressed atherosclerosis in rabbits. *Cardiovascular Research*, 61:339-351

Head GA, Saigusa T, Mayorov DN (2002). Angiotensin II and baroreflex control of the circulation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(9):1047-1059

Ichiki T, Usui M, Kato M, Funakoshi Y, Ito K, Egashira K, Takeshita A (1998). Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension*, 31:342:348

Janssen BJA, Leenders PJA, Smits JFM (2000). Short-term and long-term blood pressure and heart rate variability in the mouse. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 278:R215-R225.

Jensen BL, Krämer BK, Kurtz A (1997). Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension*, 29:1148-1155

Jumrussirikul P, Dinerman J, Dawson TM, Dawson VL, Ekelund U, Georgakopoulos D, Schramm LP, Calkins H, Snyder SH, Hare JM, Berger RD (1998). Interaction between neuronal nitric oxide synthase and inhibitory G

protein activity in heart rate regulation in conscious mice. *Journal of Clinical Investigation*, 102:1279-1285.

Katovich MJ, Gelband CH, Reaves P, Wang HW, Raizada MK (1999). Reversal of Hypertension by Angiotensin Type II Receptor Antisense Gene Therapy in Adult SHR. *American Journal of Physiology*, 277: H1260-1264

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*, 7:33-34

Kimura B, Mohuczy D, Tang X, Phillips I (2001). Attenuation of hypertension and heart hypertrophy by adeno-associated virus delivering angiotensinogen antisense. *Hypertension*, 37: 742-749

Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Sakai K, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A (2003). Overexpression of eNOS in RVLM improves impaired baroreflex control of HR in SHRSP. Rostral ventrolateral medulla. Stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 41:255-60

Kobayashi M, Furukawa Y, Chiba S (1978). Positive chronotropic and inotropic effects of angiotensin II in the dog heart. *European Journal of Pharmacology*, 50:17-25.

Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S, Kent JD, Kurz S, Burchfield J, Shesely EG, Harrison DG (1999). Protein expression, vascular reactivity and soluble

guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovascular Research*, 42:206–213.

Kurtz A (1989). Cellular control of renin secretion. *Reviews in Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 113:1-40

Li Z, Chapleau MW, Bates JN, Bielefeldt K, Lee HC, Abboud FM (1998). Nitric oxide as an autocrine regulator of sodium currents in baroreceptor neurons. *Neuron*, 20:1039-1049

Lin KF, Chao L, Chao J (1997). Prolonged reduction of high blood pressure with human nitric oxide synthase delivery. *Hypertension*, 30:307-313

Liu YH, Xu J, Yang JP, Yang F, Shesely E & Carretero OA (2002). Effect of ACE inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists on endothelial NO synthase knockout mice with heart failure. *Hypertension*, 39:375–381.

Liu JL, Murakami H, Zucker IH (1996). Effects of NO on baroreflex control of heart rate and renal nerve activity in conscious rabbits. *American Journal of Physiology*, 270:R1361-R1370

Lockette W, Otsuka Y, Carretero O (1986). The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension*, 8(6 Pt 2):1161-66.

Madeddu P, Milia AF, Salis B, Gaspa L, Gross W, Lippoldt A, Emanuelli C (1998). Renovascular hypertension in bradykinin B₂-receptor knockout mice. *Hypertension*, 32:503-509

Matsuda T, Bates JN, Lewis FM, Abboud FM, Chapleau MW (1995). Modulation of baroreceptor activity by nitric oxide and S-nitrosocysteine. *Circulation Research*, 76:426-433

Matsumura K, Abe I, Tsuchihashi T, Fujishima M (1998). Central nitric oxide attenuates the baroreceptor reflex in conscious rabbits. *American Journal of Physiology*, 274:R1142-49

Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, Bouzourene K, Aubert JF, Hao H, Vallet V, Brunner HR, Nussberger J, Gabbiani G, Hayoz D (2004) Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice. *Hypertension*, 44(3):277-282

Meyrelles SS, Sharma RV, Whiteis CA, Davidson BL, Chapleau MW (1997). Adenovirus-mediated gene transfer to cultured nodose sensory neurons. *Molecular Brain Research*, 51(1-2):33-41

Meyrelles SS, Sharma RV, Mao HZ, Abboud FM, Chapleau MW (2003). Modulation of baroreceptor activity by gene transfer of nitric oxide to carotid sinus adventitia. *American Journal of Physiology*, 284:R1190-R1198

Miksche LW, Miksche U, Gross F (1970). Effect of sodium restriction on renal hypertension and on renin activity in the rat. *Circulation Research*, 27:973-984

Minami M, Imai Y, Hashimoto J, Abe K (1995). The role of nitric oxide in the baroreceptor cardiac reflex in conscious Wistar rats. *American Journal of Physiology*, 269:H851-H855

Moon C, Moon C, Kang WS, Jeong DC, Jin JY (2003). Distribution of adenoviral vector in brain after intravenous administration. *Journal of Korean Medical Science*, 18:111-118

Most P, Pleger ST, Volkers M, Heidt B, Boerries M, Weichenhan D, Loffler E, Janssen PM, Eckhart AD, Martini J, Williams ML, Katus HA, Remppis A, Koch WJ (2004). Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium. *Journal of Clinical Investigation*, 114(11): 1550-1563

Moyses MR, Cabral AM, Marcal D, Vasquez EC (1994). Sigmoidal curve fitting of baroreceptor sensitivity in renovascular 2K1C hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27(6):1419-1424

Navar LG, Zou L, Von Thun A, Tarng Wang C, Imig JD, Mitchell KD (1998). Unraveling the mystery of Goldblatt hypertension. *News in Physiological Sciences*, 13:170-176

Nishikawa M, Huang L (2001). Non viral vectors in the new millenium: delivery barriers in gene transfer. *Human Gene Therapy*, 12:861-879

Parissis JT, Nikolao VN (2003). Gene Therapy in the management of cardiovascular disease. *Hellenic Journal of Cardiology*, 44:271-276

Paton JF, Kasparov S (2000). Sensory channel specific modulation in the nucleus of the solitary tract. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 80:117-129

Paton JFR, Deuchars J, Amahad Z, Wong LF, Murphy D, Kasparov S (2001). Adenoviral vector demonstrates that angiotensin II-induced depression of the cardiac baroreflex is mediated by endothelial nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Journal of Physiology*, 531:213-225

Peach M (1977) Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiological Reviews*, 57:313-370

Peotta VA, Vasquez EC, Meyrelles SS (2001). Cardiovascular neural reflexes in L-NAME-induced hypertension in mice. *Hypertension*, 38:555-559

Peotta VA, Gava AL, Nogueira BV, Vasquez EC, Meyrelles SS (2004). Avaliação do barorreflexo arterial em camundongos Apo E^{-/-} com hipertensão renovascular. *Resumos da FeSBE*, 73-73

Reis DJ (1999). Functional neuroanatomy of central vasomotor control centers. *In: Hypertension Primer*, 2nd edition, American Heart Association, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp 80-82

Sadoshima JI, Izumo S (1993) Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts:critical role of AT₁ receptor subtype. *Circulation Research*, 73:413-423

Saigusa T, Iriki M, Arita J (1996). Brain angiotensin II tonically modulates sympathetic baroreflex in rabbit ventrolateral medulla. *American Journal of Physiology*, 271:H1015-1021

Saigusa T, Head GA (2002). Renal sympathetic baroreflex effects of angiotensin II infusions into the rostral ventrolateral medulla of the rabbit. *Clinical and Experimental Pharmacolgy and Physiology*, 20:351-354

Saini HK, Xu YJ, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS (2005). Pharmacological basis of different targets for the treatment of atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(4):818-839

Schulz R, Heusch G (2005). Angiotensin II in the failing heart. Short communication. *Kidney & Blood Pressure Research*, 28:349-352

Shapoval LN, Sagach VF, Pobegailo LS (1991). Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. *Neuroscience Letters*, 132:47-50

Sharifi AM, Akbarloo N, Darabi R (2005). Investigation of local ACE activity and structural alterations during development of L-NAME-induced hypertension. *Pharmacological Research*, 52(5): 438-444

Shesely EG, Maeda, N, Kim, HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A*, 93:13176–13181.

Sreeharan N, Jayakody RL, Senaratne MP, Thomson AB, Kappagoda CT (1986). Endothelium-dependent relaxation and experimental atherosclerosis in the rabbit aorta. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 64(11): 1451-1453

Stratford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M, Briand P (1992) Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *Journal of Clinical Investigation*, 90(2):626-630

Takemoto M, Egashira K, Usui M, Numaguchi K, Tomita H, Tsutsui H, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A (1997). Important role of tissue

angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Journal of Clinical Investigation*, 99:278-287

Tatum EL (1967) Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. In: Lyght CE, ed. *Reflections on Research and the Future of Medicine*. New York: McGraw-Hill, 31-49.

Tseng CJ, Liu HY, Lin HC, Ger LP, Tung CS, Yen MH (1996). Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. *Hypertension*, 27:36-42

Varenne O, Pisalaru S, Gillijns H, Van Pelt N, Gerard RD, Zoldhelyi P, Van de Werf F, Collen D, Janssens SP (1998). Local adenovirus-mediated transfer of human eNOS reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs. *Circulation*, 98: 919-926

Vasquez EC, Cunha RS, Cabral AM (1994). Baroreceptor reflex function in rats submitted to chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27:767-774

Verma IM, Somia N (1997). Gene therapy – promises, problems and prospects. *Nature*, 389:244-254

Vicent SR, Kimura H (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46:755-784

Volpers C, Kochanek S (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *The Journal of Gene Medicine*, 6:S164-S171

Waki H, Kasparov S, Wong LF, Murphy D, Shimizu T, Paton JFR (2003). Chronic inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity in nucleus tractus solitarius enhances baroreceptor reflex in conscious rats. *Journal of Physiology*, 546(1):233-242

Wang C, Chao L, Chao J (1995). Direct gene delivery of human tissue kallikrein reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Clinical Investigation*, 95: 1710-1716

Wang H, Reaves PY, Gardon ML, Keene K, Goldberg DS, Gelband CH, Katovich MJ, Raizada MK (2000). Angiotensin I-Converting Enzyme Antisense Gene Therapy Causes Permanent Antihypertensive Effects in the SHR. *Hypertension*, 35 (part 2): 202-208

Wang C, Chao J, Chao L (2000). Adrenomedullin Gene Delivery Attenuates Hypertension, Cardiac Remodeling and Renal Injury in DOCA-Salt Hypertensive Rats. *Hypertension*, 36(6): 999-1001

Wang Y, Patel KP, Cornish KG, Channon KM, Zucker IH (2003) nNOS gene transfer to RVLM improves baroreflex function in rats with chronic heart failure. *American Journal of Physiology*, 285(4):H1660-1667

Wickman K, Nemec J, Gendler SJ, Clapham DE (1998). Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron*, 20:103-114.

Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T (1997). Two kidney, one clip and one kidney one clip hypertension in mice. *Hypertension*, 29:1025-1030

Xiong W, Chao J, Chao L (1995). Muscle delivery of human kallikrein gene reduces blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension*, 25:715-719

Yayama K, Wang C, Chao L, Chao J (1998). Kallikrein gene delivery attenuates hypertension and cardiac hypertrophy and enhances renal function in Goldblatt hypertensive rats. *Hypertension*, 31(5):1104-1110.

Yang XP, Liu YH, Shesely EG, Bulagannawar M, Liu F, Carretero OA (1999). Endothelial nitric oxide gene knockout mice: cardiac phenotypes and the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Hypertension*, 34:24–30.

Zanzinger J, Czazhurski J, Seller H (1995). Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in the RVLM by nitric oxide. *American Journal of Physiology*, 268:R958-R962

Zhang YC, Kimura B, Shen L, Phillips MI (2000). Prolonged Reduction of High Blood Pressure with β 1 Antisense Oligonucleotides. *Hypertension*, 26:767-774