

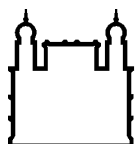
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Avaliação de tirosina hidroxilase e receptor  $\beta_2$  adrenérgico em leucócitos de sangue periférico na hipertensão**

**LINDICE MITIE NISIMURA**

Rio de Janeiro  
Setembro de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Lindice Mitie Nisimura*

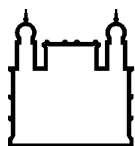
Avaliação de tirosina hidroxilase e receptor  $\beta_2$  adrenérgico em leucócitos de sangue periférico na hipertensão

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

**Orientadores:** Dr<sup>a</sup> Luciana Lopes de Almeida Ribeiro Garzoni  
Dr Eduardo Tibiriçá

**RIO DE JANEIRO**

Setembro de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTOR: LINDICE MITIE NISIMURA***

Avaliação de tirosina hidroxilase e receptor  $\beta_2$  adrenérgico em leucócitos de sangue periférico na hipertensão

**ORIENTADORES: Dr<sup>a</sup> Luciana Lopes de Almeida Ribeiro Garzoni  
Dr Eduardo Tibiriçá**

**Aprovada em: \_19\_/09/\_ 2017\_\_\_\_\_**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. (Presidente) Adriana Ribeiro Silva**

Fundação Oswaldo Cruz/RJ

**Prof. Dr. Roberto Magalhães Saraiva**

Fundação Oswaldo Cruz/RJ

**Prof. Dr<sup>a</sup> Natália Galito Rocha Ayres**

Universidade Federal Fluminense/RJ

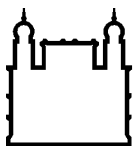
**Prof. Dr. (Suplente) Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque**

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/RJ

**Prof. Dr. (Suplente) Vinícius Frias Carvalho**

Fundação Oswaldo Cruz/RJ

Rio de Janeiro, 19 de Setembro de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

Nisimura, Lindice Mitie .

Avaliação de tirosina hidroxilase e receptor  $\beta$ 2 adrenérgico em leucócitos de sangue periférico na hipertensão / Lindice Mitie Nisimura. - Rio de Janeiro, 2017.

81 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Luciana Ribeiro Garzoni.

Co-orientador: Eduardo Tibiriçá.

Bibliografia: f. 63-77

1. Hipertensão arterial. 2. Hiperatividade simpática. 3. Rato espontaneamente hipertenso. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Esta tese de doutorado foi realizada no Laboratório de Inovações em Terapia, Ensino e Bioprodutos e Laboratório de Investigação Cardiovascular, IOC, Fiocruz, RJ sob orientação da Dr<sup>a</sup> Luciana Ribeiro Garzoni e Dr Eduardo Tibiriçá.

Data de matrícula no Doutorado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: 8 de Agosto de 2013.

*Dedico aos meus pais Cláudio e  
Janeth e ao meu irmão Yoshi por todo  
apoio apesar da distância.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a toda minha família que sempre se preocupou e me auxiliou de todas as formas possíveis.

Aos meus orientadores Dr<sup>a</sup> Luciana Garzoni e Dr. Eduardo Tibiriçá pela paciência e todo ensinamento.

Aos meus amigos que estarão comigo onde eu estiver.

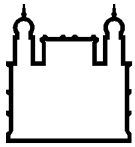
A coordenação do programa de Biologia Celular e Molecular.

Às plataformas tecnológicas.

A todos os animais que contribuíram com este trabalho.

Ao apoio financeiro do Instituto Oswaldo Cruz- IOC- Fiocruz, CnPq e FAPERJ.

Muito obrigada!!!!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

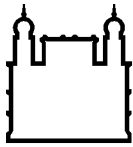
## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Avaliação de tirosina hidroxilase e receptor $\beta_2$ adrenérgico em leucócitos de sangue periférico na hipertensão**

#### **RESUMO**

O sistema nervoso simpático (SNS) desempenha um papel fundamental na fisiopatologia das doenças cardiovasculares. Neste estudo, buscamos investigar moléculas envolvidas na regulação do sistema nervoso simpático, em leucócitos de sangue periférico em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Avaliamos nos leucócitos, a presença da enzima limitante da síntese de catecolaminas - tirosina hidroxilase (TH) – e o receptor  $\beta_2$ -adrenérgico ( $\beta_2$ -AR) bem como, a expressão destes marcadores nos centros reguladores do SNS. Os animais SHR apresentaram como esperado, aumento da pressão sistólica e da frequência cardíaca, bem como níveis aumentados de adrenalina e noradrenalina plasmáticas em comparação com os animais controles (WKY). Nossos resultados de western blot demonstraram maior expressão de TH e  $\beta_2$ -AR nas suprarrenais e bulbo raquidiano de SHR em comparação com os tecidos de WKY. Através de citometria de fluxo, verificamos que o percentual de leucócitos expressando  $\beta_2$ -AR foi maior em SHR em comparação com WKY. No entanto, a análise de TH revelou uma redução no percentual de leucócitos positivos para esta enzima em SHR quando comparado aos leucócitos de WKY. Além disso, as análises de correlação de Pearson revelaram correlação inversa de ambas, pressão sistólica e a frequência cardíaca, com o percentual de leucócitos TH positivos. Observamos ainda, correlação direta entre a pressão sistólica e percentual de leucócitos  $\beta_2$ -AR positivos. O tratamento crônico com clonidina, um anti-hipertensivo de ação central que atua diretamente sobre receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, reduziu a pressão sistólica, a frequência cardíaca e os níveis de adrenalina e noradrenalina plasmáticas nos animais hipertensos, demonstrando, como esperado, a inibição da hiperatividade simpática. O tratamento com clonidina aumentou o percentual de leucócitos totais expressando TH aos níveis dos animais controles e reduziu significativamente o percentual de células totais expressando  $\beta_2$ -AR (mas não aos níveis observados nos animais WKY). Nossos resultados indicam que a hipertensão altera os percentuais de leucócitos de sangue periférico que expressam  $\beta_2$ -AR e TH. O quanto a ação de clonidina sobre essas moléculas nos leucócitos reflete uma resposta modulada em nível central ou uma resposta a ação direta da droga sobre essas células, ainda precisa ser investigado. De modo que, poderemos sugerir o papel dessas moléculas como marcadores periféricos da hiperatividade simpática na hipertensão, uma vez que observamos alteração dos percentuais de leucócitos TH e  $\beta_2$ -AR positivos em paralelo à hiperatividade simpática e a modulação das mesmas após o tratamento com clonidina.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Evaluation of tyrosine hydroxylase and  $\beta_2$  adrenergic receptor in peripheral blood leukocytes in hypertension

### ABSTRACT

The sympathetic nervous system (SNS) plays a fundamental role in the pathophysiology of cardiovascular diseases. In this study, we investigated molecules involved in the sympathetic nervous system in peripheral blood leukocytes of spontaneously hypertensive rats (SHR). We evaluated the presence of the rate-limiting enzyme of catecholamine synthesis-tyrosine hydroxylase (TH) and the  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta_2$ -AR) in leukocytes, as well as the expression of these markers in the SNS regulatory centers. SHR animals presented, as expected, higher systolic blood pressure and heart rate, as well as higher plasmatic adrenaline and noradrenaline levels compared to control (WKY) animals. Our western blot results demonstrated higher TH and  $\beta_2$ -AR expression in the adrenal and lower in the brainstem of SHR compared to WKY tissues. Through flow cytometry, we found that the percentage of leukocytes expressing  $\beta_2$ -AR was higher in SHR compared to WKY. However, TH analysis revealed a reduction in the percentage of leukocytes positive for this enzyme in SHR when compared to WKY leukocytes. In addition, Pearson's correlation analysis revealed an inverse correlation of both, systolic pressure and heart rate, with the percentage of positive TH leukocytes. We also observed a direct correlation between systolic pressure and percentage of positive  $\beta_2$ -AR leukocytes. Chronic treatment with clonidine, a centrally acting antihypertensive that acts on  $\alpha_2$  adrenergic receptors, reduced systolic blood pressure, heart rate and plasmatic adrenaline and noradrenaline levels in hypertensive animals, demonstrating, as expected, the inhibition of sympathetic hyperactivity. In addition, treatment with clonidine increased the percentage of total leukocytes expressing TH at the levels of the control animals and significantly reduced the percentage of total cells expressing  $\beta_2$ -AR (but not at the levels observed in WKY animals). Our results indicate that hypertension alters the percentages of total peripheral blood leukocytes expressing  $\beta_2$ -AR and TH. How much the action of clonidine on these molecules in leukocytes reflects a central level modulation response or a direct action of the drug on these cells, still needs to be investigated. Then, we may suggest the role of these molecules as peripheral markers of sympathetic hyperactivity in hypertension, since we observed alterations in the percentages of positive TH and  $\beta_2$ -AR leukocytes in parallel to sympathetic hyperactivity and after clonidine treatment.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Controle da pressão arterial</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Sistema nervoso autônomo no controle da pressão arterial.....	2
1.1.2 Balanço hídrico.....	4
<b>1.2 Mecanismos envolvidos na Fisiopatologia da hipertensão arterial</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Estresse oxidativo e disfunção endotelial.....	6
1.2.2 Alterações vasculares .....	7
1.2.3 Alteração da fisiologia renal.....	7
1.2.4 Citocinas pró-inflamatórias e sistema imune .....	8
1.2.5 Hiperatividade do sistema nervoso simpático .....	9
<b>1.3 Sistema nervoso simpático</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 Síntese, liberação e degradação de catecolaminas .....	12
1.3.2 Receptores adrenérgicos .....	16
<b>1.4 Medidas da atividade do sistema nervoso simpático</b> .....	<b>17</b>
1.4.1 Dosagem de catecolaminas plasmáticas e urinárias .....	17
1.4.2 Spillover de noradrenalina.....	18
1.4.3 Microneurografia .....	18
1.4.4 Variabilidade da frequência cardíaca .....	19
<b>1.5 Interação neuro-imune</b> .....	<b>19</b>
1.5.1 Inervação autonômica de órgãos linfóides .....	19
1.5.2 Efeito das catecolaminas em células do sistema imune .....	20
1.5.3 Ação das citocinas no sistema nervoso simpático .....	21
1.5.4 Modulação da expressão de moléculas envolvidas na sinalização adrenérgica em células imunes .....	21
<b>1.6 Efeito simpatoinibitório de agentes de ação central</b> .....	<b>22</b>
<b>1.7 Justificativa</b> .....	<b>23</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>25</b>

<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>26</b>
3.1	Animais .....	26
3.2	Inibição simpática através do tratamento com Clonidina .....	26
3.3	Medidas hemodinâmicas .....	26
3.4	Coleta de plasma e de órgãos.....	27
3.5	Quantificação de leucócitos totais .....	27
3.6	Obtenção de leucócitos de sangue periférico.....	27
3.7	Citometria de fluxo .....	27
3.8	Imunofluorescência.....	28
3.9	Western blot .....	28
3.10	Dosagem de catecolaminas plasmáticas por ELISA.....	30
3.11	Análises estatísticas.....	30
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
4.1	Caracterização do modelo de estudo.....	31
4.1.1	Análises hemodinâmicas .....	31
4.1.2	Análise dos níveis de catecolaminas plasmáticas.....	32
4.1.3	Expressão de TH e beta <sub>2</sub> -AR no bulbo raquidiano e suprarrenal .....	32
4.1.4	Expressão de TH e beta <sub>2</sub> -AR em leucócitos totais .....	33
4.1.5	Avaliação das subpopulações leucocitárias positivas para TH e beta <sub>2</sub> -AR .....	35
4.1.6	Análise de correlação entre TH e beta <sub>2</sub> -AR e a pressão sistólica.....	39
4.2	Efeito do tratamento crônico com clonidina em SHR.....	42
4.2.1	Análises hemodinâmicas e dosagem de catecolaminas após tratamento crônico com clonidina .....	42
4.2.2	Expressão de TH e beta <sub>2</sub> -AR no bulbo raquidiano e suprarrenal após tratamento com clonidina.....	44
4.2.3	Quantificação de leucócitos totais .....	46
4.2.4	Efeito do tratamento crônico com clonidina na Expressão de TH e beta <sub>2</sub> -AR nos leucócitos.....	46
4.2.5	Correlação entre expressão de TH ou beta <sub>2</sub> -AR em leucócitos com parâmetros hemodinâmicos ou níveis plasmáticos de catecolaminas após o tratamento com clonidina .....	48
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>

<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>78</b>
<b>8.1</b>	<b>Artigo publicado .....</b>	<b>78</b>
<b>8.2</b>	<b>Artigos submetidos .....</b>	<b>80</b>
<b>8.3</b>	<b>Manuscritos finalizados .....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Sistema nervoso autônomo no coração</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2. Mecanismos de controle da pressão arterial</b>	<b>5</b>
<b>Figura 3. Estruturas centrais no tronco encefálico responsáveis pelo controle do tônus simpático</b>	<b>11</b>
<b>Figura 4. Esquema da transmissão sináptica autonômica</b>	<b>12</b>
<b>Figura 5. Esquema da síntese de catecolaminas</b>	<b>13</b>
<b>Figura 6. Esquema da síntese, liberação e captação de noradrenalina</b>	<b>15</b>
<b>Figura 7. Fórmula estrutural da Clonidina</b>	<b>22</b>
<b>Figura 8. Análises hemodinâmicas de WKY e SHR</b>	<b>31</b>
<b>Figura 9. Níveis plasmáticos de catecolaminas</b>	<b>32</b>
<b>Figura 10. Expressão proteica de TH e <math>\beta_2</math>-AR no bulbo raquidiano e suprarrenal</b>	<b>33</b>
<b>Figura 11. Análise da expressão de tirosina hidroxilase em leucócitos através de citometria de fluxo</b>	<b>34</b>
<b>Figura 12. Análise da expressão do receptor <math>\beta_2</math>-adrenérgico em leucócitos através de citometria de fluxo</b>	<b>35</b>
<b>Figura 13. Quantificação do percentual das subpopulações leucocitárias</b>	<b>36</b>
<b>Figura 14. Imunofluorescência de tirosina hidroxilase</b>	<b>37</b>
<b>Figura 15. Imunofluorescência do receptor <math>\beta_2</math>- adrenérgico</b>	<b>38</b>
<b>Figura 16. Correlação de Pearson entre a expressão de TH ou <math>\beta_2</math>-AR no bulbo raquidiano ou suprarrenal e pressão arterial sistólica</b>	<b>39</b>
<b>Figura 17. Correlação de Pearson entre a expressão de TH e <math>\beta_2</math>-AR em leucócitos totais e a pressão sistólica</b>	<b>40</b>
<b>Figura 18. Correlação de Pearson entre a expressão de TH nas subpopulações leucocitárias e a pressão sistólica</b>	<b>41</b>
<b>Figura 19. Análises hemodinâmicas de WKY, SHR tratados com veículo e SHR tratados com clonidina</b>	<b>43</b>
<b>Figura 20. Níveis plasmáticos de catecolaminas</b>	<b>44</b>
<b>Figura 21. Western blot de TH e <math>\beta_2</math>-AR no bulbo raquidiano e suprarrenal</b>	<b>45</b>
<b>Figura 22. Quantificação de leucócitos totais</b>	<b>46</b>
<b>Figura 23. Análise do percentual de leucócitos expressando tirosina hidroxilase através de citometria de fluxo</b>	<b>47</b>
<b>Figura 24. Análise do percentual de leucócitos expressando receptor <math>\beta_2</math>-adrenérgico através de citometria de fluxo</b>	<b>48</b>

<b>Figura 25. Correlação de Pearson o percentual de leucócitos de SHR expressando TH e a pressão sistólica</b>	<b>49</b>
<b>Figura 26. Correlação de Pearson entre o percentual de leucócitos TH ou <math>\beta_2</math>-AR positivos e a frequência cardíaca e pressão sistólica durante tratamento com clonidina</b>	<b>50</b>
<b>Figura 27. Correlação de Pearson entre a expressão de TH ou <math>\beta_2</math>-AR em leucócitos e níveis plasmáticos de catecolaminas após tratamento com clonidina</b>	<b>51</b>

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1. Anticorpos e diluições utilizadas na Citometria de Fluxo.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabela 2. Anticorpos e diluições utilizadas no Western blot .....</b>	<b>29</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
ADH	Hormônio antidiurético
AMB	Núcleo ambíguo
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
BH <sub>4</sub>	Tetraidrobiopterina
BSA	Albumina bovina sérica
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CVLM	Medula ventrolateral caudal (do inglês <i>caudal ventrolateral medulla</i> )
DAG	1,2-diacilglicerol
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DOPA	Diidroxifenilalanina
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ET-1	Endotelina-1
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GMPC	Guanosina monofosfato cíclico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i> )
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
MAO	Monoamina oxidase
NA	Noradrenalina
NADPH	Nicotinamidaa adenina dinucleotídeo fosfato
NAT	Transportador de noradrenalina
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido nítrico (do inglês <i>nitric oxide</i> )
NOS	Óxido nítrico sintase (do inglês <i>nitric oxide synthase</i> )
Nox	NADPH oxidase
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Pressão arterial sanguínea



PBS	Tampão fosfato-salino
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão (do inglês <i>pattern recognition receptor</i> )
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
ROC	Características de operação do receptor (do inglês <i>receiver operating characteristic</i> )
ROS	Espécie reativa de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i> )
RVLM	Medula ventrolateral rostral (do inglês <i>rostral ventrolateral medulla</i> )
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SFO	Órgão subfornical
SHR	Rato espontaneamente hipertenso (do inglês <i>spontaneously hypertensive rats</i> )
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso parassimpático
SNS	Sistema nervoso simpático
SOD	Superóxido dismutase
TH	Tirosina hidroxilase
TLR	Receptor semelhante à Toll (do inglês <i>toll like receptor</i> )
TNF	Fator de necrose tumoral
VMAT	Transportador vesicular de monoamina
WKY	Wistar Kyoto
$\alpha_1$ -AR	Receptor $\alpha_1$ -adrenérgico
$\alpha_2$ -AR	Receptor $\alpha_2$ -adrenérgico
$\beta_1$ -AR	Receptor $\beta_1$ -adrenérgico
$\beta_2$ -AR	Receptor $\beta_2$ -adrenérgico
$\beta_3$ -AR	Receptor $\beta_3$ -adrenérgico

# 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as doenças cardiovasculares são patologias do coração e vasos sanguíneos e são a principal causa de mortes no mundo. Estima-se que as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 17,7 milhões (31% do total) de óbitos em 2015 dos quais 7,4 milhões devido a doença coronariana e 6,7 milhões devido ao infarto e a hipertensão arterial (WHO, 2017). No Brasil, também são responsáveis por um preocupante impacto econômico e social (Malachias et al., 2016).

A hipertensão arterial é uma condição multifatorial definida por pressão sistólica  $\geq 140$  mm Hg e/ou pressão diastólica  $\geq 90$  mmHg (Malachias et al., 2016). Cerca de um terço da população mundial adulta apresenta hipertensão arterial (Mills et al., 2016) a qual, em muitos casos, está associada a distúrbios metabólicos e alterações estruturais e funcionais de órgãos-alvo. O quadro se agrava na presença de outros fatores de risco para doenças cardiovasculares como obesidade, dislipidemia e diabetes mellitus (Mancia et al., 2013; Weber et al., 2014).

A hipertensão arterial afeta aproximadamente 32,5% de indivíduos brasileiros adultos, mais de 60% dos idosos e contribui direta ou indiretamente para 50% das mortes por doença cardiovascular (Malachias et al., 2016). No período de 2008 a 2015, o número de hospitalizações devido somente à hipertensão arterial variou entre 46.664 e 101.414 e cada internação apresentou um custo aproximado de R\$ 300,51 (Silva et al., 2016).

Há vários fatores de risco para a hipertensão arterial, dentre eles estão: fumo, consumo excessivo de bebidas alcoólicas, obesidade, estresse, consumo exagerado de sal, dislipidemias, inatividade física, etnia - pois existe maior incidência em pessoas de cor negra - e idade avançada - por haver uma correlação positiva entre o envelhecimento e prevalência de hipertensão arterial (Brandão et al., 2010; Malachias et al., 2016). Muitos desses fatores de risco são observados em crianças e adolescentes e justifica a crescente incidência na faixa etária de até 16 anos. Nesta população a hipertensão arterial é definida pela idade, sexo e altura quando a pressão é  $\geq$  percentil 95 (Lurbe et al., 2016).

Além disso, somente 46% dos pacientes estão cientes de sua hipertensão, menos da metade são tratados e apenas 13% alcançam sucesso com o tratamento (Chow et al., 2013). Estima-se que 10% dos pacientes tratados possuem hipertensão resistente, pessoas com hipertensão resistente apresentam níveis pressóricos acima de 140/90 mmHg após o uso de

mais de 3 tipos de medicamentos na máxima dose, sendo um deles preferencialmente um diurético ou têm a pressão arterial controlada somente após o uso de quatro ou mais medicamentos (Judd and Calhoun, 2014; Malachias et al., 2016).

## **1.1 CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL**

A pressão arterial (PA) é produto do débito cardíaco e da resistência vascular periférica. A frequência cardíaca e o volume sistólico compõem o débito cardíaco e, o tônus vascular está diretamente relacionado à resistência vascular periférica. Todos esses fatores são regulados por uma complexa rede de componentes que mantém a pressão arterial durante a homeostase. De modo geral, o controle da PA ocorre através da ação de mecanismos neurais e humorais. Segundos ou minutos após uma aguda elevação da PA, a ativação de núcleos associados ao controle cardiovascular no sistema nervoso central (SNC) é mais eficaz no controle da PA. Quando essa elevação da PA se prolonga por horas ou dias, o controle passa a ser realizado por mecanismos humorais (Cowley, 1992).

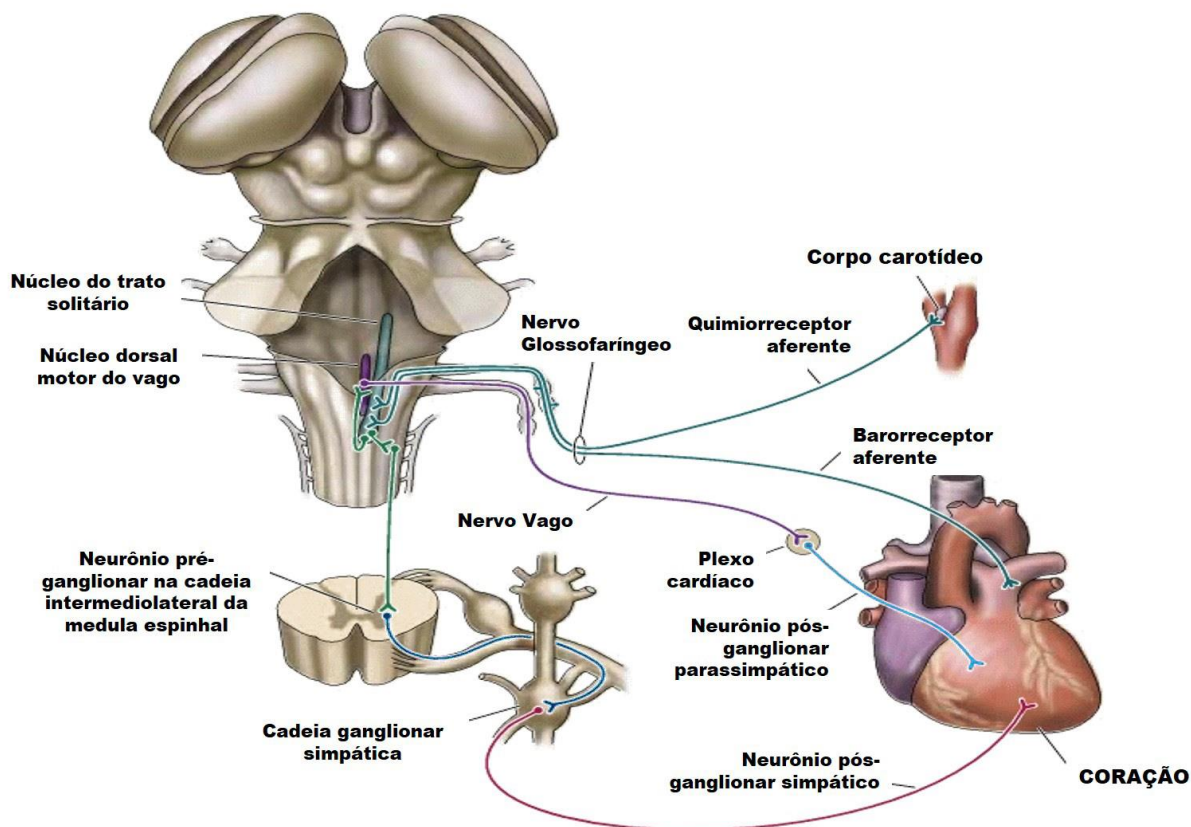
### **1.1.1 SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO NO CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL**

O sistema nervoso autônomo (SNA) é dividido em sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP) ambos se originam de diferentes estruturas do SNC e possuem terminações em diferentes órgãos. Esses sistemas possuem diferenças anatômicas e funcionais bem definidas (Kenney and Ganta, 2014). Hipotálamo, ponte e bulbo são regiões do SNC importantes para a atuação do SNA no controle das funções hemodinâmicas e respiratórias, por exemplo. Locus coeruleus, núcleo do trato solitário, medula ventrolateral rostral e caudal são estruturas importantes localizadas no tronco cerebral inferior (ponte e bulbo) e envolvidas nos controles vascular e cardíaco simpáticos. O núcleo do trato solitário, localizado no bulbo, recebe informações de quimiorreceptores e barorreceptores dos nervos glossofaríngeo e vago. Esses receptores têm papel importante no controle da PA, quimiorreceptores sinalizam os níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> sanguíneos e os barorreceptores respondem às alterações de distensão induzida pela PA, e compõem a inervação aferente do SNA. A partir dessas áreas, os neurônios pré-simpáticos regulam a pressão arterial induzindo a ação dos neurônios pré-ganglionares. O estímulo chega às fibras do nervo pós-ganglionares que




atuam nos órgãos através de liberações de neurotransmissores, especialmente noradrenalina (NA) (Kenney and Ganta, 2014).

A inervação autonômica altera as funções cardíacas através da: i) modulação da frequência cardíaca; ii) modificação da força de contração; iii) alteração do fluxo sanguíneo coronariano; iv) modificação do tônus vascular sistêmico. O reflexo vagal diminui a frequência de descarga no nodo sinoatrial e diminui a excitabilidade das fibras juncionais atrioventriculares, resultando em diminuição do impulso de condução para os ventrículos. Já o estímulo dos gânglios estrelado – que compõem o SNS- aumentam a frequência cardíaca e força de contração ventricular (Figura 1) (Purves et al., 2001; Hanna et al., 2017).

O SNA também controla a PA através da modulação dos tônus vasculares periféricos. O tônus vascular basal é mantido por impulsos provindos da porção lateral do centro vasomotor do bulbo e é alterado de acordo com as alterações hemodinâmicas a fim de manter a homeostase. O estímulo simpático pode produzir tanto vasoconstrição quanto vasodilatação. Na pele, pulmões e mucosa produz vasoconstrição, no entanto, no músculo esquelético pode induzir tanto vasoconstrição, pela ativação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, quanto vasodilatação, pela ativação de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (Guyton, 2011).



**Figura 1. Sistema nervoso autônomo no coração**

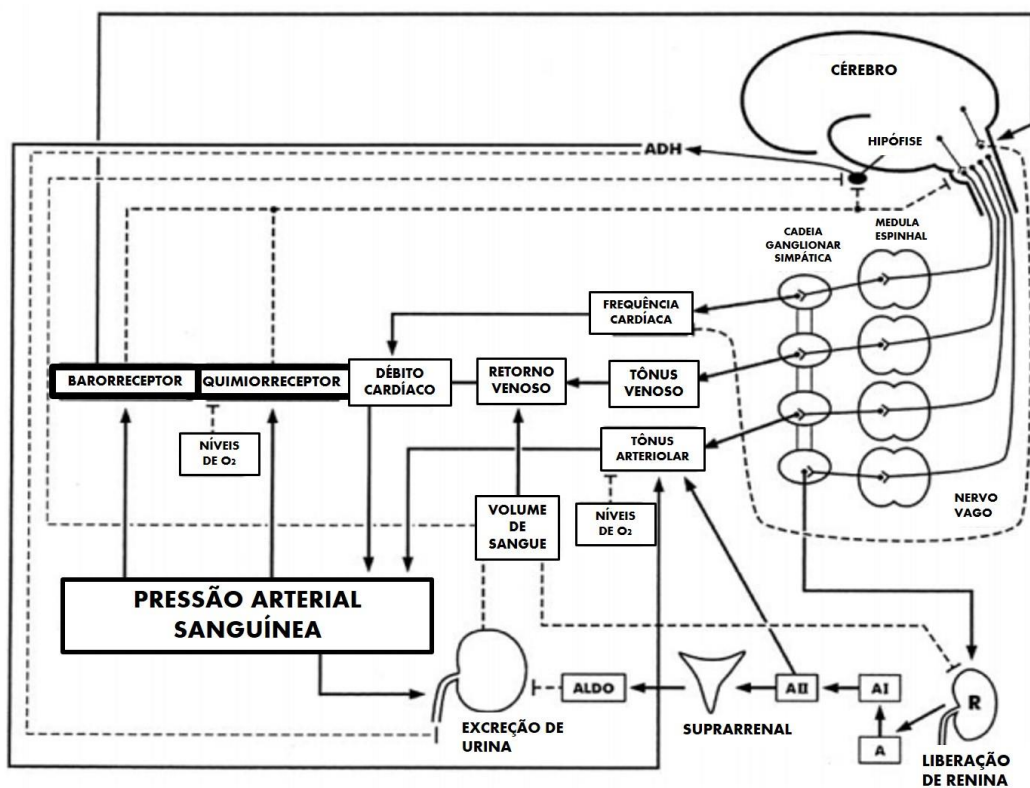
As informações provenientes de quimiorreceptores e barorreceptores são transmitidas (neurônios verdes ) até o núcleo do trato solitário o qual integra e transmite para outros centros autonômicos medulares. Estes núcleos medulares controlam as inervações eferentes parassimpática (neurônio pós-ganglionar azul ) e simpática (neurônio pós-ganglionar rosa ). Adaptado de (Purves et al., 2001).

### 1.1.2 BALANÇO HÍDRICO

Como anteriormente destacado, a PA pode ser modulada através da alteração da volemia. A diminuição da PA induz o aumento da atividade do SNS e consequentemente, a liberação de renina. Renina é uma importante enzima que cliva angiotensinogênio em angiotensina I. Angiotensina I (Ang I) é substrato da enzima conversora de angiotensina (ECA) que produz angiotensina II (Ang II). Ang II age através da ligação aos seus receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> nos quais, de modo geral, tem efeito antagônico. Ang II induz: i) importante vasoconstrição que diminui a filtração renal; ii) liberação de aldosterona pelas suprarrenais – que induz a retenção de sódio e consequentemente, aumento da volemia; iii) reabsorção de sódio no túbulo proximal renal (Singh et al., 2010). Ang II age em diferentes canais iônicos e

transportadores nas distintas regiões do néfron. No túbulo proximal renal, Ang II estimula o trocador  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  e aumenta a atividade da  $\text{Na/K ATPase}$ , assim como do cotransportador de bicarbonato. Na alça de Henle, além de aumentar a reabsorção de bicarbonato, estimula o transportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{/Cl}^-$ . Na porção distal do néfron, induz a atividade da  $\text{H}^+\text{-ATPase}$  e do canal de sódio no tubo coletor (Hall et al., 2012).

A redução persistente da PA também induz a liberação do hormônio antidiurético (ADH) através do eixo hipotálamo-hipófise o qual age na reabsorção renal de água, o que reduz o volume de urina excretada e eleva o volume de líquido extracelular (Bakris and Mensah, 2003). O controle da pressão arterial pode ser resumido no esquema da Figura 2.



**Figura 2. Mecanismos de controle da pressão arterial**

Linha cheia: estímulo positivo. Linha pontilhada: estímulo negativo. A: angiotensinogênio; AI: angiotensina I; AII: angiotensina II;  $\text{O}_2$ : oxigênio; ADH: hormônio antidiurético. Adaptado de (Bakris and Mensah, 2003).

## **1.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA FISIOPATOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL**

A hipertensão arterial pode ser classificada de acordo com sua causa como hipertensão primária ou secundária. A hipertensão arterial primária ou essencial afeta aproximadamente 95% dos indivíduos e a causa não é bem definida. Resulta da interação de fatores genéticos e ambientais que serão discutidos detalhadamente a seguir. Já a hipertensão secundária ocorre em 5% dos casos nos quais as causas são identificadas e tratadas. As principais causas são doença renal crônica, estenose arterial renal, feocromocitoma e apnéia do sono (Weber et al., 2014). Diversos mecanismos foram propostos de patogênese da hipertensão arterial primária:

### **1.2.1 ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL**

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos normais do metabolismo celular, no entanto, também podem desempenhar um papel importante em iniciar e progredir a disfunção cardiovascular associada à hipertensão arterial. ROS são principalmente formados pela ação das enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases (Nox). Diversos fatores contribuem com a atividade e expressão dessas enzimas. Ang II, aldosterona, ET-1 e NA induzem a produção de ROS. Além da ação de Nox, outra fonte de ROS é através da atividade da óxido nítrico sintase (NOS) em baixos níveis do seu co-fator tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Nesta condição de baixa concentração de BH<sub>4</sub>, não há formação de óxido nítrico (NO) e sim de ânion superóxido (Majzunova et al., 2013).

Em condições fisiológicas, há o balanço entre a produção e a degradação de ROS pelas enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) a qual catalisa a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir do ânion superóxido e a catalase degrada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio. O desbalanço da homeostase de ROS ocorre em diversas patologias, inclusive, já foi correlacionado com a hipertensão na qual há maior dano oxidativo nos tecidos de animais hipertensos (La Russa et al., 2017). Neste contexto, foi verificado que superexpressões de SOD e catalase na medula ventrolateral rostral (RVLM) promovem redução da pressão arterial em modelo animal (Chan et al., 2006).

ROS causam disfunção endotelial por reduzirem a disponibilidade de NO, aumentam o transporte de sódio renal, induzem o crescimento e a migração celular, induzem a expressão de genes pró-inflamatórios e estimulam a formação de matriz extracelular (Hall et al., 2012).

### 1.2.2 ALTERAÇÕES VASCULARES

Alterações vasculares como vasoconstrição, vasodilatação prejudicada, aumento da razão parede/lúmen vascular e diminuição do diâmetro luminal de vasos pequenos resultam na elevação da resistência vascular periférica e da PA. Esta PA aumentada causaria o remodelamento vascular de vasos maiores e, conseqüentemente, a rigidez vascular. A intensa vasoconstrição pode levar a rarefação capilar a qual está associada à diminuição da perfusão tecidual e prejuízo funcional do órgão. Esses eventos ocorreriam de modo cíclico, manteria e agravaria a hipertensão arterial (Folkow et al., 1973).

Diversos fatores podem estar envolvidos na gênese dessas alterações vasculares. Ang II induz o remodelamento vascular ao induzir o crescimento de células musculares lisas vasculares e a deposição de colágeno (Laurent and Boutouyrie, 2015). Outras substâncias vasoativas como endotelina-1 (ET-1) e NO também podem participar do processo. ET-1 ao se ligar ao seu receptor ET<sub>A</sub> induz vasoconstrição renal e sistêmica, diminui natriurese, induz células mesangiais a proliferarem e produzirem proteínas de matriz extracelular, além de estimular a hipertrofia de células musculares lisas vasculares. NO, por outro lado, é um importante componente vasodilatador produzido principalmente na célula endotelial pela enzima NOS. NO difunde até a célula muscular lisa na qual ativa guanilato ciclase a produzir guanosina monofosfato cíclico (GMPc). GMPc ativa proteína quinase G que induz a diminuição dos níveis de cálcio intracelular e conseqüentemente, há a dilatação. A deficiência de NO pode ocorrer por diversos mecanismos, por exemplo, através da diminuição da expressão e/ ou da atividade da NOS ou do aumento do *scavenging* de NO (Guyton, 2011).

### 1.2.3 ALTERAÇÃO DA FISIOLÓGIA RENAL

A participação renal na gênese da hipertensão arterial foi demonstrada em transplantes renais de órgão de animal hipertenso para rato normotenso o qual desenvolveu hipertensão sensível ao sal (Dahl and Heine, 1975) e na melhora de pacientes hipertensos com doença renal em estágio final que receberam transplante renal de doadores normotensos (Curtis et al., 1983).

Foi proposto que pode ocorrer a diminuição da taxa de filtração glomerular que resulta em retenção de sódio e aumento da volemia. Essa menor taxa de filtração pode ser resultado da ativação do SNS renal ou pela ação de substâncias vasoconstritoras (Guyton, 1991). Além disso, pode haver o aumento da reabsorção tubular renal de sódio devido ao excesso de



mineralocorticoides ou Ang II, pela maior ligação dessas substâncias aos seus receptores ou maior expressão de canais de sódio (Guyton, 1991; Kim et al., 2005). O terceiro mecanismo está relacionado com a isquemia renal causada pela inflamação, estresse oxidativo, tromboxano, Ang II ou baixos níveis de NO. Essa intensa vasoconstrição pode agravar a redução do número de néfrons que ocorre com a idade. Quando há esta perda, os néfrons restantes devem excretar uma quantidade maior de soluto e água para manter o balanço normal o que leva a uma grave disfunção renal (Johnson et al., 2015).

#### **1.2.4 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E SISTEMA IMUNE**

Já foi observada a correlação entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da PA tanto em humanos como em modelo animal (Hall et al., 2012). Animais knockout para interleucina (IL) -6 têm menores níveis de PA em resposta à infusão de Ang II (Lee et al., 2006). O transplante de timo proveniente de animal normotenso para rato espontaneamente hipertenso (SHR) reduziu a PA desse rato (Ba et al., 1982).

Células T são importantes na progressão da hipertensão. A sinalização de células T promove a migração de outras células inflamatórias como macrófagos que resultam em vasoconstrição renal e aumento da reabsorção de sódio. Em modelo de hipertensão sensível ao sal induzida por Ang II em camundongo RAG-1<sup>-/-</sup>, animais que não apresentam células T ou B, não foram verificados aumento da produção de superóxido assim como a disfunção endotelial assim como o dano renal, hipertrofia ventricular esquerda e nem fibrose cardíaca. Mais ainda, a transferência adotiva de células T, isto é, a transferência de células T provenientes de animais imunocompetentes aos animais knockout, restaurou a hipertensão e disfunção vascular (Guzik et al., 2007).

Há ainda a participação de Th17 e monócitos na hipertensão arterial. Não foram observados estresse oxidativo vascular ou disfunção endotelial em animais IL-17a<sup>-/-</sup> e a infusão de IL-17a induziu hipertensão e a disfunção endotelial em animais normotensos (Nguyen et al., 2013). Já o papel de monócitos foi verificado através do tratamento com toxina a fim de depletar tanto neutrófilos quanto os monócitos o que eliminou os danos induzidos pela Ang II, preveniu a disfunção vascular, hipertrofia e produção de ROS. Essas alterações foram observadas quando monócitos foram transferidos, mas não pela transferência de granulócitos (Wenzel et al., 2011).

### 1.2.5 HIPERATIVIDADE DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO

A ativação do SNS na hipertensão arterial foi demonstrada por diversas técnicas como através do uso de isótopo radioativo e quantificação do *spillover* de NA (Esler et al., 1980) ou através da avaliação da atividade do nervo pós-ganglionar simpático por microneurografia (Grassi et al., 1998). Foi verificada maior taxa de *spillover* de NA em pacientes hipertensos relativamente aos normotensos (Esler et al., 1980). Maiores níveis também foram verificados nas análises regionais de *spillover* de NA tanto cardíaca quanto renal (Schlaich et al., 2004).

Pacientes com hipertensão primária apresentaram maior atividade elétrica do nervo muscular simpático comparados aos pacientes normotensos. Essa atividade simpática foi inclusive significativamente maior que a atividade elétrica do nervo simpático de pacientes com hipertensão secundária (Grassi et al., 1998).

Apesar de não estar claro como ocorre o estímulo inicial de ativação do SNS, algumas hipóteses foram propostas: i) deficiência na autorregulação barorreceptor e ii) aumento da resposta hipotalâmica aos estímulos ambientais (Johnson et al., 2008).

A primeira hipótese refere-se à ação barorreflexa a qual é a principal forma de inibição da atividade simpática. Nessa hipótese haveria prejuízo da atividade do barorreceptor uma vez que já foi relacionada a alteração da atividade elétrica simpática muscular a modulação farmacológica do barorreflexo em modelo animal (Grassi et al., 1995), no entanto, em pacientes as respostas do nervo simpático à estimulação e desativação por dispositivo que altera a pressão transmural carotídea não revelou diferenças entre normotensos, pacientes com hipertensão primária ou com hipertensão secundária (Grassi et al., 1998). Em diversas situações, como durante o exercício físico, mudanças na pressão arterial são acompanhadas por uma modificação da curva da reflexa do baroreceptor para pressões mais altas, com a sensibilidade barorreflexa preservada a mudanças agudas. De modo que, a pressão arterial muitas vezes continua a ser regulada de forma aguda no novo valor de pressão arterial. Esses mecanismos regulatórios adaptativos podem levar a processos patológicos, principalmente quando ativados cronicamente (Raven and Chapleau, 2014).

Considerando que o hipotálamo é uma região importante do SNC responsável pela manutenção do equilíbrio orgânico em situações de estresse e que essa área contém grupos neuronais importantes na função cardiovascular, a segunda hipótese baseia-se no aumento da resposta hipotalâmica a estímulos ambientais o que manteria permanentemente o estado

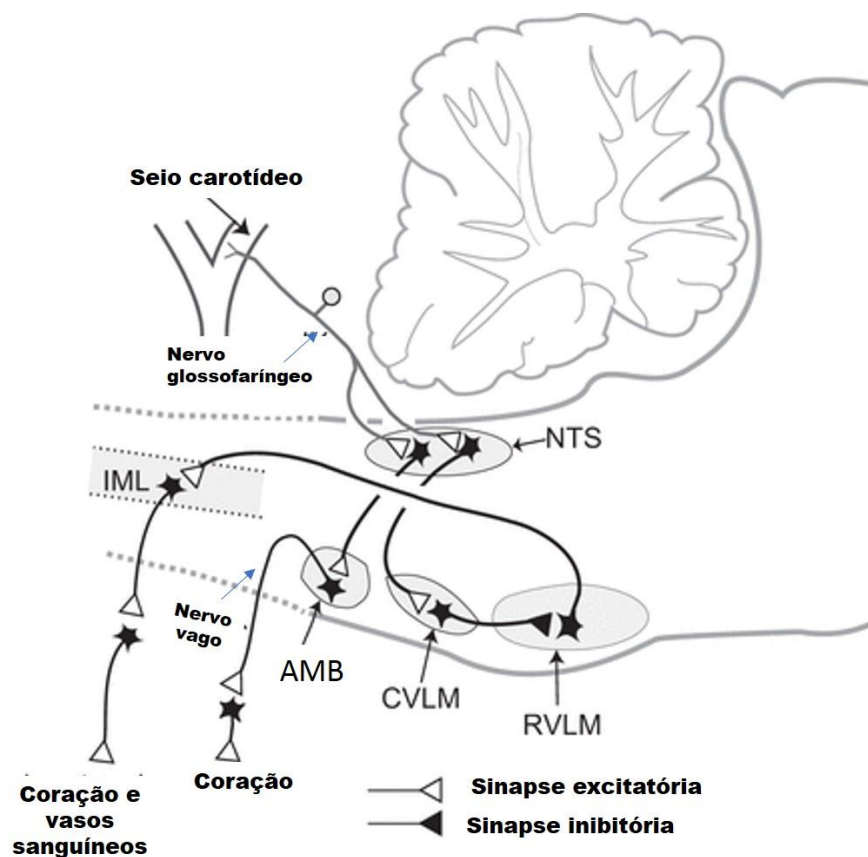
hipertensivo. Apesar de testada em modelo experimental, há a dificuldade de avaliar-se quantitativamente a reatividade ao estresse em pacientes (Mancia, 1997; Colombari et al., 2001).

### **1.3 SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO**

A ativação do tônus simpático depende do controle integrado de estruturas centrais localizadas principalmente no bulbo raquidiano. O componente aferente do SNS inerva o núcleo do trato solitário (NTS) e também ativam os neurônios da medula ventrolateral caudal (CVLM). Os neurônios na medula ventrolateral caudal, por sua vez, inibem os neurônios na RVLM, onde os neurônios pré-ganglionares se originam (Guyenet, 2006; Neukirchen and Kienbaum, 2008).

Além do CVLM, RVLM tem conexões com o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e já foi demonstrado que a ativação simpática do PVN, diretamente ou através do RVLM, contribui para o aumento sustentado do nível da atividade do nervo simpático renal (Allen, 2002; Dampney et al., 2005). As localizações dessas estruturas no SNC estão mostradas na Figura 3.

Receptores de Ang II estão localizados no núcleo do trato solitário e as regiões rostral e caudal da medula ventrolateral que estão envolvidos no controle de SNA. Microinjeção de Ang II nessas regiões altera a atividade nervosa simpática (Allen et al., 1988; Hu et al., 2002). A injeção de Ang II intracerebeoventricular aumenta a atividade de nervos simpáticos esplênicos além de induzir a expressão gênica de diversas citocinas (Ganta et al., 2005). Os efeitos da ação central de Ang II podem ocorrer devido ao aumento da secreção de vasopressina, inibição atividade parassimpática mediada por barorreflexos ou através estimulação da atividade vasomotora simpática (O'Callaghan et al., 2013).



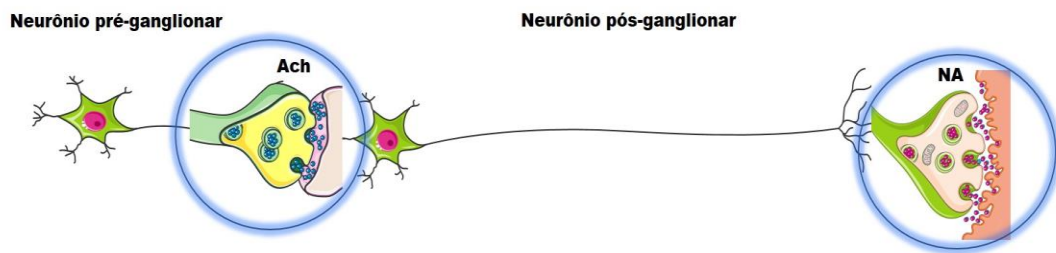
**Figura 3. Estruturas centrais no tronco encefálico responsáveis pelo controle do tônus simpático**

Diagrama esquemático mostrando as vias neurais do controle barorreflexo no bulbo raquidiano através do núcleo do trato solitário (NTS), medula ventrolateral rostral (RVLM), medula ventrolateral caudal (CVLM), coluna intermediolateral (IML) até o coração e os vasos sanguíneos. A inervação parassimpática para o coração se dá, principalmente, por neurônios no núcleo ambíguo (AMB). Adaptado de (Dampney, 2016).

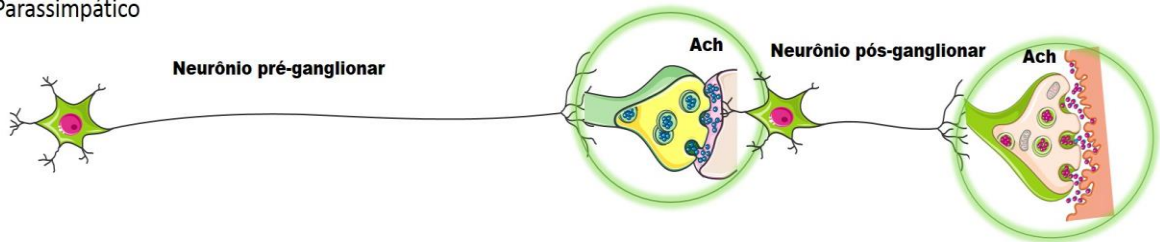
As fibras pré-ganglionares do SNS localizam-se na coluna intermédial dos doze segmentos torácicos e dos três primeiros lombares da medula espinhal e por esse motivo são denominadas tóraco-lombares. O neurônio deixa a medula espinhal no nível correspondente na cadeia ganglionar paravertebral e pode: i) fazer sinapse com o neurônio pós-ganglionar; ii) fazer sinapse para cima ou para baixo no tronco da cadeia paravertebral ou iii) terminar em um gânglio colateral. O corpo do neurônio pós-ganglionar está localizado no gânglio e esse neurônio inerva os órgãos. Nas glândulas suprarrenais, a produção e secreção de catecolaminas é promovida sem a passagem do estímulo em qualquer gânglio. Os terminais pós-ganglionares do SNP liberam acetilcolina (Ach) e a NA é o principal neurotransmissor pós-ganglionar do SNS. Os neurônios pré-ganglionares de ambos os sistemas secretam Ach a

qual é sintetizada a partir de acetilCoA e colina pela acetilcolina transferase. O esquema da Figura 4 mostra as diferenças na organização do SNS e SNP (Guyton, 2011).

#### A Simpático



#### B Parassimpático

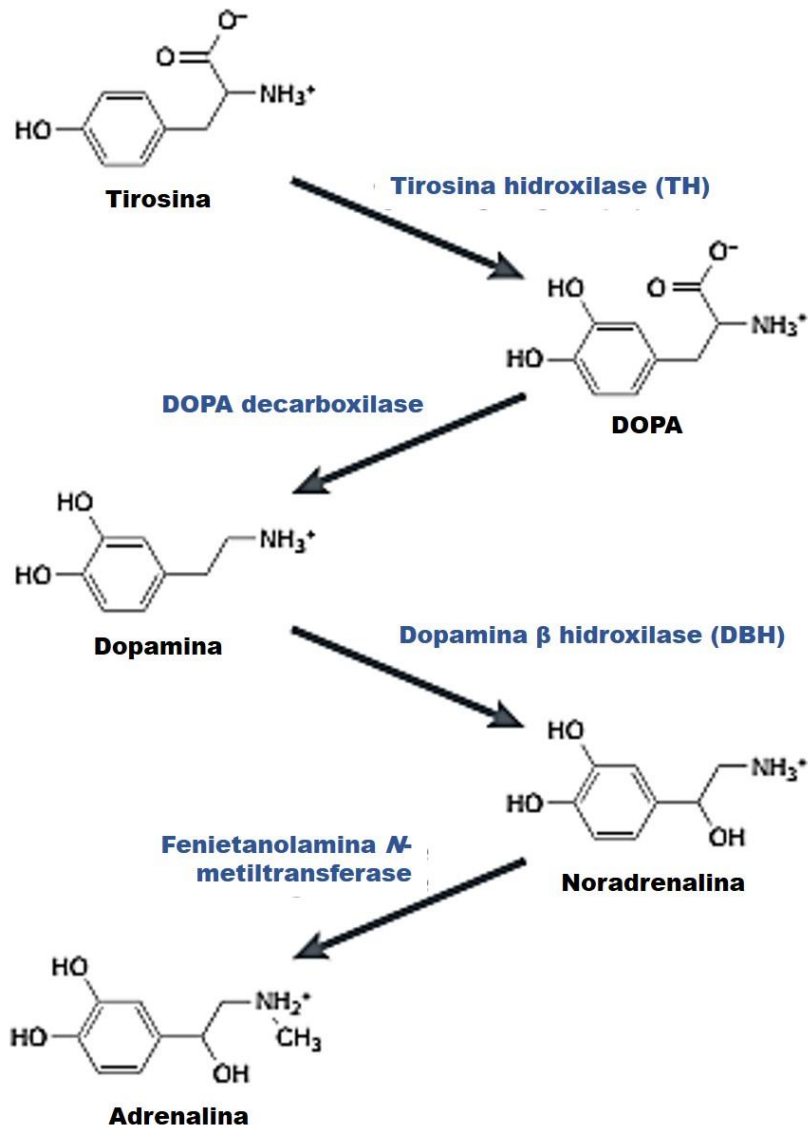


### Figura 4. Esquema da transmissão sináptica autonômica

Sistema eferente simpático (A). Sistema eferente parassimpático (B). Os neurônios pré-ganglionares de ambos os sistemas secretam acetilcolina (Ach) e os neurônios pós-ganglionares do SNS liberam, principalmente, a noradrenalina (NA) e do SNP secretam Ach. Os gânglios simpáticos formam a cadeia ganglionar paravertebral e os gânglios parassimpáticos estão próximos ou na constituição das paredes das vísceras.

#### 1.3.1 SÍNTESE, LIBERAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE CATECOLAMINAS

A tirosina hidroxilase (TH) é uma enzima limitante de taxa na síntese de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina) e um componente-chave do SNS central e periférico (Tekin et al., 2014). Essa enzima forma diidroxifenilalanina (DOPA) a partir de tirosina. DOPA é descarboxilada pela DOPA descarboxilase para formação de dopamina a qual é reagente da dopamina  $\beta$  hidroxilase que sintetiza noradrenalina. Nos locais onde há feniletanolamina N-metiltransferase há formação de adrenalina a partir de noradrenalina (Figura 5).



**Figura 5. Esquema da síntese de catecolaminas**

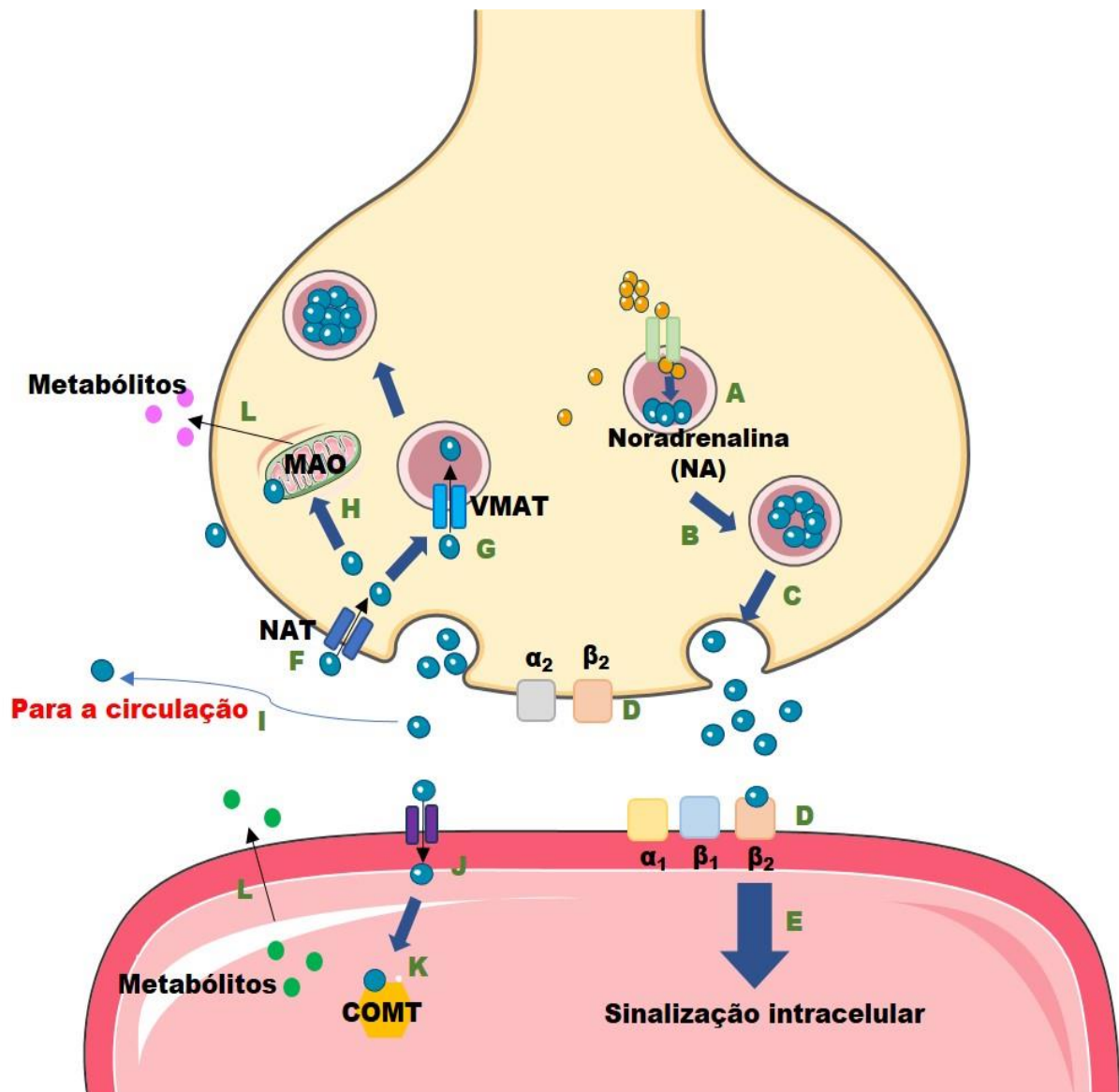
As catecolaminas são sintetizadas a partir do aminoácido tirosina pelas enzimas destacadas em azul. Adaptado de (Goridis and Rohrer, 2002).

O estímulo do neurotransmissor deve ser temporário, de modo que a inativação das catecolaminas pode ser realizada por: recaptação pelos terminais pré-sinápticos, captação extraneuronal ou difusão (Zhou, 2004). Essa captação ocorre por transportadores localizados na membrana plasmática, na área perisináptica, de modo que o neurotransmissor deve difundir a fim de ser transportado para o interior da célula. Os transportadores de NA (NAT) estão presentes nos neurônios simpáticos periféricos, medula da suprarrenal, pulmões e placenta, por exemplo. A captação ocorre através da força gerada pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase que produz um gradiente iônico e envolve o co-transporte de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . A reorientação do

transportador ocorre através do transporte de  $K^+$  intracelular (Torres et al., 2003). Parte da NA recaptada é desaminada pela monoamina oxidase (MAO) e forma ácido diidroximandélico. Na captação extraneuronal, há formação de ácido vanililmandélico pela ação da MAO e da catecol-O-metiltransferase (COMT) (Zhou, 2004).

Outra classe de transportadores incluem os transportadores vesiculares de monoamina (VMAT) os quais são essenciais para a neurotransmissão. Os neurotransmissores são liberados por exocitose das vesículas da membrana neuronal pré-sináptica quando há despolarização da membrana do neurônio (Goridis and Rohrer, 2002). A Figura 6 esquematiza essa cinética do neurotransmissor na fenda sináptica.

A importância do NAT no controle da função sináptica e dos níveis extracelulares do neurotransmissor foi demonstrada através da deleção dessa proteína em camundongos. A ausência de NAT induziu aumento da meia-vida do neurotransmissor, além de diminuição da liberação, aumento do nível extracelular, diminuição do armazenamento e aumento da síntese do mesmo (Xu et al., 2000).



**Figura 6. Esquema da síntese, liberação e captação de noradrenalina**

NA é sintetizada a partir de tirosina (A) e armazenada em vesículas (B). Sob estímulo apropriado (não mostrado), NA é liberada na fenda sináptica (C). O neurotransmissor ativa os receptores adrenérgicos localizados na membrana pós-sináptica ( $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ ) e também a membrana e pré-sináptica ( $\alpha_2$  e  $\beta_2$ ) (D) e causa reações pós-sinápticas (E), como a ativação da proteína quinase e a fosforilação proteica. O NAT é responsável pela recaptção de NA na fenda sináptica e encerra sua ação (F). Após a recaptção pelo NAT, uma porção de NA é restaurada nas vesículas pelo transportador de monoamina vesicular (VMAT) (G) e parte é metabolizada nas mitocôndrias pela enzima monoamina oxidase (MAO) (H). Na fenda sináptica, uma porção de NA vai para a circulação sanguínea (I) ou NA pode ser absorvida (I) e metabolizada pela catecol-O-metiltransferase (COMT) (K). Os metabólitos da MAO e COMT são liberados para a circulação (L). Adaptado de (Zhou, 2004).



### 1.3.2 RECEPTORES ADRENÉRGICOS

As ações das catecolaminas se dão através de suas ligações aos receptores adrenérgicos. Estes possuem sete domínios de aminoácidos hidrofóbicos os quais são regiões importantes que definem sua especificidade. A ligação ao receptor ativa uma ou mais proteínas regulatórias que ligam nucleotídeo guanina, denominadas proteínas G. As proteínas G são agrupadas de acordo com os mecanismos efetores celulares ativados: ativação da adenilato ciclase; inibição da adenilato ciclase; ativação direta de canais de potássio; inibição direta dos canais de cálcio ou ativação da fosfolipase C (Bylund et al., 1994).

- Receptores  $\alpha$  adrenérgicos

Receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos ( $\alpha_1$ -AR) são encontrados em células musculares lisas vasculares de artérias coronárias, na pele, útero, mucosa intestinal e esplênica. A ativação pós-sináptica de  $\alpha_1$ -AR do músculo liso vascular resulta em vasoconstrição e a ativação intestinal produz relaxamento. Nos rins, induz vasoconstrição, diminuição do fluxo sanguíneo renal e aumenta a reabsorção de sódio e água no tubo coletor (Scanzano and Cosentino, 2015). Proteína Gq como ativadas por  $\alpha_1$ -AR ativa fosfolipase C que hidroliza fosfatidil-4,5-bifosfato de membrana em 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> se liga ao seu receptor no sarcolema ou retículo endoplasmático e aumenta os níveis de cálcio citoplasmático. DAG ativa proteína quinase C (PKC) que fosforila diversas proteínas. No músculo liso vascular, PKC promove contração por elevar os níveis de cálcio (Cotecchia et al., 2015).

Receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos ( $\alpha_2$ -AR) estão localizados nas membranas pré e pós-sinápticas. A ativação pré-sináptica inibe a liberação de NA.  $\alpha_2$ -AR pós-sináptico promove contração do músculo liso vascular, inibição da lipólise e excreção de sódio e água (Gilsbach et al., 2011).  $\alpha_2$ -AR ativam proteína Gi a qual inibe adenilato ciclase e diminui os níveis de AMPc. Diferente de Gi, Go inibe canais de cálcio diretamente sem alterar a atividade da adenilato ciclase (Jiang and Bajpayee, 2009; Giovannitti et al., 2015).

- Receptores  $\beta$  adrenérgicos

Receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos ( $\beta_1$ -AR) predominam no miocárdio, nodo sinoatrial e sistema de condutância ventricular produzindo aumento da frequência e força de contração. Nos rins induz liberação de renina (Najafi et al., 2016).

Receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos ( $\beta_2$ -AR) estão localizados no músculo liso vascular da pele, mesentério e músculo liso brônquico e ativação desse receptor nos rins induz vasodilatação renal. A ativação pré-sináptica do  $\beta_2$ -AR por catecolaminas leva à liberação de noradrenalina (Starke et al., 1989; Szentmiklosi et al., 2015). As alterações na expressão e na regulação dos receptores adrenérgicos podem contribuir para a hipertensão essencial (Koepke and DiBona, 1985; Veglio et al., 2001).

$\beta_1$ -AR e  $\beta_2$ -AR ativam proteína Gs a qual estimula adenilato ciclase a produzir adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Este age como segundo mensageiro ou mediador citoplasmático sobre a proteína quinase A (PKA) a qual fosforila proteínas como canais iônicos, quinase de cadeia leve de miosina e troponina. No músculo liso, AMPc e PKA promovem relaxamento através da diminuição dos níveis de cálcio e potássio (Najafi et al., 2016).

Receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos ( $\beta_3$ -AR) estão presentes em cardiomiócitos atriais e ventriculares, células endoteliais, células musculares lisas vasculares, assim como, em células musculares lisas da bexiga urinária (Balligand, 2016).  $\beta_3$ -AR pode intercambiar o acoplamento à Gs/adenilato ciclase e Gi/MAPK (Dessy and Balligand, 2010).

As respostas dos receptores às catecolaminas são reguladas pela concentração de catecolaminas disponíveis, pelo número de receptores e suas afinidades de ligação, através de fatores que afetam o acoplamento do receptor e ativação da quinase ou canal iônico, pela atividade de fosfodiesterases que hidrolisam AMPc ou através da disponibilidade de íons cálcio (Guyton, 2011).

## **1.4 MEDIDAS DA ATIVIDADE DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO**

### **1.4.1 DOSAGEM DE CATECOLAMINAS PLASMÁTICAS E URINÁRIAS**

A técnica de avaliação da atividade simpática mais utilizada. Realiza-se a dosagem das catecolaminas ou metabólitos como diidroxifenilglicol e hidroximetoxifenilglicol através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou imunoenaios como ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Grassi and Esler, 1999).

É fácil de ser realizada, no entanto, tem baixa sensibilidade e reprodutibilidade. A fração de NA circulante é somente uma pequena parcela de NA secretada pelos terminais

nervosos. As concentrações plasmáticas de NA dependem da taxa de secreção, clearance e recaptação e nem sempre estão correlacionadas com os níveis de atividade simpática sistêmica (Grassi et al., 2015). De modo semelhante, a dosagem de catecolaminas ou de seus metabólitos na urina é uma porção diretamente dependente da função renal (Grassi and Esler, 1999).

#### 1.4.2 SPILLOVER DE NORADRENALINA

Para a análise da liberação regional de NA radioativa ou *spillover* de NA, solução de NA tritiada diluída é infundida em uma taxa constante e conhecida, seguida por coleta de sangue e dosagem do neurotransmissor. O que permite a quantificação de NA liberada e a fração que sofreu captação (Grassi et al., 2015). Por haver a correlação entre a atividade simpática de um órgão e a taxa de *spillover* da NA em seu efluente venoso é possível avaliar a liberação regional do neurotransmissor, de modo que se obtém a atividade nervosa simpático em órgãos individuais. A coleta nas veias renais e seio coronário determina a taxa de *spillover* renal e cardíaca, respectivamente. O *spillover* de NA é calculado através da seguinte fórmula:  $\text{Spillover de NA} = [(C_V - C_A) + C_A (NA_E)] \times FP$ , em que  $C_V$  é a concentração de NA venosa,  $C_A$  é a concentração de NA arterial,  $NA_E$  é a fração de NA tritiada coletada e  $FP$  é o fluxo plasmático do órgão (Esler et al., 1984).

A técnica não é utilizada na clínica médica, pois há o risco devido à exposição a radioisótopos de hidrogênio, além de ser de difícil execução, fica restrita, essencialmente, aos estudos clínicos acadêmicos (Grassi and Esler, 1999).

#### 1.4.3 MICRONEUROGRAFIA

A microneurografia consiste no registro da atividade nervosa simpática muscular, através do registro direto da atividade elétrica de multiunidade de via pós-ganglionar, usualmente o nervo fibular, através da inserção percutânea de um eletrodo de tungstênio (Kingwell et al., 1994; Esler et al., 2003). É considerado como um método eficaz para a avaliação do nível de atividade do SNS, por meio de registro intraneural direto, da atividade nervosa simpática para o músculo, vasos sanguíneos musculares e pele em humanos (Kingwell et al., 1994).

A análise pode ser realizada com sucesso em várias fibras ou em uma única fibra (Esler, 2014). Desse modo, é possível avaliar se a maior atividade elétrica da fibra é devido a

maior número de impulsos em uma unidade de tempo ou se há maior quantidade de neurônios contribuindo com a variação elétrica total da fibra (Elam et al., 2003).

No entanto, a microneurografia é uma técnica invasiva e complexa, exigindo ampla experiência para que se obtenha sinais de alta qualidade. Além disso, a amplitude dos disparos depende da posição de inserção do eletrodo e avalia somente a atividade simpática muscular regional, não sendo possível a análise de órgãos mais internos (Grassi et al., 2015).

#### **1.4.4 VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA**

Através de algoritmos matemáticos identificam-se as atividades simpática e parassimpática no nodo sinusal. O componente de alta frequência corresponde a atividade parassimpática e é abolida através do bloqueio vagal e as de baixa frequência derivam da atividade dos nervos simpáticos cardíacos. É uma técnica não-invasiva e fácil de ser realizada. Porém é de interpretação difícil e controversa pois em alguns estudos não foram verificadas correlações com outras medidas da atividade do SNS como a microneurografia ou *spillover* de NA (Kingwell et al., 1994; Grassi and Esler, 1999).

### **1.5 INTERAÇÃO NEURO-IMUNE**

O sistema nervoso e o sistema imune formam redes bidirecionais de comunicação. A ativação do sistema imune estimula o sistema nervoso o qual modula a imunidade inata e adaptativa (Chavan et al., 2017). Essa interação também pode ter grande relevância terapêutica. Como demonstrado em pacientes com artrite reumatoide, uma doença autoimune crônica inflamatória, a implantação de dispositivo que estimula o nervo vago reduziu a produção de fator de necrose tumoral (TNF) e melhorou as manifestações da doença (Koopman et al., 2016). Diferentemente das ações opostas dos SNS e SNP que é observada em diferentes órgãos-alvo, os efeitos colinérgicos e adrenérgicos nas células do sistema imune muitas vezes são cooperativos (Pavlov and Tracey, 2017).

#### **1.5.1 INERVAÇÃO AUTONÔMICA DE ÓRGÃOS LINFÓIDES**

Através da utilização de traçadores retrógrados foi possível verificar que órgãos linfóides primários e secundários apresentam rica inervação simpática responsável pela liberação de noradrenalina e outros neurotransmissores (Nance et al., 1987; Nance and Burns,

1989). O timo recebe inervação de neurônios que partem dos segmentos T1 até T7 da medula espinhal, os neurônios pré-motores estão localizados no bulbo raquidiano, ponte e hipotálamo e não há evidências de inervação parassimpática (Nance et al., 1987; Trotter et al., 2007). Os neurônios pós-ganglionares que participam da inervação do baço estão localizados no gânglio mesentérico e celíaco superior os quais fazem sinapses com os neurônios do pré-ganglionares entre os segmentos torácicos T1 e T12 e assim como no timo, não tem suprimento parassimpático (Nance and Burns, 1989).

Os neurônios simpáticos que alcançam os linfonodos estão relacionados com a localização desses órgãos no corpo, podendo ter comunicações neuronais em diferentes alturas da medula espinhal (Nance et al., 1987). Da medula óssea partem neurônios que se comunicam com neurônios pré-ganglionares simpáticos entre os segmentos T8-L1 (Denes et al., 2005).

### **1.5.2 EFEITO DAS CATECOLAMINAS EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE**

As células imunes expressam receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos. O subtipo de receptor  $\beta_2$ AR é o principal receptor expresso em células imunes em roedores e humanos. O número de  $\beta_2$ ARs expressos em células imunes é variável e é regulado por uma série de fatores, como ativação celular e concentração de citocinas, hormônios ou neurotransmissores (Nance and Sanders, 2007). As sinalizações alteram a produção e a migração de células imunes inatas, através da indução de mielopoiese e a mobilização de células tronco hematopoiéticas, células *natural killer* (NK), neutrófilos e monócitos (Irwin and Cole, 2011).

Além de serem capazes de responder às catecolaminas, já foi descrito que leucócitos expressam a enzima TH e são capazes de produzir e liberar catecolaminas (Josefsson et al., 1996). Inclusive, sistemas complexos de transporte e armazenamento de catecolaminas foram detectados e parecem contribuir para a atividade simpática periférica destas células (Leposavic et al., 2008).

Apesar de, até o momento, não se verificar inervação parassimpática em órgãos linfóides, foi observado que o estímulo vagal *in vivo* durante endotoxemia inibe a síntese de TNF (Borovikova et al., 2000). Foi demonstrado que a via colinérgica-simpática é necessária para a ativação de células T e o aumento da pressão arterial sistêmica. A ablação seletiva do nervo esplênico inibe a migração de células T e protege contra a hipertensão arterial (Carnevale et al., 2016).

### **1.5.3 AÇÃO DAS CITOCINAS NO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO**

O sistema imune também modula a atividade simpática. Neurônios expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRR) como receptores semelhantes a Toll (TLR) e receptores de citocinas, por exemplo o receptor de TNF tipo 1 e receptor de IL-1 tipo 1 (Pavlov and Tracey, 2017) e suas atividades elétricas podem ser alteradas na presença desses estímulos. Citocinas podem induzir a sinalização neuronal. A administração de IL-1 $\beta$  no sistema porta-hepático induziu maior atividade vagal e do nervo simpático esplênico (Niijima, 1996).

A microinjeção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no PVN induziu aumento da pressão arterial média e da atividade simpática renal (Shi et al., 2011). O aumento da pressão arterial média, da frequência cardíaca e da atividade do nervo simpático renal por essas citocinas tem a participação do órgão subfornical (SFO). Lesões no SFO atenuaram os efeitos induzidos pela injeção intracarotídea de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Wei et al., 2013).

### **1.5.4 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA SINALIZAÇÃO ADRENÉRGICA EM CÉLULAS IMUNES**

Em condições fisiológicas, a interação neuro-imune mantém a homeostase, no entanto, a ativação prolongada ou inadequada do SNS ou do sistema imunológico pode resultar na falha no restabelecimento da homeostase. Sob tais condições, o sistema imune e/ou SNS podem promover efeitos patológicos e letais (Lorton and Bellinger, 2015).

Alteração na expressão de receptores adrenérgicos em leucócitos foram observadas na hipertensão. Células mononucleares de SHR e pacientes hipertensos apresentam menor expressão de  $\alpha_{1B}$ -AR e maior de  $\alpha_{1D}$ -AR quando comparadas às células de animais e pacientes normotensos (Veglio et al., 2001). Além de diferentes níveis de  $\alpha$ -AR, estas células provenientes de pacientes hipertensos também apresentam maior expressão de  $\beta_2$ -AR (Middeke et al., 1983; Brodde et al., 1984).

Foi verificada maior densidade de  $\beta_2$ -AR em linfócitos de pacientes submetidos ao estresse (Chi et al., 1993). A modulação das moléculas envolvidas na sinalização adrenérgica em condições patológicas ocorre não somente através da alteração dos níveis dos receptores, mas também foi observado menor nível de RNAm de TH em células mononucleares de obesos (Leite et al., 2016).

## 1.6 EFEITO SIMPATOINIBITÓRIO DE AGENTES DE AÇÃO CENTRAL

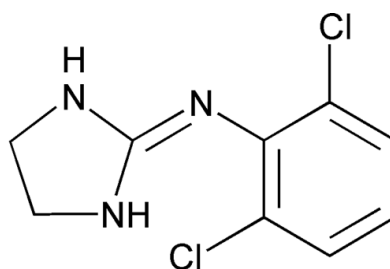
A ação simpatoinibitória e anti-hipertensiva de agentes de ação central se dá através da inibição da atividade de grupos neuronais no SNC envolvidos no controle da pressão arterial (Tibiriçá and Lessa, 2005). Fármacos de ação central estimulam receptores  $\alpha_2$ - adrenérgicos e receptores imidazolínicos I<sub>1</sub> e inibem a liberação de NA. De modo que há aumento do tônus vagal, diminuição da resistência vascular, diurese e redução da liberação de renina (Tibiriçá and Lessa, 2005; Malachias et al., 2016).

Metildopa, clonidina, moxonidina e rilmenidina são exemplos de compostos que apresentam mecanismos simpatoinibitórios. As reações adversas incluem sonolência, sedação, boca seca, fadiga, hipotensão postural e disfunção erétil (Malachias et al., 2016).

Clonidina (Figura 7) é um derivado imidazolínico, tem boa biodisponibilidade (entre 75 e 95%) e atravessa a barreira hematoencefálica através de transportadores (Andre et al., 2009). Clonidina induz a inibição da atividade de estruturas neuronais simpáticas envolvidas na regulação cardiovascular e aumenta o tônus vagal (Laubie and Schmitt, 1977). A interrupção abrupta da administração de clonidina pode induzir efeito hipertensivo rebote (Geyskes et al., 1979).

Além da redução da pressão arterial, clonidina foi capaz de reduzir o estresse oxidativo no coração de SHRs. Foram verificadas menores concentrações de produtos da peroxidação lipídica e da oxidação proteica (Nik Yusoff et al., 2013).

A sedação induzida pela clonidina ocorre pela ativação de receptores  $\alpha_2$  no locus coeruleus na ponte o que limita o uso desse fármaco na clínica no tratamento da hipertensão arterial, por outro lado, o efeito sedativo pode ser utilizado na aplicação do composto como pré-anestésico (Nguyen et al., 2017).



**Figura 7. Fórmula estrutural da Clonidina**

U.S. Pharmacopeia

Foi verificada menor incidência de efeitos colaterais durante a administração de compostos com seletividade aos receptores I<sub>1</sub>, como moxonidina e rilmenidina (Nikolic and Agbaba, 2012). O tratamento agudo de pacientes hipertensos com moxonidina reduziu a pressão arterial média, sem alterar a frequência cardíaca e diminuiu a atividade da renina plasmática (Van Zwieten and Peters, 1999). Além disso, reduziu a atividade do nervo simpático avaliada por microneurografia e a resistência vascular periférica (Greenwood et al., 2000). No entanto, o uso de moxonidina deve ser evitado em pacientes com insuficiência cardíaca avançada pois a preparação de liberação sustentada de moxonidina foi associada com maior taxa de morbidade e mortalidade (Cohn et al., 2003).

Rilmenidina é uma oxazolina com estrutura química similar às imidazolininas clássicas. O tratamento com rilmenidina também reduziu a pressão arterial e a atividade simpática, analisada através dos níveis de *spillover* de NA (Esler et al., 2004). Rilmenidina foi capaz de aumentar o fluxo sanguíneo renal, a excreção de potássio, a natriurese associada à inibição da reabsorção de sódio e diurese paralelos à menor atividade simpática renal (Kline and Cechetto, 1993)

O efeito simpatoinibitório central melhora as alterações vasculares verificadas na hipertensão arterial. Os tratamentos crônicos de SHR com clonidina, rilmenidina ou moxonidina aumentaram a densidade capilar funcional avaliada por microscopia intravital na pele e músculo esquelético (Nascimento et al., 2010). Essa melhora também foi observada pelo tratamento com clonidina e rilmenidina em modelo animal de síndrome metabólica em que além de hipertensão arterial, observam-se deposição de gordura visceral, resistência à insulina, intolerância à glicose, aumento dos níveis de triglicérides e hipercolesterolemia (Nascimento et al., 2016).

## 1.7 JUSTIFICATIVA

Já foi bem demonstrada a existência e o papel modulador das catecolaminas em células do sistema imune e a presença de todos os componentes da via de síntese e metabolismo das catecolaminas nestas células (Cosentino et al., 1999; Marino et al., 1999) e que o SNS tem papel fundamental na fisiopatologia de doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial, a insuficiência cardíaca e a doença arterial coronariana (Mancia et al., 2007; Florea and Cohn, 2014; Moreira et al., 2015). No presente estudo, investigamos em modelo experimental de SHR a existência de uma relação entre a atividade simpática sistêmica e a expressão da enzima tirosina hidroxilase e do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico em



leucócitos de sangue periférico. A hipótese do trabalho é que as expressões de TH e do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico nos leucócitos de sangue periférico refletem a atividade simpática na hipertensão arterial primária.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a existência de uma relação entre a atividade do sistema nervoso simpático e a expressão da enzima TH e do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico em leucócitos de sangue periférico em modelo experimental de hipertensão arterial.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o modelo de estudo (ratos espontaneamente hipertensos - SHR) quanto aos parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial e frequência cardíaca), atividade simpática (níveis plasmáticos de noradrenalina e adrenalina), a expressão proteica de TH e receptor  $\beta_2$ -adrenérgico no bulbo raquidiano, na glândula suprarrenal e nos leucócitos de sangue periférico.
- Investigar a distribuição de TH e receptor  $\beta_2$ -adrenérgico nas subpopulações leucocitárias.
- Avaliar o efeito da simpatoinibição central com clonidina sobre os parâmetros hemodinâmicos, níveis de catecolaminas plasmáticas e expressão proteica de TH e receptor  $\beta_2$ -adrenérgico no bulbo raquidiano, na glândula suprarrenal e em leucócitos de sangue periférico.
- Correlacionar os níveis de leucócitos de sangue periférico expressando TH e receptor  $\beta_2$ -adrenérgico com a pressão arterial sistólica e a frequência cardíaca.
- Correlacionar os níveis de leucócitos de sangue periférico expressando TH e receptor  $\beta_2$ -adrenérgico com os níveis plasmáticos de catecolaminas.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 ANIMAIS**

Ratos Wistar Kyoto machos com 12 semanas, pesando de 200 a 250 g, foram obtidos do Centro de criação de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL, Rio de Janeiro - RJ) e os ratos espontaneamente hipertensos da linhagem Okamoto-Aoki (SHR) foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório da Unicamp (CEMIB, Campinas - SP). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais da FIOCRUZ (Licença LW-46/13).

#### **3.2 INIBIÇÃO SIMPÁTICA ATRAVÉS DO TRATAMENTO COM CLONIDINA**

Os animais SHRs foram divididos aleatoriamente entre os grupos tratados com veículo (SHR+VEH) e tratados com clonidina (SHR+CLO). O tratamento oral por gavagem com clonidina (código C7897 - Sigma-Aldrich) 0,1 mg/kg/dia (Davidov et al., 1967; Defelice et al., 1990; Nascimento et al., 2010) ou água destilada (veículo) foi realizado diariamente durante 28 dias. O tratamento foi realizado através da introdução da solução por agulha de gavagem de aço inox (cânula diâmetro 1,2 mm com esfera 2,3 mm e raio de 40 mm) ligado à seringa, todos os procedimentos foram realizados no mesmo período do dia.

#### **3.3 MEDIDAS HEMODINÂMICAS**

Foram realizadas medidas da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca em animais conscientes, através de um sistema computadorizado de pletismografia caudal (BP-2000, Visitech blood pressure analysis system, USA), o método é não invasivo e foi realizada a adaptação dos animais por 3 dias consecutivos no aparelho. Os animais foram mantidos isolados em caixas individuais sob a plataforma aquecida à 37°C para a aclimação. As medidas hemodinâmicas referem-se à média aritmética de 15 análises de pressão arterial e frequência cardíaca.

### **3.4 COLETA DE PLASMA E DE ÓRGÃOS**

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, foi realizada punção cardíaca e foram coletadas as glândulas suprarrenais e o bulbo raquidiano. O sangue total foi coletado com solução anticoagulante contendo 97 mM de citrato de sódio; 78 mM de ácido cítrico e 111 mM de glicose e centrifugado a 350g para a coleta do plasma e leucócitos totais. Os tecidos e o plasma foram armazenados em freezer -80°C até o processamento para posteriores análises por western blot e ELISA, respectivamente.

### **3.5 QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS**

O sangue foi coletado em microtubos de coleta contendo EDTA (0,5 mL - Vacutube Biocon). A quantificação de leucócitos foi realizada pela plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório – Fiocruz- RJ, através do analisador automatizado hematológico Poch 100- iV DIFF (Sysmex, Kobe, Japan).

### **3.6 OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO**

Os leucócitos foram obtidos através de centrifugação a 350g do sangue total seguida por sucessivas lises das hemácias com solução contendo 0,144M de cloreto de amônio e 17 mM de TrisHCl. Após lavagem em tampão fosfato-salino (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,88 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,4 mM, pH 7,4) as células viáveis foram quantificadas em azul de trypan e processados para citometria de fluxo.

### **3.7 CITOMETRIA DE FLUXO**

10<sup>6</sup> leucócitos foram processados para marcação de receptor  $\beta_2$ - adrenérgico e TH. Para a análise de TH foi realizada permeabilização com 0,1% de saponina ou com solução comercial (Fixation/Permeabilization Solution Kit – BD Biosciences). As ligações inespecíficas foram bloqueadas com solução contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 5% de soro de cabra em PBS. Os anticorpos primários foram incubados por 20 minutos a 4°C. Após lavagem com PBS acrescido de 10% de SFB, anticorpo secundário anti- IgG de coelho conjugado à Alexa Fluor 488 foi incubado por 20 minutos a 4°C. As especificações e diluições

encontram-se na Tabela 1. Após as lavagens foi realizada fixação com solução de paraformaldeído 2%. Todas as etapas foram realizadas a 4°C e seguidas por centrifugação a 175g. Foi utilizado o sistema CyAn ADP Analyzer (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA). O controle negativo foi realizado com amostras de leucócitos incubados com anticorpo secundário conjugado à Alexa Flúor 488 na ausência do anticorpo anti-TH ou anti-  $\beta_2$ -AR. As análises de intensidade de fluorescência foram realizadas através dos dados da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de cada amostra normalizada pelo controle negativo do experimento.

**Tabela 1. Anticorpos e diluições utilizadas na Citometria de Fluxo**

	Fabricante	Diluição
Anticorpo primário IgG de coelho anti receptor $\beta_2$ -adrenérgico	Abcam	1:50
Anticorpo primário IgG de coelho anti tirosina hidroxilase	Abcam	1:10
Anticorpo secundário de cabra anti- IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 488	Invitrogen	1:1000

### 3.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células provenientes dos experimentos de citometria foram aderidas em lamínulas de vidro revestidas com poli-L-Lisina, marcadas com DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) por 5 minutos e analisadas em microscópio de fluorescência (Colibri–Carl Zeiss, Jena, Germany). A morfologia celular e nuclear possibilitou a quantificação de linfócitos (células menores e mononucleares), monócitos (células maiores e mononucleares) e granulócitos (polimorfonucleares).

### 3.9 WESTERN BLOT

As proteínas totais da metade de cada tecido coletado foram extraídas em tampão de lise (25mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 50 mM fluoreto de sódio; 1mM ortovanadato de sódio; 1% de Triton X-100; 1mM PMSF) contendo mistura comercial de inibidores de

protease e fosfatase (Roche Ltda e Sigma Aldrich, respectivamente) com auxílio de sonicação. Os extratos foram mantidos a -80°C.

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de ácido bicinonínico (BCA) de acordo com as instruções do fabricante do kit (BCA Protein Assay Kit Folin - Thermo Scientific Pierce). A absorbância foi comparada com a curva padrão de albumina bovina sérica (BSA).

50 µg de proteínas foram diluídas em tampão de amostra composto por Tris-HCl 80mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 12%; β mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,05%, submetidas à ação da temperatura de 100°C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Sackking Gel: 5% Bis/Acrilamida; 0,19M Tris (pH 8,8); 0,2% SDS; 0,1% Persulfato de amônio e 0,1% TEMED - Running Gel: 12 % Bis/Acrilamida; 0,37M Tris (pH 6,8); 0,2% SDS; 0,1% Persulfato de amônia e 0,04% TEMED). O campo elétrico de 100 Volts foi aplicado sobre esse gel o que separou as proteínas de acordo com seu peso molecular.

Após eletroforese, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose e para descartar as ligações dos anticorpos com proteínas inespecíficas foi feito bloqueio destas ligações com solução de bloqueio [TBST (Tris 50 mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,1%) e 5% de leite em pó desnatado (Molico)]. Os anticorpos primários foram incubados overnight a 4°C e o anticorpo IgG camundongo anti GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente. As diluições e especificações encontram-se na Tabela 2. Os anticorpos secundários foram incubados por uma hora a temperatura ambiente e todos os anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio. A detecção foi realizada por sistema ECL (SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate - Thermo Scientific Inc., Rockford, USA ou Westar Supernova - Cyanagen Srl, Bologna, Italia). A quantificação dos níveis de proteínas foi realizada com o software Image Studio (LI-COR - Lincoln, USA).

**Tabela 2. Anticorpos e diluições utilizadas no Western blot**

	Fabricante	Diluição
Anticorpo primário IgG de coelho anti receptor β <sub>2</sub> -adrenérgico	Abcam	1:5000

Anticorpo primário IgG de coelho anti tirosina hidroxilase	Abcam	1:5000
Anticorpo primário IgG de camundongo anti GAPDH	Fitzgerald	1:60000
Anticorpo secundário de cabra anti- IgG de coelho conjugado a peroxidase	Pierce Biotechnology	1:10000
Anticorpo secundário de cabra anti- IgG camundongo conjugado a peroxidase	Pierce Biotechnology	1:10000

### 3.10 DOSAGEM DE CATECOLAMINAS PLASMÁTICAS POR ELISA

A dosagem de adrenalina e noradrenalina no plasma sanguíneo foi realizada através da utilização de kit comercial (2-CAT ELISA Fast Track- Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG) de acordo com instruções do fabricante e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpetraMax – Molecular Devices, Sunnyvale, CA - USA).

### 3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

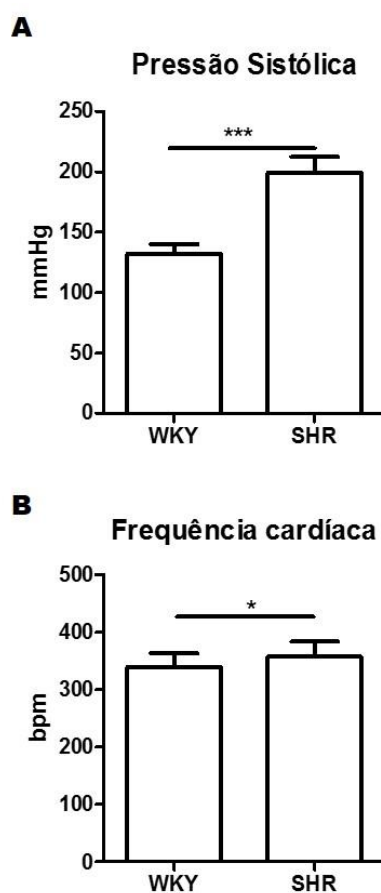
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste de normalidade D'Agostino e Pearson foi realizado. As análises estatísticas entre dois grupos com distribuição normal foram realizadas utilizando-se teste t não pareado bi-caudal e se os dados não apresentaram distribuição normal, foi utilizado teste Mann Whitney bi-caudal. ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Tukey foi empregado nas análises de mais de dois grupos com distribuição normal. Teste Kruskal-Wallis seguido por pós-teste de Dunn foi utilizado nas avaliações entre três grupos que não possuíram distribuição normal. Coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar o grau de relação linear entre duas variáveis. Os valores  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas através do programa estatístico comercialmente disponível GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE ESTUDO

#### 4.1.1 ANÁLISES HEMODINÂMICAS

Iniciamos nosso estudo através da avaliação de parâmetros hemodinâmicos. Nossos resultados revelaram maior pressão sistólica ( $199 \pm 13$  mmHg  $P < 0,0001$ ) e frequência cardíaca ( $357 \pm 26$  bpm  $P < 0,05$ ) em SHR quando comparados com ratos WKY ( $132 \pm 8$  mmHg;  $340 \pm 24$  bpm, respectivamente) (Figura 8).



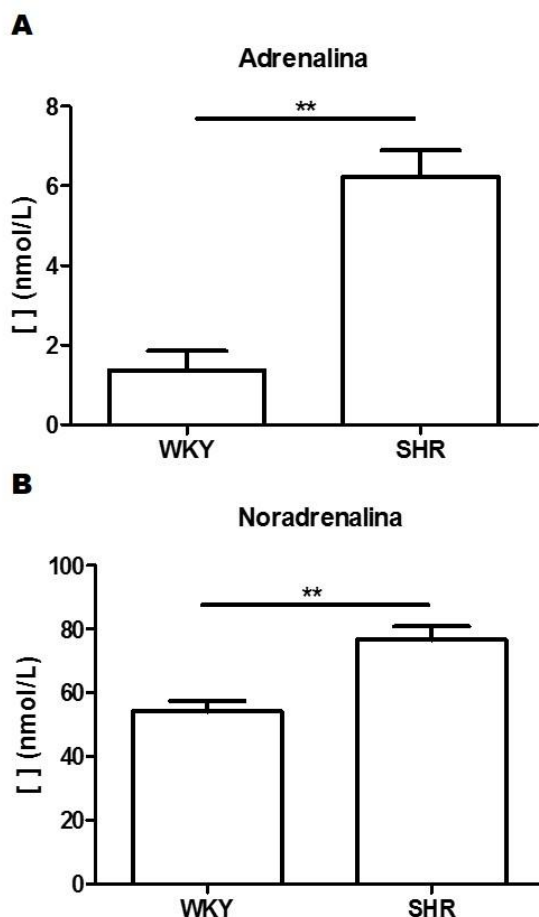
**Figura 8. Análises hemodinâmicas de WKY e SHR**

Pressão sistólica (A) e frequência cardíaca (B) através de fotopletismografia caudal de ratos Wistar Kyoto (WKY) normotensos e ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.  $n = 18$  animais/grupo. Teste t não pareado.  $*P < 0,05$ ;  $***P < 0,0001$ .



#### 4.1.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CATECOLAMINAS PLASMÁTICAS

Verificamos que SHR apresenta maiores níveis de adrenalina ( $6,2 \pm 0,7$  nmol/L;  $P < 0,0001$ ) e noradrenalina ( $76,6 \pm 4,3$  nmol/L;  $P < 0,0001$ ) comparado ao WKY ( $1,4 \pm 0,5$  nmol/L e  $54,1 \pm 3,3$  nmol/L; respectivamente) (Figura 9).



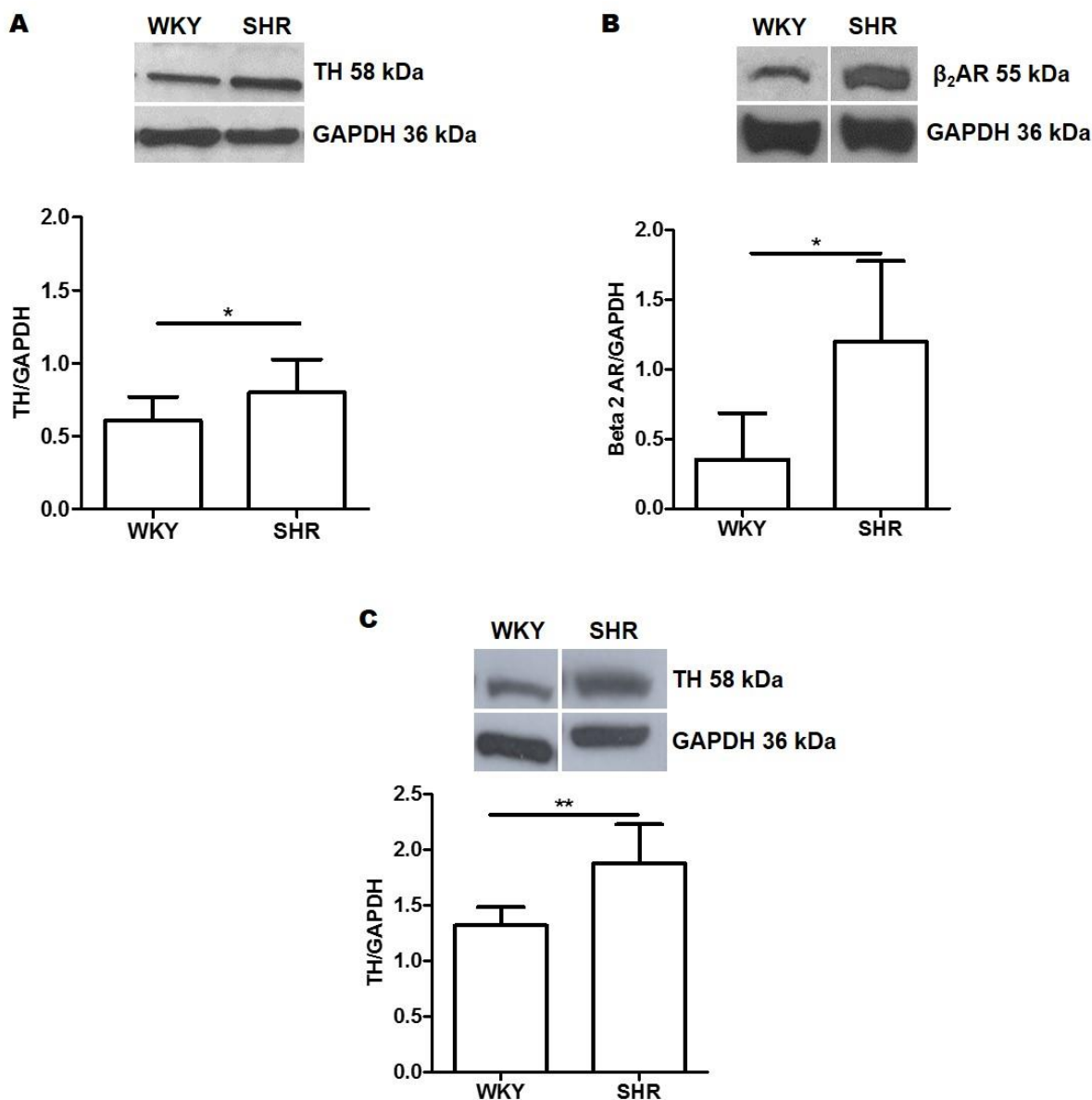
**Figura 9. Níveis plasmáticos de catecolaminas**

Concentração de adrenalina (A) e noradrenalina (B) plasmáticas em ratos WKY e SHR.  $n = 5$  animais/grupo. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão. Teste Mann Whitney.  $**P < 0,01$ .

#### 4.1.3 EXPRESSÃO DE TH E BETA<sub>2</sub>-AR NO BULBO RAQUIDIANO E SUPRARRENAL

Realizamos a avaliação da enzima TH, bem como do  $\beta_2$ -AR por western blot em amostras de suprarrenal e bulbo raquidiano. No bulbo raquidiano, observamos que TH (Figura 10A) e  $\beta_2$ -AR (Figura 10B) foram mais expressos em SHR, 27% e 45%, respectivamente, quando comparados aos controles normotensos ( $P < 0,05$  e  $P < 0,05$ , respectivamente). Na

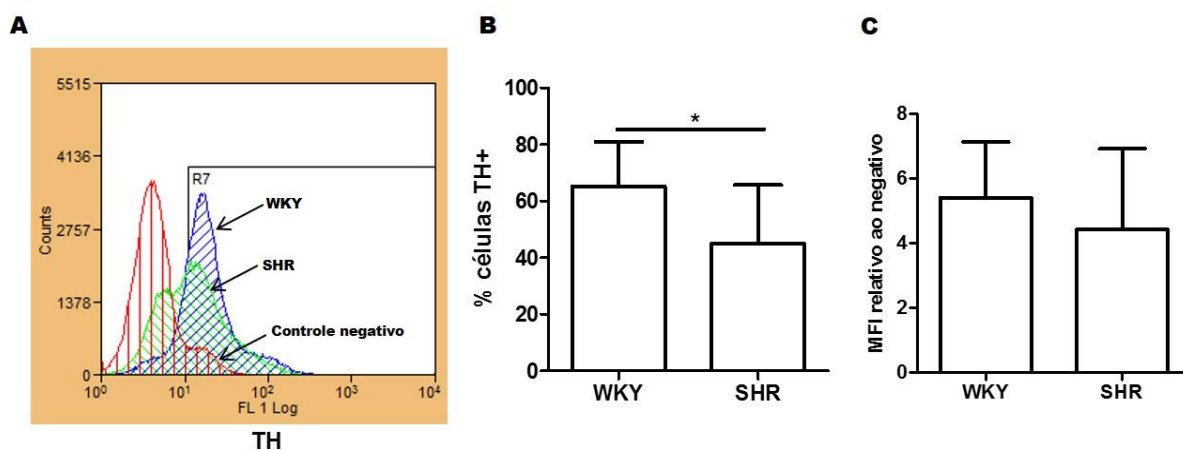
adrenal, TH também mostrou uma expressão 42% maior em SHR em comparação com os controles WKY ( $P < 0,01$ ) (Figura 10C).



**Figura 10. Expressão proteica de TH e  $\beta_2$ -AR no bulbo raquidiano e suprarrenal** Imunoblot e quantificação da tirosina hidroxilase (TH) (A) e do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico ( $\beta_2$ -AR) (B) no bulbo raquidiano. Imunoblot e quantificação de TH na suprarrenal de ratos Wistar Kyoto (WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (C). Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.  $n = 7-10$  animais/grupo. Teste t não-pareado. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.1.4 EXPRESSÃO DE TH E BETA<sub>2</sub>-AR EM LEUCÓCITOS TOTAIS

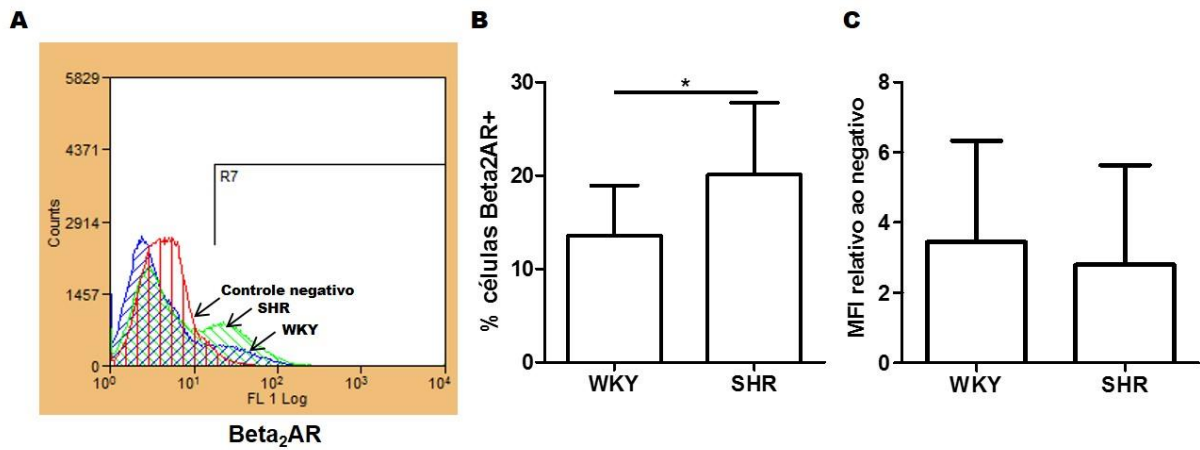
Investigamos expressão de TH, bem como de  $\beta_2$ -AR em leucócitos de sangue periférico, através de citometria de fluxo. A citometria de fluxo revelou diferença significativa no percentual de eventos positivos para TH entre WKY e SHR em que há maior número de células que expressam a enzima em leucócitos totais de animais normotensos ( $65,1 \pm 15,9\%$   $P < 0,05$ ) comparativamente aos leucócitos de SHR ( $44,9 \pm 20,8\%$ ) (Figura 11B). Não verificamos diferença na mediana da intensidade de fluorescência entre os grupos ( $5,41 \pm 1,72$  em WKY e  $4,43 \pm 2,49$  em SHR) (Figura 11C).



**Figura 11. Análise da expressão de tirosina hidroxilase em leucócitos através de citometria de fluxo**

Imagens representativas dos histogramas de intensidade de marcação em leucócitos totais (A). Quantificação do percentual de leucócitos totais expressando a enzima em ratos Wistar Kyoto (WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (B). Análise da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) da marcação de TH (C). Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.  $n = 10$  animais/grupo. Teste t não-pareado.  $*P < 0,05$

A quantificação de células que expressam o  $\beta_2$ -AR revelou menor percentual de células marcadas em leucócitos de WKY ( $13,5 \pm 5,4\%$ ) comparativamente ao SHR ( $20,1 \pm 7,7\%$ ) (Figura 12B). Não observamos diferença na mediana da intensidade de fluorescência entre os WKY e SHR ( $3,44 \pm 2,89$  e  $2,80 \pm 2,84$ ; respectivamente) (Figura 12C).

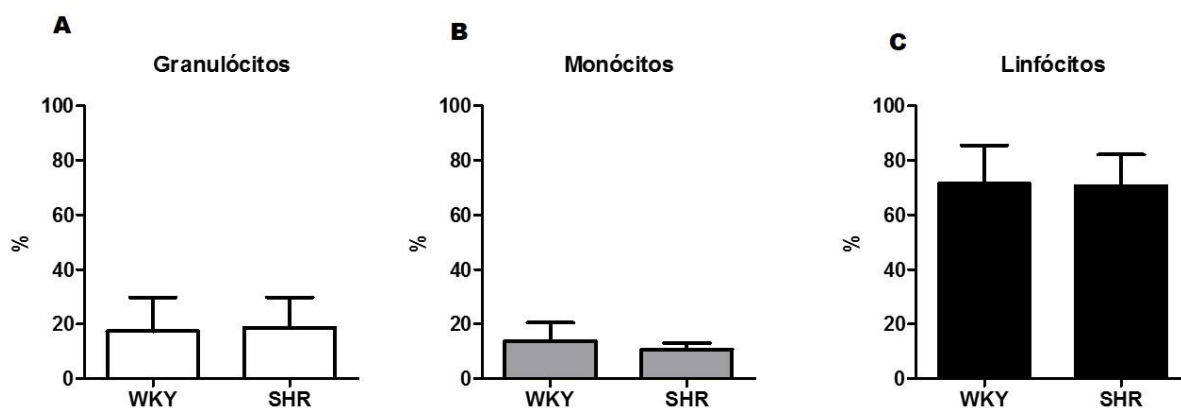


**Figura 12. Análise da expressão do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico em leucócitos através de citometria de fluxo**

Imagens representativas dos histogramas de intensidade de marcação em leucócitos totais de ratos Wistar Kyoto (WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (A). Quantificação do percentual de leucócitos expressando o receptor (B). Análise da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) da marcação de  $\beta_2$ -AR (C). Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. n= 10 animais/grupo. Teste t não-pareado. \* $P < 0,05$ .

#### 4.1.5 AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES LEUCOCITÁRIAS POSISTIVAS PARA TH E BETA<sub>2</sub>-AR

Inicialmente avaliamos os percentuais das subpopulações leucocitárias. Através da morfologia visualizada por microscopia de fluorescência foi possível quantificar o percentual de linfócitos (menores e mononucleares), monócitos (grandes e mononucleares) e granulócitos (polimorfonucleares) totais e marcados. Observamos que não há diferenças entre WKY e SHR (Figura 13). Verificamos um percentual de  $71,5 \pm 14,1\%$  de linfócitos,  $13,8 \pm 6,8\%$  de monócitos e  $17,4 \pm 12,4\%$  de granulócitos em WKY e de  $70,6 \pm 11,5\%$  de linfócitos,  $10,7 \pm 2,5\%$  de monócitos e  $18,7 \pm 11,1\%$  de granulócitos em SHR (Figura 13).



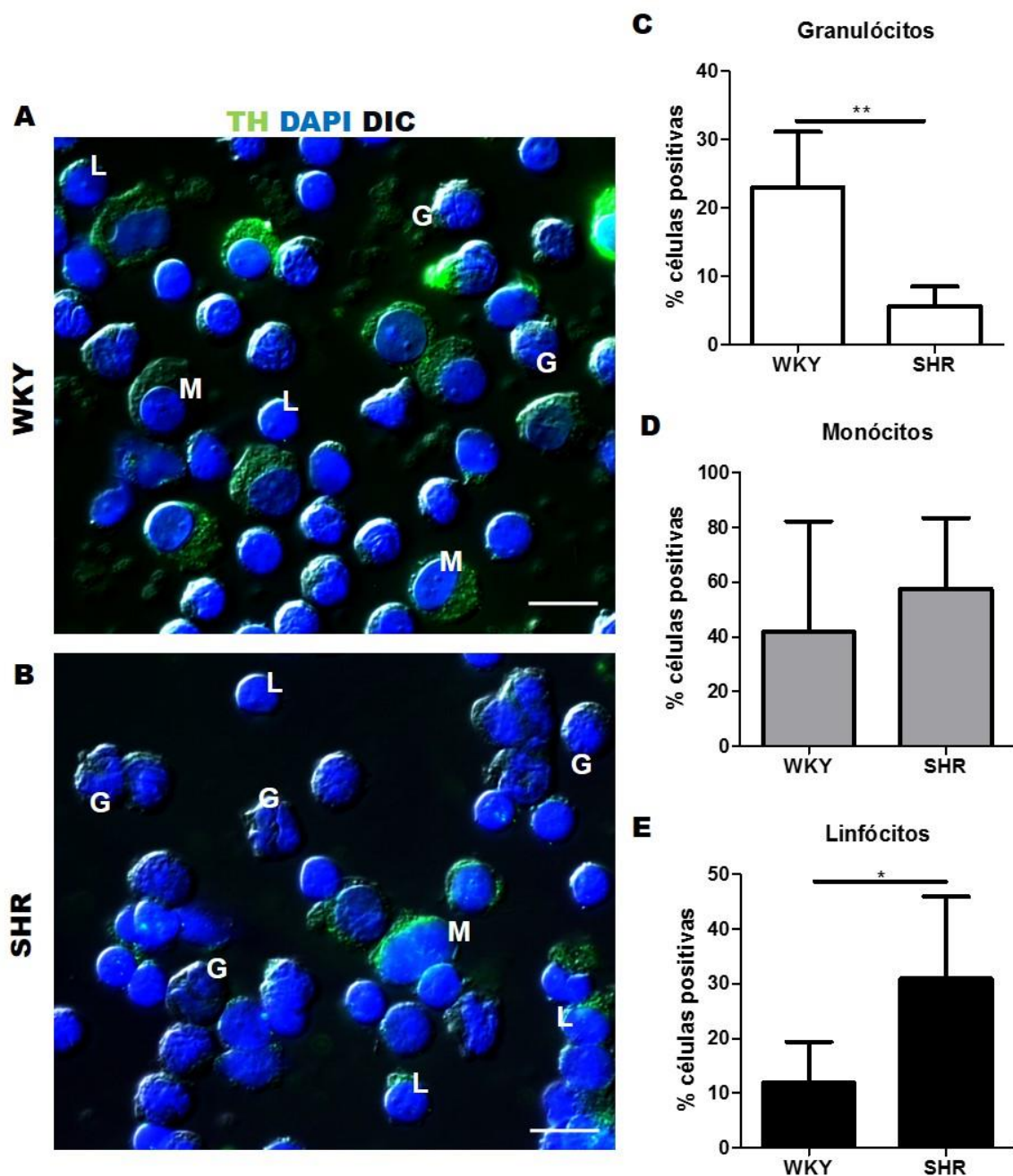
**Figura 13. Quantificação do percentual das subpopulações leucocitárias**

A análise quantitativa do percentual de granulócitos (A), monócitos (B) e linfócitos (C) através de imunofluorescência. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.  $n=5$  animais/grupo. Teste t não-pareado.

Identificamos que todos os subtipos de leucócitos (linfócitos, monócitos e granulócitos) tanto de WKY como SHR expressaram TH (Figura 14) e  $\beta_2$ -AR (Figura 15).

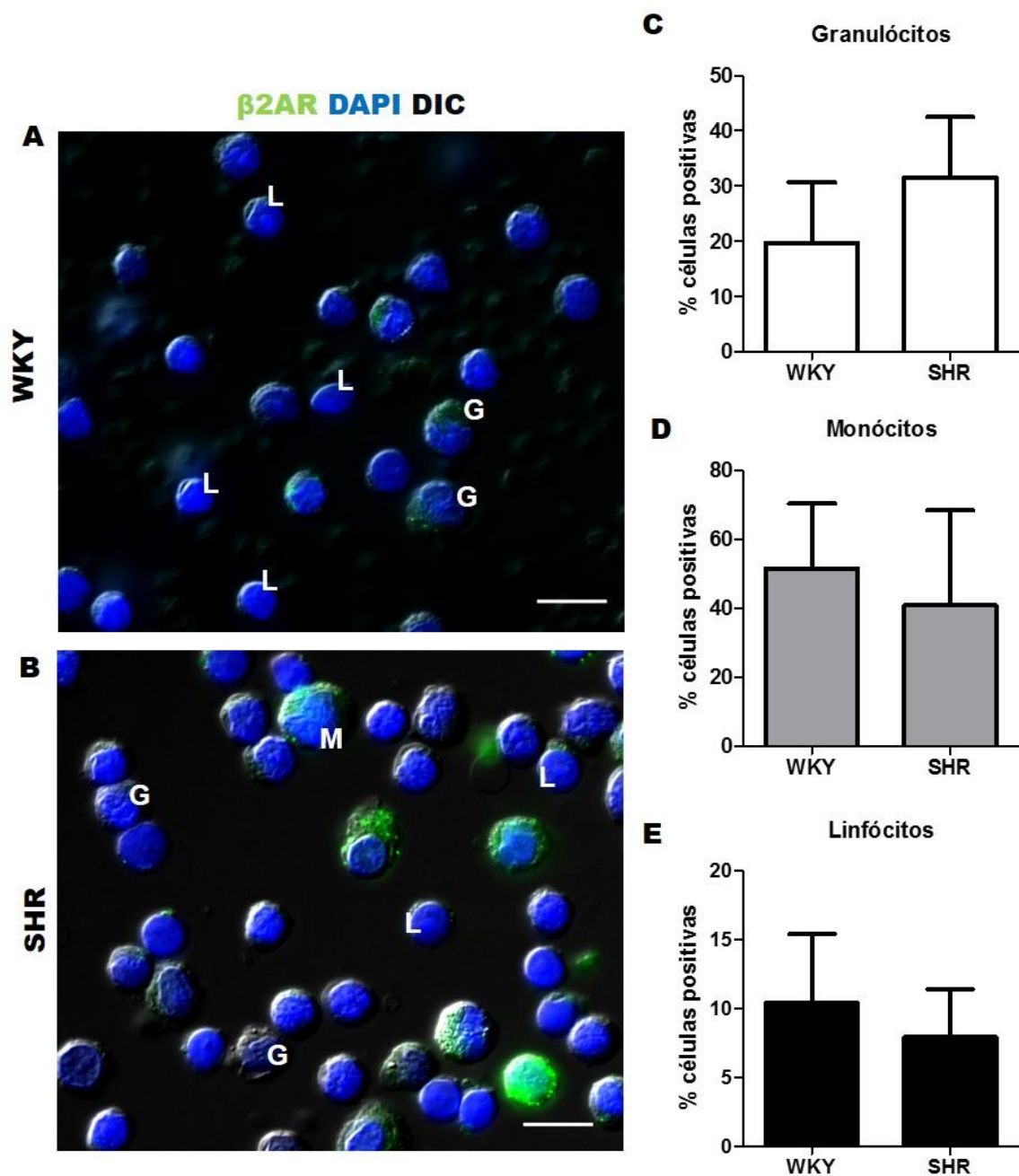
Observamos que em WKY  $23,1 \pm 8,0\%$  dos granulócitos expressam TH enquanto que apenas  $5,6 \pm 2,8\%$  destas células em SHR expressam a enzima ( $P < 0,001$ ) (Figura 14C). Não houve diferenças nos monócitos entre WKY e SHR ( $41,9 \pm 40,4$  e  $57,6 \pm 25,9\%$ ; respectivamente) (Figura 14D). No entanto, houve maior porcentagem de linfócitos que expressam TH em SHR ( $31 \pm 15,0\%$ ) do que em WKY ( $11,9 \pm 7,4\%$ ,  $P < 0,05$ ) (Figura 14E).

Em relação à marcação de  $\beta_2$ -AR não foi possível afirmar se há diferença no percentual de células positivas para o receptor entre os subtipos de leucócitos de WKY e SHR pois será necessário replicar o experimento para atingir o  $n$  amostral suficiente (Figura 15D-F).



**Figura 14. Imunofluorescência de tirosina hidroxilase**

Imunofluorescência TH (marcação em verde) em leucócitos de sangue periférico de ratos WKY (A) e SHR (B). Em azul a marcação nuclear com DAPI. Os gráficos mostram a quantificação do percentual de granulócitos (C), monócitos (D) e linfócitos (E) positivos para TH. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.  $n = 5$  animais/grupo. Teste t não-pareado.  $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ . L= linfócitos, M = monócitos e G= granulócitos. Barra= 10  $\mu\text{m}$ .

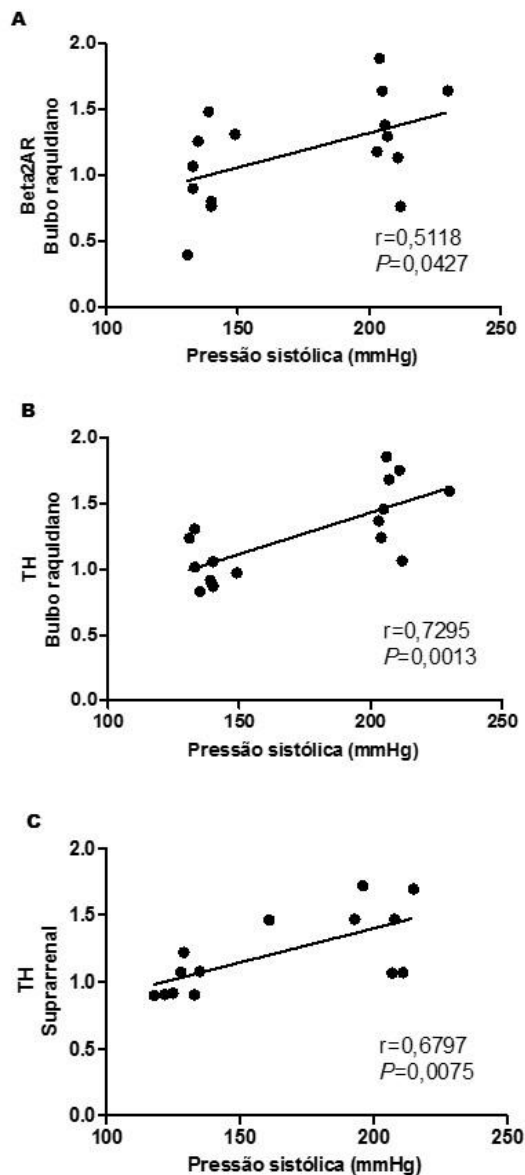


**Figura 15. Imunofluorescência do receptor  $\beta$ <sub>2</sub>- adrenérgico**

Imunofluorescência do receptor  $\beta$ <sub>2</sub>- adrenérgico (marcação em verde) em leucócitos de sangue periférico de ratos WKY (A) e SHR (B). Em azul a marcação nuclear com DAPI. Os gráficos mostram a quantificação do percentual de granulócitos (C), monócitos (D) e linfócitos (E) positivos para o receptor adrenérgico. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. n= 5 animais/grupo. Teste t não-pareado. L= linfócitos, M = monócitos e G= granulócitos. Barra= 10  $\mu$ m.

#### 4.1.6 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE TH E BETA<sub>2</sub>-AR E A PRESSÃO SISTÓLICA

A análise de correlação entre TH ou  $\beta_2$ -AR e a pressão sistólica, considerando tanto os animais normotensos e hipertensos como uma única população, revelou correlações significativas e diretas entre a expressão de TH e  $\beta_2$ -AR no bulbo raquidiano ou nas glândulas suprarrenais com a pressão sistólica (Figura 16).

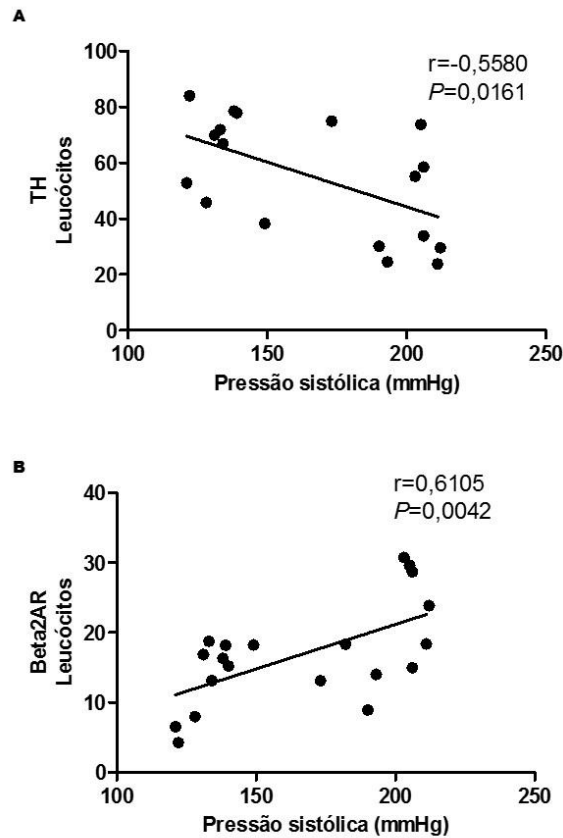


**Figura 16. Correlação de Pearson entre a expressão de TH ou  $\beta_2$ -AR no bulbo raquidiano ou suprarrenal e pressão arterial sistólica**

Análise de correlação entre a expressão de  $\beta_2$ -AR no bulbo raquidiano x Pressão sistólica (A). TH no bulbo raquidiano x pressão sistólica (B). Níveis de TH na suprarrenal x Pressão sistólica (C).



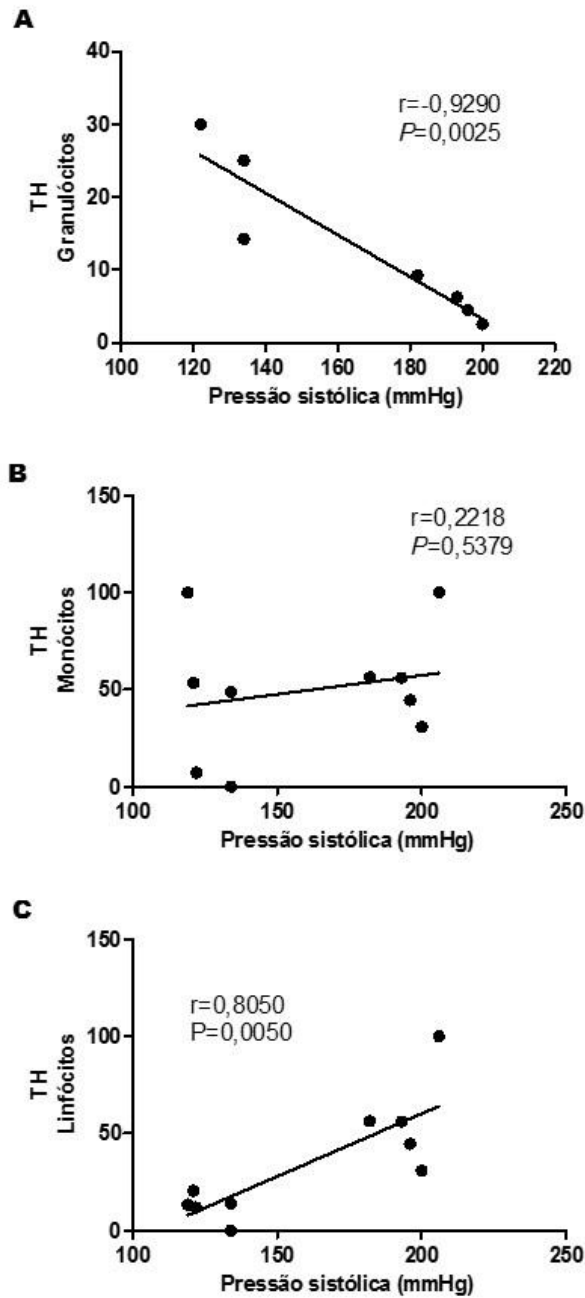
Já a avaliação da expressão dos componentes do SNS nos leucócitos revelou correlação significativa e inversa entre TH nos leucócitos e a pressão sistólica. Observamos que a expressão de  $\beta_2$ -AR em leucócitos correlaciona-se diretamente com a pressão sistólica avaliada nos animais normotensos e hipertensos (Figura 17).



**Figura 17. Correlação de Pearson entre a expressão de TH e  $\beta_2$ -AR em leucócitos totais e a pressão sistólica**

Análise de correlação entre o percentual de leucócitos TH+ x pressão sistólica (A). Níveis de leucócitos  $\beta_2$ -AR+ x Pressão sistólica (B).

Além disso, também observamos correlação entre as subpopulações leucocitária e a pressão sistólica. Observamos correlação linear direta e significativa entre a expressão de TH em linfócitos e pressão sistólica e correlação inversa na expressão de TH em granulócitos e a pressão sistólica (Figura 18).



**Figura 18. Correlação de Pearson entre a expressão de TH nas subpopulações leucocitárias e a pressão sistólica**

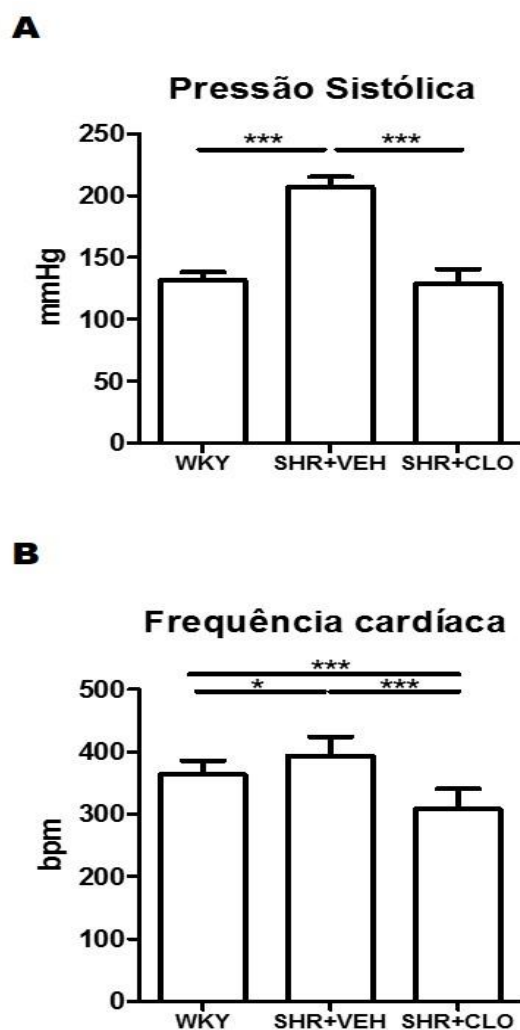
Análise de correlação entre o percentual de granulócitos TH+ x pressão sistólica (A). Níveis de monócitos TH+ x Pressão sistólica (B). Percentual de linfócitos TH+ x pressão sistólica (C).

## **4.2 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM CLONIDINA EM SHR**

Uma vez que nossos resultados demonstraram que os animais apresentam hipertensão e hiperatividade simpática, bem como alteração na expressão de TH e do receptor  $\beta_2$ -AR em leucócitos de sangue periférico, avaliamos se a modulação central do sistema simpático através do tratamento crônico dos animais hipertensos com clonidina, teria algum impacto sobre a expressão destas proteínas nos leucócitos.

### **4.2.1 ANÁLISES HEMODINÂMICAS E DOSAGEM DE CATECOLAMINAS APÓS TRATAMENTO CRÔNICO COM CLONIDINA**

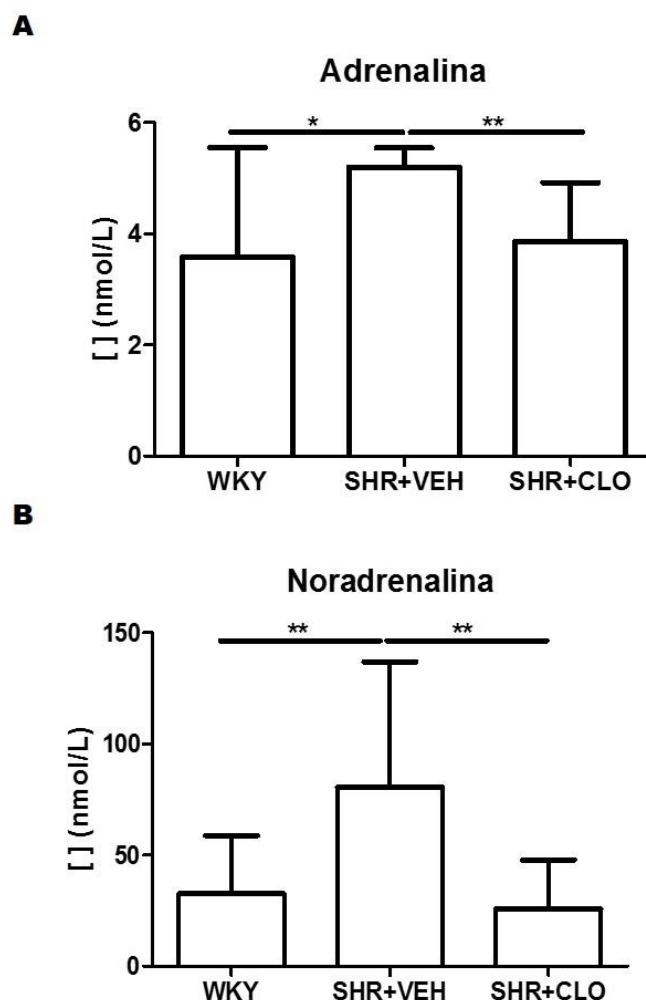
Inicialmente avaliamos o efeito da clonidina sobre os parâmetros hemodinâmicos e os níveis plasmáticos de catecolaminas. O tratamento reduziu a pressão sistólica ( $129 \pm 12$  mmHg) quando comparado a SHR+VEH ( $207 \pm 8$  mmHg;  $P < 0,0001$ ) semelhante ao grupo normotenso ( $132 \pm 7$  mmHg) (Figura 19A), assim como, reduziu a frequência cardíaca ( $308 \pm 32$  bpm) em comparação com ambos WKY ( $363 \pm 22$  bpm;  $P < 0,0001$ ) e SHR+VEH ( $393 \pm 31$  bpm;  $P < 0,0001$ ) (Figura 19B).



**Figura 19. Análises hemodinâmicas de WKY, SHR tratados com veículo e SHR tratados com clonidina**

Pressão arterial sistólica (A) e frequência cardíaca (B) através de fotopleetismografia caudal de ratos Wistar Kyoto (WKY) normotensos, ratos espontaneamente hipertensos tratados com veículo (SHR+VEH) e ratos espontaneamente hipertensos tratados com clonidina (SHR+CLO). Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.  $n= 14-15$  animais/grupo. ANOVA One-way e pós-teste de Tukey. \* $P<0,05$ ; \*\*\* $P<0,0001$ .

Observamos redução significativa dos níveis plasmáticos de noradrenalina ( $25,8\pm 22$  nmol/L  $P<0,01$ ) (Figura 20B) e adrenalina ( $3,9\pm 1,1$  nmol/L  $P <0,01$ ) (Figura 20A) após 28 dias de tratamento com clonidina quando comparado a SHR+VEH ( $80,5\pm 56,5$  e  $5,2\pm 0,3$  nmol/L, respectivamente) (Figura 20).



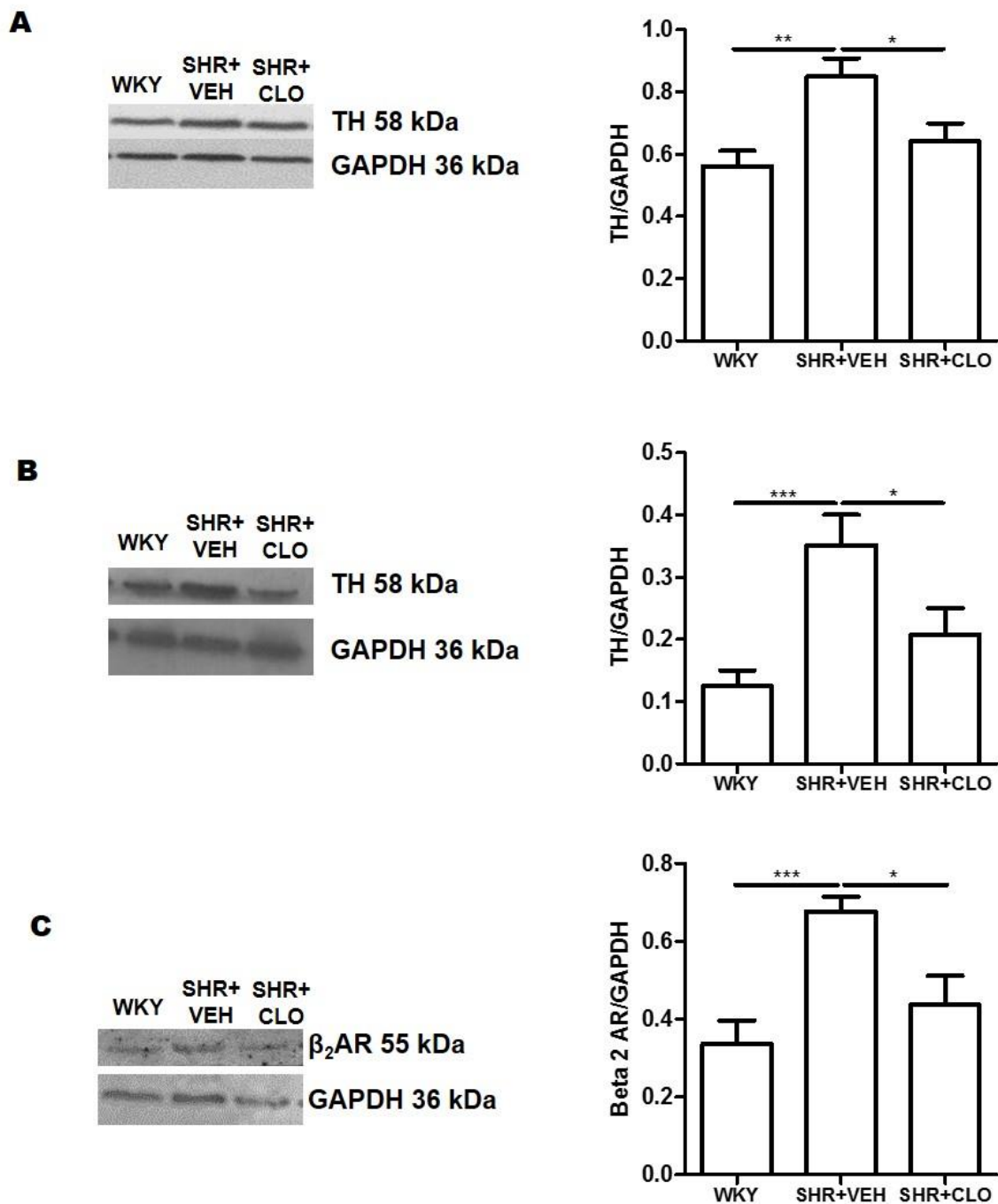
**Figura 20. Níveis plasmáticos de catecolaminas**

Concentração de adrenalina (A) e noradrenalina (B) plasmáticas em ratos WKY normotensos, SHR+VEH e SHR+CLO. n= 11-15 animais/grupo. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão. Teste Kruskal-Wallis seguido por pós-teste de Dunn. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.2.2 EXPRESSÃO DE TH E $\beta_2$ -AR NO BULBO RAQUIDIANO E SUPRARRENAL APÓS TRATAMENTO COM CLONIDINA

Avaliamos a expressão de TH e  $\beta_2$ -AR no bulbo raquidiano e nas glândulas suprarrenais inferiores após a tratamento com clonidina. A análise por western blot confirmou os dados anteriores revelando maiores níveis de TH ( $0,35 \pm 0,17$ ,  $P < 0,05$ ) e de  $\beta_2$ -AR ( $0,68 \pm 0,13$ ,  $P < 0,05$ ) nas amostras de bulbo raquidiano de SHR+VEH em comparação com WKY. O tratamento de SHR com clonidina resultou em redução na expressão de ambas as proteínas ( $0,21 \pm 0,14$  e  $0,44 \pm 0,23$ , respectivamente) (Figura 21B e C) no bulbo raquidiano de SHR em comparação com SHR+VEH. A clonidina também reduziu os níveis de TH nas

glândulas suprarrenais ( $0,64 \pm 0,14$ ,  $P < 0,05$ ) em SHR em comparação com o SHR não tratado ( $0,85 \pm 0,17$ ) (Figura 21A).

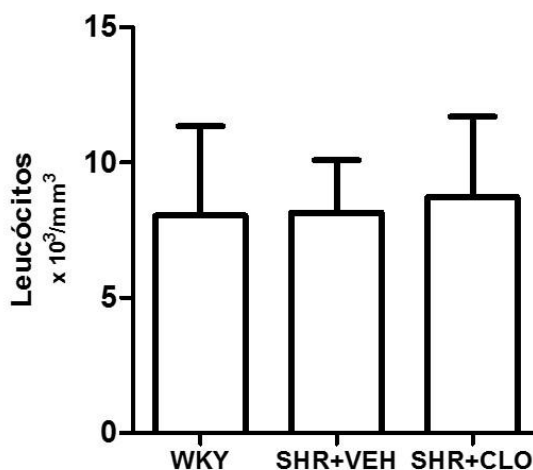


**Figura 21. Western blot de TH e  $\beta_2$ -AR no bulbo raquidiano e suprarrenal**

Níveis de expressão proteica de tirosina hidroxilase (TH) na glândula suprarrenal (A) e no bulbo raquidiano (B) e receptor  $\beta_2$ -adrenérgico ( $\beta_2$ -AR) no bulbo raquidiano (C). Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão.  $n = 7-13$  animais/ grupo. Teste ANOVA One-way e pós-teste de Tukey. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,0001$ .

### 4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS

A contagem de leucócitos totais revelou que não há diferença entre os grupos. O grupo WKY apresentou  $8,03 \pm 3,31 \times 10^3$  leucócitos/mm<sup>3</sup>; SHR+VEH possuiu  $8,14 \pm 1,95 \times 10^3$  leucócitos/mm<sup>3</sup> e SHR+CLO conteve  $8,72 \pm 2,97 \times 10^3$  leucócitos/mm<sup>3</sup> (Figura 22).



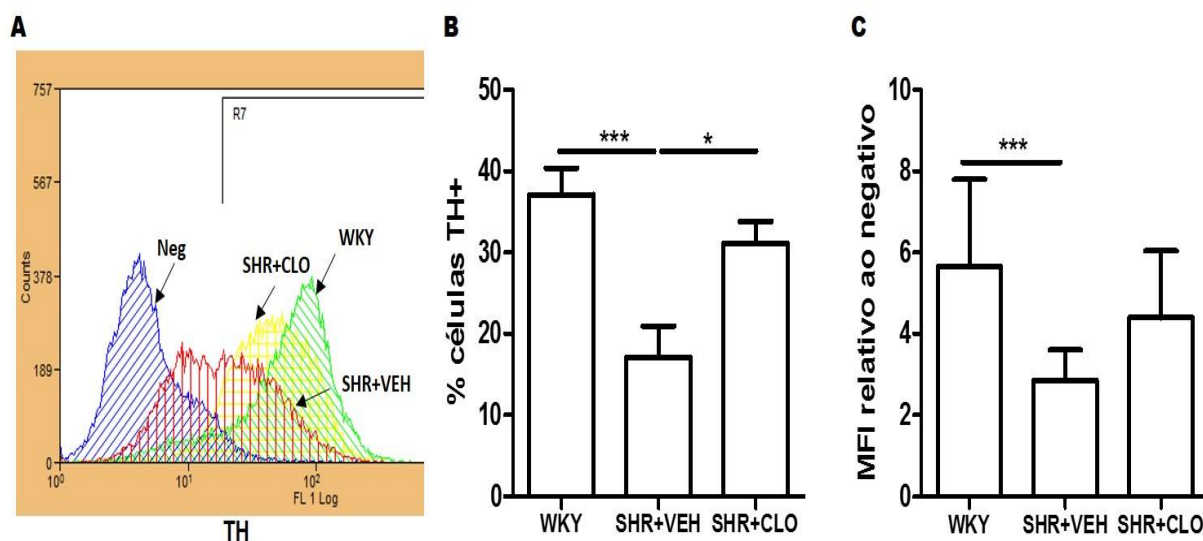
**Figura 22. Quantificação de leucócitos totais**

Contagem de leucócitos totais. Os valores representam média ± desvio padrão. n = 5-11 animais/ grupo. Teste ANOVA One-way e pós-teste de Tukey.

### 4.2.4 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM CLONIDINA NA EXPRESSÃO DE TH E BETA<sub>2</sub>-AR NOS LEUCÓCITOS

A análise de citometria de fluxo revelou diferença significativa entre o percentual de eventos positivos para TH de WKY e SHR+VEH ( $37,1 \pm 11,3$  e  $17,1 \pm 14,5\%$ ,  $P < 0,0001$ , respectivamente). Leucócitos de SHR+CLO apresentaram maior percentual de células TH positivas ( $31,1 \pm 7,9\%$ ,  $P < 0,05$ ) quando comparados aos leucócitos de SHR+VEH e níveis semelhantes aos observados em WKY (Figura 23A e B).

Observamos maior intensidade de fluorescência nos leucócitos de WKY ( $5,65 \pm 2,15$ ) quando comparado à mediana da intensidade de fluorescência de TH em leucócitos de SHR+VEH ( $2,85 \pm 0,75$ ,  $P < 0,0001$ ) (Figura 23C).



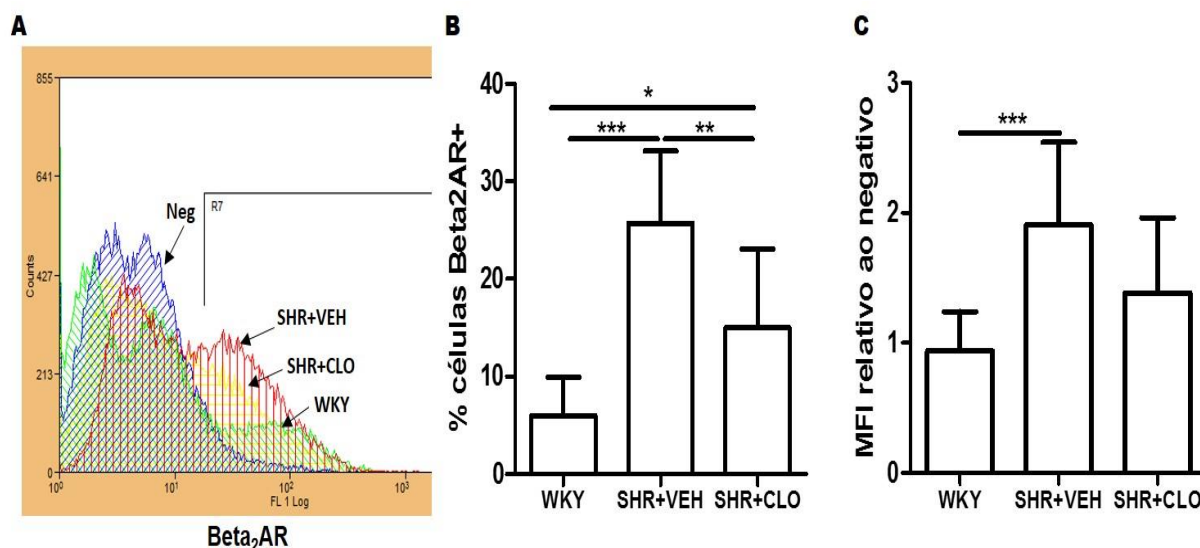
**Figura 23. Análise do percentual de leucócitos expressando tirosina hidroxilase através de citometria de fluxo**

Imagens representativas dos histogramas de marcação para TH (A). Quantificação do percentual de leucócitos expressando TH (B) e análise da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) da marcação (C) em leucócitos totais de ratos WKY, SHR+VEH e SHR+CLO. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.  $n=10$  animais/grupo. ANOVA One-way e pós-teste de Tukey. \* $P<0.05$  e \*\*\* $P<0,0001$ .

Observamos menor percentual de leucócitos positivos para  $\beta_2$ -AR em WKY ( $6,0\pm 3,9\%$ ) comparado ao percentual de leucócitos expressando o receptor em SHR+VEH ( $25,7\pm 7,4\%$ ,  $P<0,0001$ ). O tratamento com CLO em SHR resultou na redução de eventos  $\beta_2$ -AR positivos na população de leucócitos ( $15,0\pm 8,1\%$ ) em comparação com SHR+VEH ( $25,7\pm 7,4\%$ ,  $P<0,01$ ). No entanto, SHR+CLO apresentaram um percentual mais elevado de células  $\beta_2$ -AR positivas em comparação com os normotensos WKY ( $6,0\pm 3,9\%$ ,  $P<0,05$ ) (Figura 24C e D).

Verificamos menor intensidade de fluorescência nos leucócitos de WKY ( $0,94\pm 0,30$ ) quando comparado à mediana da intensidade de fluorescência de  $\beta_2$ -AR em leucócitos de SHR+VEH ( $1,91\pm 0,64$ ,  $P<0,0001$ ) (Figura 24C).



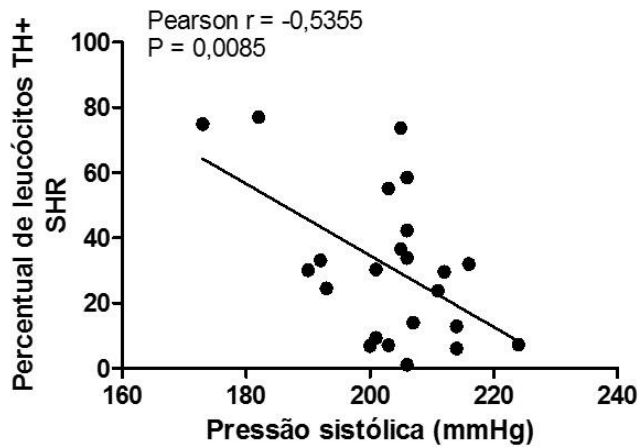


**Figura 24. Análise do percentual de leucócitos expressando receptor  $\beta_2$ -adrenérgico através de citometria de fluxo**

Imagens representativas dos histogramas de marcação para  $\beta_2$ -AR (A). Quantificação do percentual de leucócitos expressando  $\beta_2$ -AR (B) e análise da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) da marcação do receptor (C) em leucócitos totais de ratos WKY, SHR+VEH e SHR+CLO. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.  $n=10$  animais/grupo. ANOVA One-way e pós-teste de Tukey. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,0001$ .

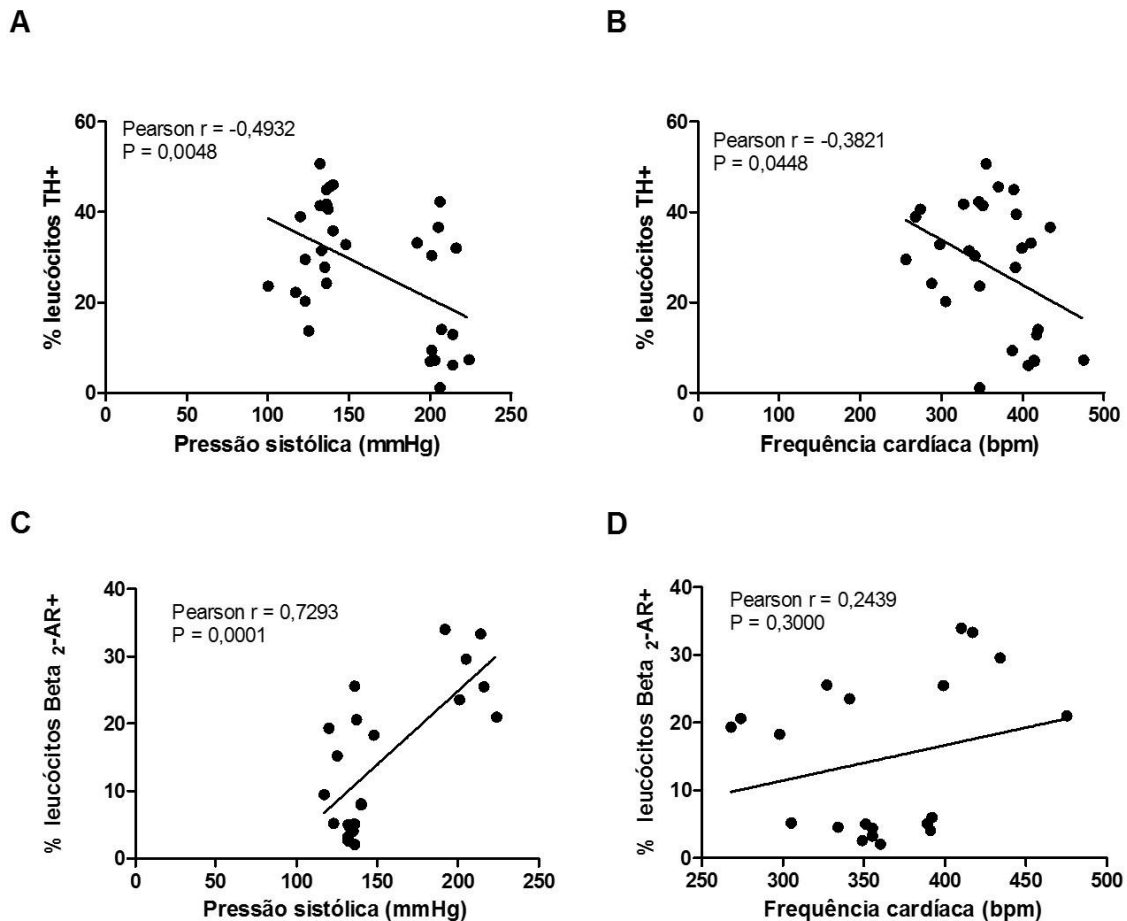
#### 4.2.5 CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DE TH OU BETA<sub>2</sub>-AR EM LECÓCITOS COM PARÂMETROS HEMODINÂMICOS OU NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CATECOLAMINAS APÓS O TRATAMENTO COM CLONIDINA

Quando avaliamos as correlações considerando os grupos experimentais separadamente, verificamos correlação inversa entre TH e a pressão sistólica no grupo SHR (Figura 25). Não observamos correlação nos grupos WKY e CLO ou entre as outras variáveis.



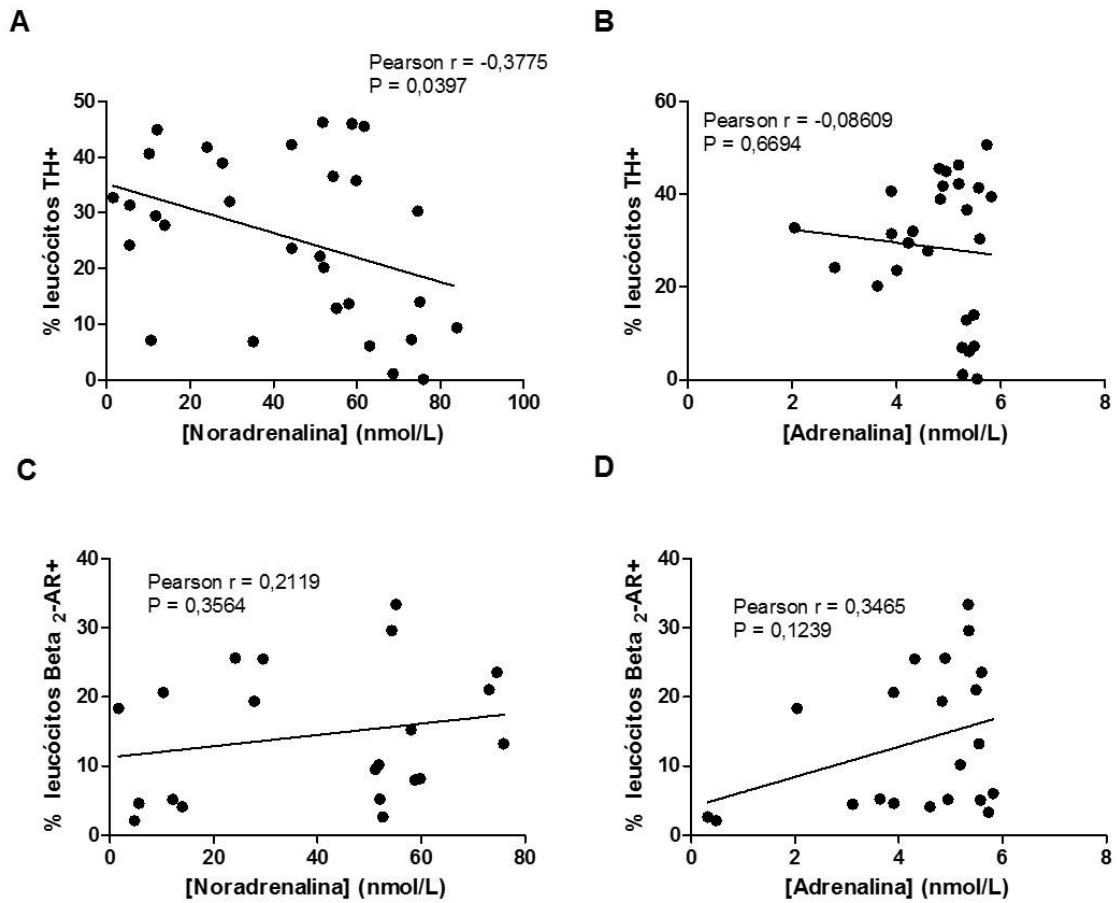
**Figura 25. Correlação de Pearson o percentual de leucócitos de SHR expressando TH e a pressão sistólica**

Considerando animais WKY, SHR+VEH e SHR+CLO como uma população única para a análise de correlação, verificamos que há correlação direta entre expressão de  $\beta_2$ -AR nos leucócitos com a pressão sistólica, o que não foi observado entre o receptor e a frequência cardíaca. Observamos correlação inversa entre o percentual de leucócitos expressando TH com a frequência cardíaca e com a pressão sistólica (Figura 26A e Figura 26B).



**Figura 26. Correlação de Pearson entre o percentual de leucócitos TH ou  $\beta_2$ -AR positivos e a frequência cardíaca e pressão sistólica durante tratamento com clonidina**  
 Análise de correlação entre o percentual de leucócitos TH+ x pressão sistólica (A). Percentual de leucócitos TH+ x Frequência cardíaca (B). Níveis de leucócitos  $\beta_2$ -AR+ x Pressão sistólica (C). Níveis de leucócitos  $\beta_2$ -AR+ x Frequência cardíaca (D).

Observamos correlação linear ( $r = -0,3775$ ;  $P = 0,0397$ ) entre o percentual de leucócitos expressando TH e os níveis plasmáticos de noradrenalina, após tratamento crônico de SHR com clonidina ou veículo (Figura 27A). Não verificamos correlação entre os outros parâmetros.



**Figura 27. Correlação de Pearson entre a expressão de TH ou  $\beta_2$ -AR em leucócitos e níveis plasmáticos de catecolaminas após tratamento com clonidina**

Análise de correlação entre o percentual de leucócitos TH+ x Noradrenalina (A). entre o percentual de leucócitos TH+ x Adrenalina (B). Níveis de leucócitos  $\beta_2$ -AR+ x Noradrenalina (C). Níveis de leucócitos  $\beta_2$ -AR+ x adrenalina (D).

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que animais hipertensos apresentam número reduzido de leucócitos expressando TH e número aumentado de leucócitos expressando  $\beta_2$ -AR, em comparação com animais normotensos. Demonstramos que existe correlação entre a pressão sistólica e a percentual de leucócitos expressando TH e de  $\beta_2$ -AR e entre leucócitos positivos para TH e os níveis plasmáticos de NA e que esse padrão é alterado pelo tratamento dos animais hipertensos com clonidina.

A hiperatividade simpática é um alvo terapêutico da hipertensão arterial não somente através da utilização de fármacos como os beta bloqueadores ou anti-hipertensivos de ação central, mas também através de intervenções como a ativação do barorreflexo e a denervação renal (Grassi et al., 2015). Estas intervenções foram avaliadas em estudos com pacientes que apresentavam hipertensão resistente, já que estes pacientes ainda tinham níveis pressóricos não controlados após o uso de três ou mais anti-hipertensivos incluindo um diurético em suas doses terapêuticas máximas (Malachias et al., 2016).

A terapia de ativação do barorreflexo é feita através da estimulação elétrica do barorreceptor carotídeo bilateral ou monolateral através da implantação de um dispositivo de ativação elétrica do seio carotídeo, induz a redução da PA pela inibição do tônus simpático central (Ilescu et al., 2014; Grassi et al., 2015). O dispositivo baseado de ativação crônica barorreflexa apresentou-se seguro e eficaz em reduzir a PA três meses após a inserção do dispositivo e este efeito foi mantido mesmo após dois anos do procedimento (Scheffers et al., 2010). A diminuição da PA foi correlacionada com a menor atividade do nervo simpático muscular (Heusser et al., 2010).

A denervação renal realizada através de abordagem percutânea com cateter, consiste na ablação bilateral tanto de aferências quanto de eferências dos nervos renais por radiofrequência ou ultrassom (Schlaich et al., 2013; Mancia and Grassi, 2014; Grassi et al., 2015) é também capaz de reduzir a PA. A redução da PA foi acompanhada pela redução do *spillover* de NA renal, menor atividade da renina, aumento do fluxo sanguíneo renal e menor atividade do nervo simpático muscular (Krum et al., 2009; Schlaich et al., 2009). No entanto, alguns estudos não verificam o benefício da intervenção. Brinkmann e colaboradores (Brinkmann et al., 2012) não verificaram redução da PA ou da atividade simpática verificada por microneurografia após seis meses de intervenção. Outro resultado divergente refere-se à

um estudo clínico controlado por procedimento placebo (*sham*) no qual os pacientes passam pelo procedimento cirúrgico no qual não é realizada a denervação renal, somente uma angiografia. Apesar de ter sido verificada a redução da PA, não foi significativamente diferente do grupo *sham* (Bhatt et al., 2014).

Esses procedimentos são recentes e mais estudos a respeito devem ser conduzidos para o melhor esclarecimento sobre as controvérsias de eficácia e mecanismos dessas intervenções. Uma vez que a hiperatividade simpática pode não ser a principal responsável pela patogênese da hipertensão arterial em determinados pacientes, a seleção dos indivíduos torna-se crítica e demonstra a importância da análise de múltiplos marcadores da atividade do SNS.

A atividade simpática em pacientes, no entanto, é avaliada por métodos muito pouco sensíveis ou difíceis de implementar na prática clínica (Grassi and Esler, 1999). Utilizam-se os níveis de catecolaminas plasmáticas e/ou urinárias, microneurografia, *spillover* de noradrenalina ou análise espectral da frequência cardíaca, por exemplo (Guzzetti et al., 1988; Esler et al., 1989; Grassi et al., 1998).

A medida de catecolaminas no plasma e urina não é invasiva e é o parâmetro da atividade simpática mais comumente utilizada no homem. No entanto, estes métodos têm baixa reprodutibilidade e sensibilidade e dependem dos níveis de secreção, recaptção e captação de tecidos (Kopin, 1985). A microneurografia é o registro da atividade do nervo simpático pós-ganglionar do músculo, geralmente estudando nervos peroneais ou braquiais. Essa avaliação local é invasiva e complexa (Deliuss et al., 1972). Outro método de atividade simpática ocorre através da medição da taxa de *spillover* de noradrenalina radioativa no plasma, que foi correlacionada com a atividade simpática muscular (Wallin et al., 1992), no entanto, há risco de exposição radioativa e não há acessibilidade para analisar os nervos simpáticos dos órgãos internos (Grassi and Esler, 1999).

Nesse contexto, torna-se evidente a importância da investigação de marcadores de atividade simpática na clínica médica, especialmente em cardiologia. Biomarcadores são indicadores medidos e avaliados em processos biológicos, patológicos ou em intervenções terapêuticas. Tem aplicações na detecção de doenças, monitoramento do estado de saúde e até mesmo na avaliação de eficácia e segurança nos estudos de intervenções terapêuticas farmacológicas (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). A alta incidência de hipertensão arterial no Brasil e no mundo além dos dados preocupantes relacionados à baixa

eficácia e adesão aos tratamentos, motivam a investigação de novos marcadores que possam ser utilizados na rotina clínica.

Pode-se citar proteína C reativa, hiperuricemia, hiperhomocisteinemia, microalbuminúria e o domínio N terminal da ECA como marcadores da hipertensão arterial. A análise de proteína C reativa em mulheres foi associada com risco aumentado de hipertensão (Sesso et al., 2003), demonstrando a participação inflamatória no desenvolvimento da hipertensão arterial. Níveis maiores que 7 mg/dL de ácido úrico sérico foi associado com o risco de desenvolver hipertensão arterial. Cada unidade de ácido úrico sérico aumentada foi relacionada a um aumento de 9% no risco da incidência de hipertensão (Krishnan et al., 2007). Altos níveis de homocisteína também foram associados com a hipertensão. Os indivíduos que desenvolveram hipertensão apresentaram níveis significativamente mais elevados de homocisteína plasmática do que seus controles correspondentes (Bowman et al., 2006; Wang et al., 2014).

Outro marcador associado com a predição da hipertensão arterial é o nível de excreção urinária de albumina o que evidencia o papel da disfunção endotelial renal na patogênese da doença (Wang et al., 2005). O domínio N terminal da ECA refere-se à isoformas desta enzima que possui a isoforma somática composta por dois domínios C e N e a isoforma germinativa que apresenta somente o domínio C. A presença do domínio N com 90 kDa em amostras de urina foi positivamente associado à hipertensão arterial (Maluf-Meiken et al., 2012).

Além da avaliação individual dos indicadores, foi proposta a quantificação de múltiplos marcadores, já que estes marcadores podem estar correlacionados e a análise integrada pode aumentar a força de predição dos mesmos. Em estudo prospectivo em que se avaliou nove possíveis marcadores, verificou-se que proteína C-reativa, fator ativador do plasminogênio-1 e a razão albumina urinária e creatinina se relacionaram significativamente com a hipertensão arterial (Wang et al., 2007). Esses indicadores de inflamação, potencial fibrinolítico e de função endotelial glomerular foram associados com o risco de hipertensão arterial e podem ser uma benéfica estratégia de predição da patologia.

A utilização de biomarcadores com correlação negativa foram propostos (Martin-Ventura et al., 2004; Blanco-Colio et al., 2007; Jansen et al., 2016). Mais ainda, (Demler et al., 2013) demonstraram que biomarcadores com correlação negativa apresentam maior poder de predição de risco. Modelos estatísticos, por exemplo a área sob a curva de características

de operação do receptor (ROC), são utilizados como medida da qualidade da previsão de risco que orientam a clínica e a medicina preventiva.

Considerando os grupos de animais normotensos e hipertensos como uma única população, verificamos correlação inversa e direta significativa entre as expressões de TH e  $\beta_2$ -AR em leucócitos, respectivamente, com a pressão arterial sistólica. Leucócitos de animais WKY normotensos apresentam maiores níveis de TH comparados aos níveis da enzima em leucócitos de animais hipertensos, a correlação significativa e inversa entre TH e a pressão sistólica indica que menor expressão de TH está relacionado com maiores níveis pressóricos. De modo contrário,  $\beta_2$ -AR foi menos expresso em leucócitos de WKY, assim, maior nível do receptor estão presentes em leucócitos de animais com maiores valores de pressões sistólica.

Nossos resultados corroboram dados da literatura que demonstram que células mononucleares de pacientes hipertensos apresentaram maior expressão de  $\beta_2$ -AR em comparação com controles normotensos. Neste estudo, também foi encontrada correlação significativa da densidade de  $\beta_2$ -AR em células mononucleares com a pressão arterial média. Esta análise foi realizada agrupando como uma população única os dados de pacientes normotensos juntamente com os de pacientes hipertensos (Middeke et al., 1983). Além do receptor  $\beta_2$ -AR, foi observada alteração da expressão do receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico em linfócitos do sangue periférico com os quadros de hipertensão essencial tanto em modelo animal, utilizando-se SHR, quanto em seres humanos. Os autores demonstraram que a expressão de receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos é menor e do receptor  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos é maior nos linfócitos de animais e pacientes hipertensos comparados às células dos controles normotensos (Veglio et al., 2001).

A obesidade, assim como a hipertensão arterial, está relacionada com a atividade simpática (Davy and Orr, 2009). Um estudo que avaliou a expressão gênica de TH em células mononucleares de pacientes com obesidade central revelou que estes apresentam menor expressão de RNAm de TH quando comparados às células mononucleares de paciente não obesos. Apesar do trabalho não se focar na avaliação da atividade simpática, os níveis de catecolaminas foram dosados e não foi verificada diferença entre os pacientes obesos e não obesos (Leite et al., 2016). Nesse contexto, os níveis de TH em células mononucleares pode ser alterado anteriormente à elevação da concentração de catecolaminas plasmáticas ou a hiperatividade simpática nesses pacientes possa ser verificada por outra metodologia como a



microneurografia ou *spillover* de NA mas não através dos níveis plasmáticos de catecolaminas.

A avaliação utilizando amostras de leucócitos pode ser realizada não somente na investigação da hipertensão arterial, mas também em outras doenças, tais como as relacionadas ao estresse. A análise por microarranjo de DNA identificou um perfil de expressão gênica associado com situações de estresse agudo e com a depressão em humanos. Neste estudo, foi desenvolvido um chip contendo 1467 cDNAs que pode ser utilizado tanto na detecção da doença quanto de respostas anormais ao estresse, na resposta à terapia e na avaliação de prognóstico (Rokutan et al., 2005). Foi observado ainda que pacientes com insuficiência cardíaca e com depressão severa apresentaram maior atividade dos  $\beta$ -ARs em células mononucleares (Redwine et al., 2014).

Interações neuroimune-endócrinas são demonstradas em diversos trabalhos tanto no campo da imunologia quanto da neurofisiologia. Além da interação através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o SNC se integra à periferia através do SNS (Eskandari and Sternberg, 2002). O eixo hipotálamo-hipófise se associa com o SNS através dos neurônios presentes no hipotálamo que também fazem sinapses com neurônios pré-motores simpáticos (Hering and Schlaich, 2015). O efeito da sinalização adrenérgica em leucócitos ainda não é bem esclarecido. Em determinadas situações e tipos celulares, NA pode potencializar a inflamação ou ter efeitos inibitórios (Case and Zimmerman, 2016).

O receptor  $\beta_2$ -AR é o principal receptor envolvido na ação de NA em linfócitos T (Case and Zimmerman, 2016). Na presença de NA, células T helper do tipo 1 (Th1) diminuem a secreção da citocina IL-2 de maneira  $\beta_2$ -AR dependente, uma vez que esse efeito não é verificado na presença de antagonista de  $\beta_2$ -AR (Ramer-Quinn et al., 1997). Agonistas  $\beta_2$ -AR promovem a diferenciação de células T helper do tipo 2 (Th2), induzem a transcrição de genes relacionados com a ativação de células Th2 como os genes das citocina IL-4 e IL-5 e inibem a expressão de genes relacionados com a ativação de células Th1, como interferon (IFN) e IL-12 (Panina-Bordignon et al., 1997).

A interação neuroimune também foi observada em um estudo que demonstrou que durante a administração de LPS, ocorreu a indução do tônus simpático no baço, redução dos níveis de TNF e ação anti-inflamatória, o que não foi verificado quando houve a remoção da atividade do nervo simpático esplênico (Meltzer et al., 2004). Raap e colaboradores (Raap et al., 2008) avaliaram a ativação de basófilos *in vitro* e *in vivo* após indução de estresse e

observaram menor ativação dessas células de maneira  $\beta_2$ -AR dependente. O pré-tratamento das células com butoxamina, um antagonista de  $\beta_2$ -AR inibiu o efeito causado pelo estresse e foi observado maior percentual de basófilos ativados.

Por outro lado, foi demonstrada a participação de  $\beta_2$ -AR na diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> naive em linfócitos Th1 e indução de maior produção de IFN- $\gamma$  (Swanson et al., 2001). Camundongos knockout para a enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilase apresentaram respostas imune alteradas ao serem desafiados com *Listeria monocytogenes* ou *Mycobacterium tuberculosis*. Foi verificada maior suscetibilidade à infecção, involução tímica e função alterada das células T, observada pela menor produção de citocinas pelos linfócitos Th1 (Alaniz et al., 1999).

No presente trabalho, a caracterização do modelo demonstrou diferença na porcentagem de células positivas para TH entre as subpopulações leucocitárias. Há menor percentual de linfócitos de WKY positivamente marcados para TH comparado aos linfócitos de SHR e essa expressão correlacionou-se inversamente com a pressão sistólica. Considerando a expressão de TH somente em linfócitos, maiores níveis da enzima estão relacionados com elevada pressão sistólica. Já a análise dos granulócitos, revelou menor percentual de granulócitos expressando TH em SHR, semelhante à expressão nos leucócitos totais.

Diferenças na expressão e ativação entre as subpopulações de leucócitos já foram descritas. Há menor atividade de monoamina oxidase em granulócitos, estas células apresentam atividade 5 vezes menor quando comparada à atividade desta enzima em linfócitos (Balsa et al., 1989). Foi verificada diferença na expressão do receptor  $\beta$ -adrenérgico em leucócitos mononucleares e polimorfonucleares de pacientes com asma brônquica, comparados aos controles. Células mononucleares de pacientes com asma apresentam níveis reduzidos de receptor  $\beta$ -adrenérgico comparadas às células de pacientes saudáveis e não foi verificada diferença entre as células polimorfonucleares dos grupos (Sano et al., 1983).

Independentemente do efeito da sinalização adrenérgica em leucócitos no contexto da hipertensão arterial, parece haver um retrocontrole negativo na expressão de TH e a sinalização do  $\beta_2$ -AR. Uma vez que observamos menor expressão de TH e maior expressão do  $\beta_2$ -AR em leucócitos totais de animais hipertensos comparados aos animais normotensos. Possivelmente, os maiores níveis de catecolaminas circulantes na hipertensão arterial ativam a sinalização adrenérgica nos leucócitos e conseqüentemente inibem a expressão de TH.

A sinalização do SNS pode ocorrer não somente pela secreção de neurotransmissores pela inervação eferente, mas também pode acontecer através dos leucócitos por meio da secreção de catecolaminas por estas células. Leucócitos são fonte de catecolaminas e desempenham papéis essenciais na manutenção da homeostase (Barnes et al., 2015). Considerando o animal normotenso que não tem altos níveis de catecolaminas circulantes, a presença de TH em maiores níveis nos leucócitos pode conferir um meio através do qual a sinalização adrenérgica pode ser realizada quando necessária. Assim como verificado em macrófagos, estas células expressam tirosina hidroxilase em resposta a numerosos estímulos, incluindo LPS, mas também como mecanismo compensatório quando os níveis locais de catecolaminas são baixos (Brown et al., 2003; Barnes et al., 2015).

Como anteriormente mencionado, fatores genéticos também estão envolvidos com a gênese da hipertensão arterial e os polimorfismos de um único nucleotídeo da TH principalmente na posição C-824T foram associados com as alterações bioquímicas e fisiológicas na hipertensão arterial. (Rao et al., 2007). Em estudo populacional desenvolvido na Europa foi observada maior prevalência da hipertensão arterial na população que apresentava homozigose T/T na posição -824 do gene de TH (Nielsen et al., 2010). Esta análise, assim como no nosso trabalho, foi realizada em amostras de sangue, uma amostra de fácil coleta, no entanto, a genotipagem atualmente ainda é uma técnica onerosa e que necessita de treinamento especializado para execução e análise.

Além da enzima limitante da síntese de catecolaminas, TH, os receptores  $\beta$ -adrenérgicos também têm papel importante no desenvolvimento da hipertensão, estão presentes no SNC e a administração intracerebroventricular de antagonistas não-seletivos de  $\beta$ -AR evita o aumento da atividade nervosa renal induzida pelo estresse em SHRs (Koepke and DiBona, 1985). Além disso, a administração de antagonista seletivo de  $\beta_2$ -AR intracerebroventricular, intrahipotalâmica ou intracisternal também previne o aumento da pressão arterial induzida pela estimulação elétrica da região C1 na região ventrolateral rostral do bulbo raquidiano (Ward-Routledge et al., 1988).

A importância do receptor  $\beta$  adrenérgico também foi demonstrada em células da medula óssea. A presença de receptores  $\beta_1$ -AR e  $\beta_2$ -AR em células da medula óssea foi associada com menor pressão sistólica e menor número de células T, monócitos e neutrófilos circulantes (Ahmari et al., 2016).

O polimorfismo de  $\beta_2$ -AR também é alvo de estudo. Verificou-se que o polimorfismo R16G do receptor está associado com a hipertensão arterial primária (Filigheddu et al., 2004). Estudo com pacientes hipertensos revelou maior risco de doenças cardiovasculares e morte em pacientes com o polimorfismo GluGln em Glu27Gln do  $\beta_2$ -AR comparado aos pacientes que apresentavam o polimorfismo GlnGln (Iwamoto et al., 2011). Em ambas as análises, as genotipagens de  $\beta_2$ -AR foram realizadas em amostras de leucócitos de sangue o que corrobora a utilização dessas células no nosso estudo, no entanto, como anteriormente mencionado, a implementação de genotipagem na rotina clínica é dificultada pela necessidade de equipamentos e reagentes específicos e de alto custo.

Nossos resultados confirmam a hiperatividade do sistema nervoso simpático na hipertensão (Jones et al., 1990; Burgi et al., 2011), demonstrada pelo aumento da expressão de TH e  $\beta_2$ -AR nos reguladores do SNS (bulbo raquidiano e na glândula suprarrenal) de SHR em comparação ao WKY e pela correlação direta significativa dessas proteínas com a pressão sistólica. Apesar de não termos avaliado a atividade enzimática, a maior expressão de TH ocorreu em paralelo aos maiores níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina nos animais hipertensos. Indicando que há também maior atividade enzimática de TH em SHR.

Nossos dados de maiores níveis proteicos de TH no bulbo raquidiano e na glândula suprarrenal de SHR corroboram os trabalhos anteriores sobre a expressão gênica de TH nesses tecidos (Kumai et al., 1994; Kumai et al., 1996; Reja et al., 2002). Os níveis mais elevados de TH poderia ser explicado pelas alterações no sistema de ubiquitina-proteassoma do animal hipertenso. Foi observado que a atividade deste sistema responsável pela degradação intracelular de proteínas é reduzida em neurônios hipotalâmicos e do tronco encefálico de SHRs e pode ser uma das causas do aumento dos níveis de TH verificados na hipertensão. (Carbajosa et al., 2015).

Apesar de outras classes de anti-hipertensivos possuírem ações indiretas sobre o SNS, como demonstrado através do tratamento com bloqueadores de Ang II reduzir a atividade simpática cardíaca, avaliada por imagem com o uso de  $^{123}\text{I}$ -MIBG- um análogo radiotivo da NA- em pacientes com hipertensão primária (Narumi et al., 2011) ou através do tratamento de pacientes hipertensos com bloqueador de canais de cálcio - azelnidipino - 8 semanas reduziu a atividade simpática muscular (Inomata et al., 2014). Avaliamos as possíveis alterações da expressão de TH e  $\beta_2$ -AR moduladas pela hiperatividade simpática após o tratamento crônico com o agente de ação central clonidina.

O tratamento de SHR com clonidina, como esperado, resultou em redução dos níveis de pressão sistólica e frequência cardíaca assim como menor atividade simpática, aqui evidenciada por menores concentrações de adrenalina e noradrenalina plasmáticas, menores expressões de TH no bulbo raquidiano e na suprarrenal, além de menor expressão de  $\beta_2$ -AR no bulbo raquidiano, demonstrando novamente a relação da atividade simpática e a hipertensão arterial.

O tratamento com clonidina também modulou as alterações observadas em leucócitos de SHR. Foram verificadas maior expressão de TH e menor de  $\beta_2$ -AR comparados aos níveis em SHR não tratados. Após tratamento de SHR foi verificado percentual de leucócitos TH positivos semelhantes aos observados em animais WKY que não apresentam a hiperatividade simpática. Isso foi confirmado pelas análises de correlação, foi verificada correlação inversa da expressão de TH em leucócitos com a frequência cardíaca e com os níveis de noradrenalina. Por outro lado, não foi encontrada correlação significativa entre a expressão do receptor com a frequência cardíaca ou com níveis de noradrenalina ou adrenalina plasmáticos.

Nossos resultados sobre a expressão de leucócitos positivos para TH e  $\beta_2$ -AR não excluem o efeito direto que a clonidina pode ter sobre essas células. A fim de avaliar este efeito, análises *in vitro* do tratamento de leucócitos com clonidina devem ser realizadas. No entanto, a incubação de células mononucleares de sangue periférico com 4 $\mu$ M de clonidina por duas horas não alterou a densidade de receptores  $\beta$  adrenérgicos, sem distinção entre  $\beta_1$  e  $\beta_2$ -AR (Zoukos et al., 1992), o que indica que a clonidina não tem efeito direto sobre essas células.

Se houver a confirmação de que leucócitos totais refletem a atividade simpática sistêmica através da expressão de TH e  $\beta_2$ -AR, a avaliação na rotina laboratorial não demandaria implantação de equipamentos extras. Citometria de fluxo é uma técnica rotineiramente utilizada em laboratórios de análises clínicas, a distinção entre leucemias mieloide e linfóide é realizada por esta metodologia (Weir and Borowitz, 2001). Citometria de fluxo é uma importante ferramenta, rápida e barata, para o diagnóstico e acompanhamento de alterações genéticas do sistema imune, as imunodeficiências primárias (Abraham and Aubert, 2016). O avanço da técnica multiplica a aplicabilidade nos diagnósticos e se torna ainda mais acessível. Apesar de haver diferença na expressão de TH nas subpopulações leucocitárias, houve correlação significativa quando analisamos os leucócitos totais com a atividade

simpática. Desse modo, não é necessário a separação das células o que facilita, agiliza e reduz custo da avaliação.

A interpretação dessa análise da atividade do SNS pode melhorar a eficácia de tratamento da hipertensão arterial que atualmente é muito baixa e preocupante, somente 32% dos pacientes tratados apresentam a PA controlada (Chow et al., 2013). Apesar da hiperatividade simpática ocorrer em uma parcela considerável dos pacientes hipertensos (Esler et al., 2010), o tratamento com inibidores adrenérgicos de ação central é pouco utilizado. Os agentes de ação central foram classificados com o grau de recomendação IIB de modo que não são os fármacos de primeira escolha. No entanto, se houver a evidência de que a hipertensão de um indivíduo é associada com a atividade simpática, através da análise de TH em leucócitos, seria indicado o tratamento com medicamentos de ação central. Apesar dos diversos efeitos colaterais dos medicamentos atuais desta classe de anti-hipertensivos, a evolução dos fármacos de ação central pode motivar suas utilizações na clínica. Os antihipertensivos segunda geração como a rilmenidina e moxonidina tem menor incidência de efeitos colaterais por apresentarem maior seletividade aos receptores imidazolínicos do tipo 1 em relação ao receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. Nesse contexto, há um grande interesse em desenvolver agentes com maior seletividade e afinidade aos receptores imidazolínicos I<sub>1</sub> (Nikolic and Agbaba, 2012).

A utilização do marcador proposto poderia ser benéfica não somente na hipertensão arterial mas também em outras doenças em que há o envolvimento da hiperatividade do SNS, como a síndrome metabólica (Mancia et al., 2007; Moreira et al., 2015) e a insuficiência cardíaca congestiva em pacientes com fração de ejeção normal (Florea and Cohn, 2014).

Em resumo, nossos resultados demonstram que leucócitos que expressam TH e  $\beta_2$ -AR são alterados na hipertensão arterial e pelo tratamento com clonidina. O que pode contribuir para o entendimento dos mecanismos associados à hipertensão, o prognóstico e na escolha e avaliação da eficácia do tratamento.

## 6. CONCLUSÕES

- Confirmamos a hiperatividade simpática em SHR através da verificação de níveis elevados de adrenalina e noradrenalina plasmáticas em associação com a maior expressão de TH e  $\beta_2$ -AR no bulbo raquidiano e na suprarrenal.
- O tratamento com clonidina induziu uma redução concomitante da atividade simpática sistêmica e dos níveis de TH e  $\beta_2$ -AR no bulbo raquidiano e na suprarrenal.
- Há uma alteração dos percentuais de leucócitos expressando TH e  $\beta_2$ -AR na hipertensão arterial primária que é modulada pela inibição da atividade simpática central induzida pelo tratamento com clonidina.
- Existe correlação inversa entre o percentual de leucócitos TH positivos com a pressão sistólica, com a frequência cardíaca e com os níveis de noradrenalina.

Os percentuais de leucócitos de sangue periférico que expressam  $\beta_2$ -AR e TH são modificados em paralelo à hiperatividade simpática e à modulação desta após o tratamento com clonidina em modelo experimental de hipertensão arterial primária. Estes resultados justificam a realização de estudos futuros para a avaliação da utilização destes parâmetros como marcadores da atividade simpática sistêmica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, R.S., and Aubert, G. (2016). Flow Cytometry, a Versatile Tool for Diagnosis and Monitoring of Primary Immunodeficiencies. *Clin Vaccine Immunol* 23(4), 254-271. doi: 10.1128/cvi.00001-16.
- Ahmari, N., Schmidt, J.T., Krane, G.A., Malphurs, W., Cunningham, B.E., Owen, J.L., et al. (2016). Loss of bone marrow adrenergic beta 1 and 2 receptors modifies transcriptional networks, reduces circulating inflammatory factors, and regulates blood pressure. *Physiol Genomics* 48(7), 526-536. doi: 10.1152/physiolgenomics.00039.2016.
- Alaniz, R.C., Thomas, S.A., Perez-Melgosa, M., Mueller, K., Farr, A.G., Palmiter, R.D., et al. (1999). Dopamine beta-hydroxylase deficiency impairs cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5), 2274-2278.
- Allen, A.M. (2002). Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension* 39(2), 275-280.
- Allen, A.M., McKinley, M.J., Oldfield, B.J., Dampney, R.A., and Mendelsohn, F.A. (1988). Angiotensin II receptor binding and the baroreflex pathway. *Clin Exp Hypertens A* 10 Suppl 1, 63-78.
- Andre, P., Debray, M., Scherrmann, J.M., and Cisternino, S. (2009). Clonidine transport at the mouse blood-brain barrier by a new H<sup>+</sup> antiporter that interacts with addictive drugs. *J Cereb Blood Flow Metab* 29(7), 1293-1304. doi: 10.1038/jcbfm.2009.54.
- Ba, D., Takeichi, N., Kodama, T., and Kobayashi, H. (1982). Restoration of T cell depression and suppression of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) by thymus grafts or thymus extracts. *J Immunol* 128(3), 1211-1216.
- Bakris, G.L., and Mensah, G.A. (2003). Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiology Clinics* 20(2), 195-206. doi: 10.1016/S0733-8651(02)00003-6.
- Balligand, J.L. (2016). Cardiac salvage by tweaking with beta-3-adrenergic receptors. *Cardiovasc Res* 111(2), 128-133. doi: 10.1093/cvr/cvw056.
- Balsa, M.D., Gomez, N., and Unzeta, M. (1989). Characterization of monoamine oxidase activity present in human granulocytes and lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 992(2), 140-144.
- Barnes, M.A., Carson, M.J., and Nair, M.G. (2015). Non-traditional cytokines: How catecholamines and adipokines influence macrophages in immunity, metabolism and the central nervous system. *Cytokine* 72(2), 210-219. doi: 10.1016/j.cyto.2015.01.008.
- Bhatt, D.L., Kandzari, D.E., O'Neill, W.W., D'Agostino, R., Flack, J.M., Katzen, B.T., et al. (2014). A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. *N Engl J Med* 370(15), 1393-1401. doi: 10.1056/NEJMoa1402670.



- Biomarkers Definitions Working Group (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69(3), 89-95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989.
- Blanco-Colio, L.M., Martin-Ventura, J.L., Munoz-Garcia, B., Orbe, J., Paramo, J.A., Michel, J.B., et al. (2007). Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(4), 916-922. doi: 10.1161/01.ATV.0000258972.10109.ff.
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., et al. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405(6785), 458-462. doi: 10.1038/35013070.
- Bowman, T.S., Gaziano, J.M., Stampfer, M.J., and Sesso, H.D. (2006). Homocysteine and risk of developing hypertension in men. *J Hum Hypertens* 20(8), 631-634. doi: 10.1038/sj.jhh.1002052.
- Brandão, A.A., Magalhães, M.E.C., Ávila, A., Tavares, A., Machado, C.A., Campana, É.M.G., et al. (2010). Conceituação, epidemiologia e prevenção primária. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 32, 1-4.
- Brinkmann, J., Heusser, K., Schmidt, B.M., Menne, J., Klein, G., Bauersachs, J., et al. (2012). Catheter-based renal nerve ablation and centrally generated sympathetic activity in difficult-to-control hypertensive patients: prospective case series. *Hypertension* 60(6), 1485-1490. doi: 10.1161/hypertensionaha.112.201186.
- Brodde, O.E., Prywarra, A., Daul, A., Anlauf, M., and Bock, K.D. (1984). Correlation between lymphocyte beta 2-adrenoceptor density and mean arterial blood pressure: elevated beta-adrenoceptors in essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 6(4), 678-682.
- Brown, S.W., Meyers, R.T., Brennan, K.M., Rumble, J.M., Narasimhachari, N., Perozzi, E.F., et al. (2003). Catecholamines in a macrophage cell line. *J Neuroimmunol* 135(1-2), 47-55.
- Burgi, K., Cavalleri, M.T., Alves, A.S., Britto, L.R., Antunes, V.R., and Michelini, L.C. (2011). Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(2), R264-271. doi: 10.1152/ajpregu.00687.2009.
- Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Hieble, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., et al. (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 46(2), 121-136.
- Carbajosa, N.A.L., Corradi, G., Verrilli, M.A.L., Guil, M.J., Vatta, M.S., and Gironacci, M.M. (2015). Tyrosine Hydroxylase Is Short-Term Regulated by the Ubiquitin-Proteasome System in PC12 Cells and Hypothalamic and Brainstem Neurons from Spontaneously Hypertensive Rats: Possible Implications in Hypertension. *PLoS ONE* 10(2), e0116597. doi: 10.1371/journal.pone.0116597.

- Carnevale, D., Perrotta, M., Pallante, F., Fardella, V., Iacobucci, R., Fardella, S., et al. (2016). A cholinergic-sympathetic pathway primes immunity in hypertension and mediates brain-to-spleen communication. *Nat Commun* 7, 13035. doi: 10.1038/ncomms13035.
- Case, A.J., and Zimmerman, M.C. (2016). Sympathetic-mediated activation versus suppression of the immune system: consequences for hypertension. *J Physiol* 594(3), 527-536. doi: 10.1113/jp271516.
- Chan, S.H., Tai, M.H., Li, C.Y., and Chan, J.Y. (2006). Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Biol Med* 40(11), 2028-2039. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.032.
- Chavan, S.S., Pavlov, V.A., and Tracey, K.J. (2017). Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity* 46(6), 927-942. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.008.
- Chi, D.S., Neumann, J.K., Mota-Marquez, M., and Dubberley, F.A. (1993). Effects of acute stress on lymphocyte B<sub>2</sub>-adrenoceptors in white males. *Journal of Psychosomatic Research* 37(7), 763-770. doi: 10.1016/0022-3999(93)90105-O.
- Chow, C.K., Teo, K.K., Rangarajan, S., Islam, S., Gupta, R., Avezum, A., et al. (2013). Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *Jama* 310(9), 959-968. doi: 10.1001/jama.2013.184182.
- Cohn, J.N., Pfeffer, M.A., Rouleau, J., Sharpe, N., Swedberg, K., Straub, M., et al. (2003). Adverse mortality effect of central sympathetic inhibition with sustained-release moxonidine in patients with heart failure (MOXCON). *Eur J Heart Fail* 5(5), 659-667.
- Colombari, E., Sato, M.A., Cravo, S.L., Bergamaschi, C.T., Campos, R.R., and Lopes, O.U. (2001). Role of the Medulla Oblongata in Hypertension. *Hypertension* 38(3), 549-554. doi: 10.1161/01.hyp.38.3.549.
- Cosentino, M., Marino, F., Bombelli, R., Ferrari, M., Lecchini, S., and Frigo, G. (1999). Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage and uptake in human neutrophils. *Life Sci* 64(11), 975-981.
- Cotecchia, S., Del Vescovo, C.D., Colella, M., Caso, S., and Diviani, D. (2015). The alpha1-adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: signaling mechanisms and functional implications. *Cell Signal* 27(10), 1984-1993. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.06.009.
- Cowley, A.W., Jr. (1992). Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev* 72(1), 231-300.
- Curtis, J.J., Luke, R.G., Dustan, H.P., Kashgarian, M., Welchel, J.D., Jones, P., et al. (1983). Remission of essential hypertension after renal transplantation. *N Engl J Med* 309(17), 1009-1015. doi: 10.1056/nejm198310273091702.
- Dahl, L.K., and Heine, M. (1975). Primary role of renal homografts in setting chronic blood pressure levels in rats. *Circ Res* 36(6), 692-696.

- Dampney, R.A. (2016). Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. *Adv Physiol Educ* 40(3), 283-296. doi: 10.1152/advan.00027.2016.
- Dampney, R.A., Horiuchi, J., Killinger, S., Sheriff, M.J., Tan, P.S., and McDowall, L.M. (2005). Long-term regulation of arterial blood pressure by hypothalamic nuclei: some critical questions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32(5-6), 419-425. doi: 10.1111/j.1440-1681.2005.04205.x.
- Davidov, M., Kakaviatos, N., and Finnerty, F.A. (1967). The antihypertensive effects of an imidazoline compound. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 8(6), 810-816. doi: 10.1002/cpt196786810.
- Davy, K.P., and Orr, J.S. (2009). Sympathetic Nervous System Behavior in Human Obesity. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 33(2), 116-124. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.05.024.
- Defelice, A., Lape, H., Horan, P., Frering, R., Brousseau, A., O'Connor, B., et al. (1990). Antihypertensive, vasodilating, and sympatholytic activities of ofornine® in spontaneously hypertensive rats. *Drug Development Research* 20(3), 277-290. doi: 10.1002/ddr.430200303.
- Delius, W., Hagbarth, K.E., Hongell, A., and Wallin, B.G. (1972). General characteristics of sympathetic activity in human muscle nerves. *Acta Physiol Scand* 84(1), 65-81. doi: 10.1111/j.1748-1716.1972.tb05158.x.
- Demler, O.V., Pencina, M.J., and D'Agostino, R.B., Sr. (2013). Impact of correlation on predictive ability of biomarkers. *Stat Med* 32(24), 4196-4210. doi: 10.1002/sim.5824.
- Denes, A., Boldogkoi, Z., Uherezky, G., Hornyak, A., Rusvai, M., Palkovits, M., et al. (2005). Central autonomic control of the bone marrow: multisynaptic tract tracing by recombinant pseudorabies virus. *Neuroscience* 134(3), 947-963. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.03.060.
- Dessy, C., and Balligand, J.L. (2010). Beta3-adrenergic receptors in cardiac and vascular tissues emerging concepts and therapeutic perspectives. *Adv Pharmacol* 59, 135-163. doi: 10.1016/s1054-3589(10)59005-7.
- Elam, M., Sverrisdottir, Y.B., Rundqvist, B., McKenzie, D., Wallin, B.G., and Macefield, V.G. (2003). Pathological sympathoexcitation: how is it achieved? *Acta Physiol Scand* 177(3), 405-411. doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01080.x.
- Eskandari, F., and Sternberg, E.M. (2002). Neural-Immune Interactions in Health and Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 966(1), 20-27. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04198.x.
- Esler, M. (2014). Sympathetic nervous system moves toward center stage in cardiovascular medicine: from Thomas Willis to resistant hypertension. *Hypertension* 63(3), e25-32. doi: 10.1161/hypertensionaha.113.02439.
- Esler, M., Jackman, G., Leonard, P., Bobik, A., Skews, H., Jennings, G., et al. (1980). Determination of noradrenaline uptake, spillover to plasma and plasma concentration in patients with essential hypertension. *Clin Sci (Lond)* 59 Suppl 6, 311s-313s.

- Esler, M., Jennings, G., Korner, P., Blombery, P., Sacharias, N., and Leonard, P. (1984). Measurement of total and organ-specific norepinephrine kinetics in humans. *Am J Physiol* 247(1 Pt 1), E21-28.
- Esler, M., Lambert, E., and Schlaich, M. (2010). Point: Chronic activation of the sympathetic nervous system is the dominant contributor to systemic hypertension. *J Appl Physiol (1985)* 109(6), 1996-1998; discussion 2016. doi: 10.1152/jappphysiol.00182.2010.
- Esler, M., Lambert, G., Brunner-La Rocca, H.P., Vaddadi, G., and Kaye, D. (2003). Sympathetic nerve activity and neurotransmitter release in humans: translation from pathophysiology into clinical practice. *Acta Physiol Scand* 177(3), 275-284. doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01089.x.
- Esler, M., Lambert, G., and Jennings, G. (1989). Regional norepinephrine turnover in human hypertension. *Clin Exp Hypertens A* 11 Suppl 1, 75-89.
- Esler, M., Lux, A., Jennings, G., Hastings, J., Socratous, F., and Lambert, G. (2004). Rilmenidine sympatholytic activity preserves mental stress, orthostatic sympathetic responses and adrenaline secretion. *J Hypertens* 22(8), 1529-1534.
- Filigheddu, F., Reid, J.E., Troffa, C., PinnaParpaglia, P., Argiolas, G., Testa, A., et al. (2004). Genetic polymorphisms of the [beta]-adrenergic system: association with essential hypertension and response to [beta]-blockade. *Pharmacogenomics J* 4(3), 154-160.
- Florea, V.G., and Cohn, J.N. (2014). The autonomic nervous system and heart failure. *Circ Res* 114(11), 1815-1826. doi: 10.1161/circresaha.114.302589.
- Folkow, B., Hallback, M., Lundgren, Y., Sivertsson, R., and Weiss, L. (1973). Importance of adaptive changes in vascular design for establishment of primary hypertension, studied in man and in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 32, Suppl 1:2-16.
- Ganta, C.K., Lu, N., Helwig, B.G., Blecha, F., Ganta, R.R., Zheng, L., et al. (2005). Central angiotensin II-enhanced splenic cytokine gene expression is mediated by the sympathetic nervous system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(4), H1683-1691. doi: 10.1152/ajpheart.00125.2005.
- Geyskes, G.G., Boer, P., and Dorhout Mees, E.J. (1979). Clonidine withdrawal. Mechanism and frequency of rebound hypertension. *British Journal of Clinical Pharmacology* 7(1), 55-62.
- Gilsbach, R., Albarran-Juarez, J., and Hein, L. (2011). Pre- versus postsynaptic signaling by alpha(2)-adrenoceptors. *Curr Top Membr* 67, 139-160. doi: 10.1016/b978-0-12-384921-2.00007-0.
- Giovannitti, J.A., Thoms, S.M., and Crawford, J.J. (2015). Alpha-2 Adrenergic Receptor Agonists: A Review of Current Clinical Applications. *Anesthesia Progress* 62(1), 31-38. doi: 10.2344/0003-3006-62.1.31.
- Goridis, C., and Rohrer, H. (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* 3(7), 531-541. doi: 10.1038/nrn871.

- Grassi, G., Cattaneo, B.M., Seravalle, G., Lanfranchi, A., and Mancia, G. (1998). Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension* 31(1), 68-72.
- Grassi, G., and Esler, M. (1999). How to assess sympathetic activity in humans. *J Hypertens* 17(6), 719-734.
- Grassi, G., Mark, A., and Esler, M. (2015). The sympathetic nervous system alterations in human hypertension. *Circ Res* 116(6), 976-990. doi: 10.1161/circresaha.116.303604.
- Grassi, G., Seravalle, G., Cattaneo, B.M., Lanfranchi, A., Vailati, S., Giannattasio, C., et al. (1995). Sympathetic activation and loss of reflex sympathetic control in mild congestive heart failure. *Circulation* 92(11), 3206-3211.
- Greenwood, J.P., Scott, E.M., Stoker, J.B., and Mary, D.A. (2000). Chronic I(1)-imidazoline agonism : sympathetic mechanisms in hypertension. *Hypertension* 35(6), 1264-1269.
- Guyenet, P.G. (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7(5), 335-346. doi: 10.1038/nrn1902.
- Guyton, A.C. (1991). Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science* 252(5014), 1813-1816.
- Guyton, J.E.H.A.C. (2011). *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia, Pa. : Saunders/Elsevier
- Guzik, T.J., Hoch, N.E., Brown, K.A., McCann, L.A., Rahman, A., Dikalov, S., et al. (2007). Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 204(10), 2449-2460. doi: 10.1084/jem.20070657.
- Guzzetti, S., Piccaluga, E., Casati, R., Cerutti, S., Lombardi, F., Pagani, M., et al. (1988). Sympathetic predominance in essential hypertension: a study employing spectral analysis of heart rate variability. *J Hypertens* 6(9), 711-717.
- Hall, J.E., Granger, J.P., do Carmo, J.M., da Silva, A.A., Dubinon, J., George, E., et al. (2012). Hypertension: physiology and pathophysiology. *Compr Physiol* 2(4), 2393-2442. doi: 10.1002/cphy.c110058.
- Hanna, P., Rajendran, P.S., Ajijola, O.A., Vaseghi, M., Andrew Armour, J., Ardell, J.L., et al. (2017). Cardiac neuroanatomy - Imaging nerves to define functional control. *Auton Neurosci*. doi: 10.1016/j.autneu.2017.07.008.
- Hering, D., and Schlaich, M. (2015). The Role of Central Nervous System Mechanisms in Resistant Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 17(8), 58. doi: 10.1007/s11906-015-0570-0.
- Heusser, K., Tank, J., Engeli, S., Diedrich, A., Menne, J., Eckert, S., et al. (2010). Carotid baroreceptor stimulation, sympathetic activity, baroreflex function, and blood pressure in hypertensive patients. *Hypertension* 55(3), 619-626. doi: 10.1161/hypertensionaha.109.140665.

- Hu, L., Zhu, D.N., Yu, Z., Wang, J.Q., Sun, Z.J., and Yao, T. (2002). Expression of angiotensin II type 1 (AT(1)) receptor in the rostral ventrolateral medulla in rats. *J Appl Physiol (1985)* 92(5), 2153-2161. doi: 10.1152/jappphysiol.00261.2001.
- Iliescu, R., Tudorancea, I., and Lohmeier, T.E. (2014). Baroreflex activation: from mechanisms to therapy for cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 16(8), 453. doi: 10.1007/s11906-014-0453-9.
- Inomata, J., Murai, H., Kaneko, S., Hamaoka, T., Ikeda, T., Kobayashi, D., et al. (2014). Differential effects of azelnidipine and amlodipine on sympathetic nerve activity in patients with primary hypertension. *J Hypertens* 32(9), 1898-1904. doi: 10.1097/hjh.0000000000000270.
- Irwin, M.R., and Cole, S.W. (2011). Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems. *Nat Rev Immunol* 11(9), 625-632.
- Iwamoto, Y., Ohishi, M., Yuan, M., Tatara, Y., Kato, N., Takeya, Y., et al. (2011). [beta]-Adrenergic receptor gene polymorphism is a genetic risk factor for cardiovascular disease: a cohort study with hypertensive patients. *Hypertens Res* 34(5), 573-577.
- Jansen, E.E., Vogel, K.R., Salomons, G.S., Pearl, P.L., Rouillet, J.B., and Gibson, K.M. (2016). Correlation of blood biomarkers with age informs pathomechanisms in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADHD), a disorder of GABA metabolism. *J Inherit Metab Dis* 39(6), 795-800. doi: 10.1007/s10545-016-9980-7.
- Jiang, M., and Bajpayee, N.S. (2009). Molecular mechanisms of go signaling. *Neurosignals* 17(1), 23-41. doi: 10.1159/000186688.
- Johnson, A.K., Zhang, Z., Clayton, S.C., Beltz, T.G., Hurley, S.W., Thunhorst, R.L., et al. (2015). The roles of sensitization and neuroplasticity in the long-term regulation of blood pressure and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 309(11), R1309-1325. doi: 10.1152/ajpregu.00037.2015.
- Johnson, R.J., Feig, D.I., Nakagawa, T., Sanchez-Lozada, L.G., and Rodriguez-Iturbe, B. (2008). Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. *J Hypertens* 26(3), 381-391. doi: 10.1097/HJH.0b013e3282f29876.
- Jones, C.R., Palacios, J.M., Hoyer, D., and Buhler, F.R. (1990). Receptor modification in the brains of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats: regionally specific and selective increase in cerebellar beta 2-adrenoceptors. *Br J Clin Pharmacol* 30 Suppl 1, 174s-177s.
- Josefsson, E., Bergquist, J., Ekman, R., and Tarkowski, A. (1996). Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology* 88(1), 140-146.
- Judd, E., and Calhoun, D.A. (2014). Apparent and true resistant hypertension: definition, prevalence and outcomes. *J Hum Hypertens* 28(8), 463-468. doi: 10.1038/jhh.2013.140.
- Kenney, M.J., and Ganta, C.K. (2014). Autonomic Nervous System and Immune System Interactions. *Comprehensive Physiology* 4(3), 1177-1200. doi: 10.1002/cphy.c130051.

- Kim, S.W., Wang, W., Kwon, T.H., Knepper, M.A., Frokiaer, J., and Nielsen, S. (2005). Increased expression of ENaC subunits and increased apical targeting of AQP2 in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(5), F957-968. doi: 10.1152/ajprenal.00413.2004.
- Kingwell, B.A., Thompson, J.M., Kaye, D.M., McPherson, G.A., Jennings, G.L., and Esler, M.D. (1994). Heart rate spectral analysis, cardiac norepinephrine spillover, and muscle sympathetic nerve activity during human sympathetic nervous activation and failure. *Circulation* 90(1), 234-240.
- Kline, R.L., and Cechetto, D.F. (1993). Renal effects of rilmenidine in anesthetized rats: importance of renal nerves. *J Pharmacol Exp Ther* 266(3), 1556-1562.
- Koepke, J.P., and DiBona, G.F. (1985). Central beta-adrenergic receptors mediate renal nerve activity during stress in conscious spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 7(3 Pt 1), 350-356.
- Koopman, F.A., Chavan, S.S., Miljko, S., Grazio, S., Sokolovic, S., Schuurman, P.R., et al. (2016). Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(29), 8284-8289. doi: 10.1073/pnas.1605635113.
- Kopin, I.J. (1985). Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev* 37(4), 333-364.
- Krishnan, E., Kwoh, C.K., Schumacher, H.R., and Kuller, L. (2007). Hyperuricemia and incidence of hypertension among men without metabolic syndrome. *Hypertension* 49(2), 298-303. doi: 10.1161/01.HYP.0000254480.64564.b6.
- Krum, H., Schlaich, M., Whitbourn, R., Sobotka, P.A., Sadowski, J., Bartus, K., et al. (2009). Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. *Lancet* 373(9671), 1275-1281. doi: 10.1016/s0140-6736(09)60566-3.
- Kumai, T., Tanaka, M., Watanabe, M., and Kobayashi, S. (1994). Elevated tyrosine hydroxylase mRNA levels in the adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 65(4), 367-369.
- Kumai, T., Tanaka, M., Watanabe, M., Nakura, H., Tateishi, T., and Kobayashi, S. (1996). Elevated tyrosine hydroxylase mRNA levels in medulla oblongata of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Mol Brain Res* 36(1), 197-199.
- La Russa, D., Brunelli, E., and Pellegrino, D. (2017). Oxidative imbalance and kidney damage in spontaneously hypertensive rats: activation of extrinsic apoptotic pathway. *Clin Sci (Lond)*. doi: 10.1042/cs20170177.
- Laubie, M., and Schmitt, H. (1977). Sites of action of clonidine: centrally mediated increase in vagal tone, centrally mediated hypotensive and sympatho-inhibitory effects. *Prog Brain Res* 47, 337-348. doi: 10.1016/s0079-6123(08)62738-7.
- Laurent, S., and Boutouyrie, P. (2015). The structural factor of hypertension: large and small artery alterations. *Circ Res* 116(6), 1007-1021. doi: 10.1161/circresaha.116.303596.

- Lee, D.L., Sturgis, L.C., Labazi, H., Osborne, J.B., Jr., Fleming, C., Pollock, J.S., et al. (2006). Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(3), H935-940. doi: 10.1152/ajpheart.00708.2005.
- Leite, F., Lima, M., Marino, F., Cosentino, M., and Ribeiro, L. (2016). Dopaminergic Receptors and Tyrosine Hydroxylase Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells: A Distinct Pattern in Central Obesity. *PLoS One* 11(1), e0147483. doi: 10.1371/journal.pone.0147483.
- Leposavic, G., Pilipovic, I., Radojevic, K., Pesic, V., Perisic, M., and Kosec, D. (2008). Catecholamines as immunomodulators: a role for adrenoceptor-mediated mechanisms in fine tuning of T-cell development. *Auton Neurosci* 144(1-2), 1-12. doi: 10.1016/j.autneu.2008.09.003.
- Lorton, D., and Bellinger, D.L. (2015). Molecular mechanisms underlying beta-adrenergic receptor-mediated cross-talk between sympathetic neurons and immune cells. *Int J Mol Sci* 16(3), 5635-5665. doi: 10.3390/ijms16035635.
- Lurbe, E., Agabiti-Rosei, E., Cruickshank, J.K., Dominiczak, A., Erdine, S., Hirth, A., et al. (2016). 2016 European Society of Hypertension guidelines for the management of high blood pressure in children and adolescents. *J Hypertens* 34(10), 1887-1920. doi: 10.1097/hjh.0000000000001039.
- Majzunova, M., Dovinova, I., Barancik, M., and Chan, J.Y. (2013). Redox signaling in pathophysiology of hypertension. *J Biomed Sci* 20, 69. doi: 10.1186/1423-0127-20-69.
- Malachias, M.V.B., Souza, W.K.S.B., Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, Neves MFT, et al. (2016). VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 107(3Supl.3), 1-83.
- Maluf-Meiken, L.C., Fernandes, F.B., Aragao, D.S., Ronchi, F.A., Andrade, M.C., Franco, M.C., et al. (2012). N-domain isoform of Angiotensin I converting enzyme as a marker of hypertension: populational study. *Int J Hypertens* 2012, 581780. doi: 10.1155/2012/581780.
- Mancia, G. (1997). Bjorn Folkow Award Lecture. The sympathetic nervous system in hypertension. *J Hypertens* 15(12 Pt 2), 1553-1565.
- Mancia, G., Bousquet, P., Elghozi, J.L., Esler, M., Grassi, G., Julius, S., et al. (2007). The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. *J Hypertens* 25(5), 909-920. doi: 10.1097/HJH.0b013e328048d004.
- Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K., Redon, J., Zanchetti, A., Bohm, M., et al. (2013). 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 31(7), 1281-1357. doi: 10.1097/01.hjh.0000431740.32696.cc.
- Mancia, G., and Grassi, G. (2014). The Autonomic Nervous System and Hypertension. *Circulation Research* 114(11), 1804-1814. doi: 10.1161/circresaha.114.302524.



- Marino, F., Cosentino, M., Bombelli, R., Ferrari, M., Lecchini, S., and Frigo, G. (1999). Endogenous catecholamine synthesis, metabolism storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp Hematol* 27(3), 489-495.
- Martin-Ventura, J.L., Duran, M.C., Blanco-Colio, L.M., Meilhac, O., Leclercq, A., Michel, J.B., et al. (2004). Identification by a differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis. *Circulation* 110(15), 2216-2219. doi: 10.1161/01.cir.0000136814.87170.b1.
- Meltzer, J.C., MacNeil, B.J., Sanders, V., Pylypas, S., Jansen, A.H., Greenberg, A.H., et al. (2004). Stress-induced suppression of in vivo splenic cytokine production in the rat by neural and hormonal mechanisms. *Brain Behav Immun* 18(3), 262-273. doi: 10.1016/j.bbi.2003.09.003.
- Middeke, M., Remien, J., Block, L.H., Kirzinger, S., Landrock, A., and Holzgreve, H. (1983). Beta 2-adrenoceptor density on membranes and on intact mononuclear cells in essential hypertension. *Res Exp Med (Berl)* 183(3), 227-232.
- Mills, K.T., Bundy, J.D., Kelly, T.N., Reed, J.E., Kearney, P.M., Reynolds, K., et al. (2016). Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. *Circulation* 134(6), 441-450. doi: 10.1161/circulationaha.115.018912.
- Moreira, M.C.d.S., Pinto, I.S.d.J., Mourão, A.A., Fajemiroye, J.O., Colombari, E., Reis, Â.A.d.S., et al. (2015). Does the sympathetic nervous system contribute to the pathophysiology of metabolic syndrome? *Frontiers in Physiology* 6, 234. doi: 10.3389/fphys.2015.00234.
- Najafi, A., Sequeira, V., Kuster, D.W., and van der Velden, J. (2016). beta-adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart. *Eur J Clin Invest* 46(4), 362-374. doi: 10.1111/eci.12598.
- Nance, D.M., and Burns, J. (1989). Innervation of the spleen in the rat: evidence for absence of afferent innervation. *Brain Behav Immun* 3(4), 281-290.
- Nance, D.M., Hopkins, D.A., and Bieger, D. (1987). Re-investigation of the innervation of the thymus gland in mice and rats. *Brain Behav Immun* 1(2), 134-147.
- Nance, D.M., and Sanders, V.M. (2007). Autonomic Innervation and Regulation of the Immune System (1987-2007). *Brain, behavior, and immunity* 21(6), 736-745. doi: 10.1016/j.bbi.2007.03.008.
- Narumi, H., Takano, H., Shindo, S., Fujita, M., Mizuma, H., Kuwabara, Y., et al. (2011). Effects of valsartan and amlodipine on cardiorenal protection in Japanese hypertensive patients: the Valsartan Amlodipine Randomized Trial. *Hypertens Res* 34(1), 62-69. doi: 10.1038/hr.2010.186.
- Nascimento, A.R., Lessa, M.A., Sabino, B., Bousquet, P., and Tibirica, E. (2010). Microvascular effects of centrally acting antihypertensive drugs in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 55(3), 240-247. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181ce9810.

- Nascimento, A.R., Machado, M.V., Gomes, F., Vieira, A.B., Goncalves-de-Albuquerque, C.F., Lessa, M.A., et al. (2016). Central Sympathetic Modulation Reverses Microvascular Alterations in a Rat Model of High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. *Microcirculation* 23(4), 320-329. doi: 10.1111/micc.12280.
- Neukirchen, M., and Kienbaum, P. (2008). Sympathetic nervous system: evaluation and importance for clinical general anesthesia. *Anesthesiology* 109(6), 1113-1131. doi: 10.1097/ALN.0b013e31818e435c.
- Nguyen, H., Chiasson, V.L., Chatterjee, P., Kopriva, S.E., Young, K.J., and Mitchell, B.M. (2013). Interleukin-17 causes Rho-kinase-mediated endothelial dysfunction and hypertension. *Cardiovasc Res* 97(4), 696-704. doi: 10.1093/cvr/cvs422.
- Nguyen, V., Tiemann, D., Park, E., and Salehi, A. (2017). Alpha-2 Agonists. *Anesthesiology Clinics* 35(2), 233-245. doi: 10.1016/j.anclin.2017.01.009.
- Nielsen, S.J., Jeppesen, J., Torp-Pedersen, C., Hansen, T.W., Linneberg, A., and Fenger, M. (2010). Tyrosine Hydroxylase Polymorphism (C-824T) and Hypertension: A Population-Based Study. *American Journal of Hypertension* 23(12), 1306-1311. doi: 10.1038/ajh.2010.165.
- Nijjima, A. (1996). The afferent discharges from sensors for interleukin 1 beta in the hepatoportal system in the anesthetized rat. *J Auton Nerv Syst* 61(3), 287-291.
- Nik Yusoff, N.S., Mustapha, Z., Govindasamy, C., and Sirajudeen, K.N.S. (2013). Effect of Clonidine (an Antihypertensive Drug) Treatment on Oxidative Stress Markers in the Heart of Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, 927214. doi: 10.1155/2013/927214.
- Nikolic, K., and Agbaba, D. (2012). Imidazoline antihypertensive drugs: selective i(1) - imidazoline receptors activation. *Cardiovasc Ther* 30(4), 209-216. doi: 10.1111/j.1755-5922.2011.00269.x.
- O'Callaghan, E.L., Choong, Y.-T., Jancovski, N., and Allen, A.M. (2013). Central angiotensinergic mechanisms associated with hypertension. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 175(1), 85-92. doi: 10.1016/j.autneu.2013.01.010.
- Panina-Bordignon, P., Mazzeo, D., Lucia, P.D., D'Ambrosio, D., Lang, R., Fabbri, L., et al. (1997). Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *Journal of Clinical Investigation* 100(6), 1513-1519.
- Pavlov, V.A., and Tracey, K.J. (2017). Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. *Nat Neurosci* 20(2), 156-166. doi: 10.1038/nn.4477.
- Purves, D., Augustine, G.J., and Fitzpatrick, D., et al. (2001). *Neuroscience*. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Raap, U., Schmid-Ott, G., Bruder, M., Wichmann, K., Kapp, A., and Werfel, T. (2008). The functional activity of basophil granulocytes is modulated by acute mental stress and sympathetic activation in vivo and in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 122(6), 1227-1229. doi: 10.1016/j.jaci.2008.07.031.

- Ramer-Quinn, D.S., Baker, R.A., and Sanders, V.M. (1997). Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. *J Immunol* 159(10), 4857-4867.
- Rao, F., Zhang, L., Wessel, J., Zhang, K., Wen, G., Kennedy, B.P., et al. (2007). Tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme in catecholamine biosynthesis: discovery of common human genetic variants governing transcription, autonomic activity, and blood pressure in vivo. *Circulation* 116(9), 993-1006. doi: 10.1161/circulationaha.106.682302.
- Raven, P.B., and Chapleau, M.W. (2014). Blood Pressure Regulation XI: Overview and Future Research Directions. *European journal of applied physiology* 114(3), 579-586. doi: 10.1007/s00421-014-2823-z.
- Redwine, L.S., Hong, S., Rutledge, T., Wentworth, B., Pung, M., Ziegler, M.G., et al. (2014). Leukocyte beta-adrenergic receptor sensitivity and depression severity in patients with heart failure. *Psychosomatic medicine* 76(9), 726-731. doi: 10.1097/PSY.0000000000000119.
- Reja, V., Goodchild, A.K., Phillips, J.K., and Pilowsky, P.M. (2002). Tyrosine hydroxylase gene expression in ventrolateral medulla oblongata of WKY and SHR: a quantitative real-time polymerase chain reaction study. *Auton Neurosci* 98(1-2), 79-84.
- Rokutan, K., Morita, K., Masuda, K., Tominaga, K., Shikishima, M., Teshima-Kondo, S., et al. (2005). Gene expression profiling in peripheral blood leukocytes as a new approach for assessment of human stress response. *J Med Invest* 52(3-4), 137-144.
- Sano, Y., Watt, G., and Townley, R.G. (1983). Decreased mononuclear cell beta-adrenergic receptors in bronchial asthma: parallel studies of lymphocyte and granulocyte desensitization. *J Allergy Clin Immunol* 72(5 Pt 1), 495-503.
- Scanzano, A., and Cosentino, M. (2015). Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Front Pharmacol* 6, 171. doi: 10.3389/fphar.2015.00171.
- Scheffers, I.J., Kroon, A.A., Schmidli, J., Jordan, J., Tordoir, J.J., Mohaupt, M.G., et al. (2010). Novel baroreflex activation therapy in resistant hypertension: results of a European multi-center feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 56(15), 1254-1258. doi: 10.1016/j.jacc.2010.03.089.
- Schlaich, M.P., Lambert, E., Kaye, D.M., Krozowski, Z., Campbell, D.J., Lambert, G., et al. (2004). Sympathetic Augmentation in Hypertension. *Role of Nerve Firing, Norepinephrine Reuptake, and Angiotensin Neuromodulation* 43(2), 169-175. doi: 10.1161/01.hyp.0000103160.35395.9e.
- Schlaich, M.P., Schmieder, R.E., Bakris, G., Blankestijn, P.J., Bohm, M., Campese, V.M., et al. (2013). International expert consensus statement: Percutaneous transluminal renal denervation for the treatment of resistant hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62(22), 2031-2045. doi: 10.1016/j.jacc.2013.08.1616.

- Schlaich, M.P., Sobotka, P.A., Krum, H., Lambert, E., and Esler, M.D. (2009). Renal sympathetic-nerve ablation for uncontrolled hypertension. *N Engl J Med* 361(9), 932-934. doi: 10.1056/NEJMc0904179.
- Sesso, H.D., Buring, J.E., Rifai, N., Blake, G.J., Gaziano, J.M., and Ridker, P.M. (2003). C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *Jama* 290(22), 2945-2951. doi: 10.1001/jama.290.22.2945.
- Shi, Z., Gan, X.B., Fan, Z.D., Zhang, F., Zhou, Y.B., Gao, X.Y., et al. (2011). Inflammatory cytokines in paraventricular nucleus modulate sympathetic activity and cardiac sympathetic afferent reflex in rats. *Acta Physiol (Oxf)* 203(2), 289-297. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02313.x.
- Silva, M.P., Candido Araújo, A.K., Azevêdo Dantas, D.N., Carvalho de Oliveira, D.R., Rosendo da Silva, R.A., Nascimento Kluczynik, C.E., et al. (2016). Hospitalizations and Hospital Cost from Cardiovascular Diseases in Brazil. *International Archives of Medicine* 9. doi: 10.3823/2009.
- Singh, M., Mensah, G.A., and Bakris, G. (2010). Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiol Clin* 28(4), 545-559. doi: 10.1016/j.ccl.2010.07.001.
- Starke, K., Gothert, M., and Kilbinger, H. (1989). Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev* 69(3), 864-989.
- Swanson, M.A., Lee, W.T., and Sanders, V.M. (2001). IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine. *J Immunol* 166(1), 232-240.
- Szentmiklosi, A.J., Szentandrassy, N., Hegyi, B., Horvath, B., Magyar, J., Banyasz, T., et al. (2015). Chemistry, physiology, and pharmacology of beta-adrenergic mechanisms in the heart. Why are beta-blocker antiarrhythmics superior? *Curr Pharm Des* 21(8), 1030-1041.
- Tekin, I., Roskoski, R., Jr., Carkaci-Salli, N., and Vrana, K.E. (2014). Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. *J Neural Transm (Vienna)* 121(12), 1451-1481. doi: 10.1007/s00702-014-1238-7.
- Tibiriciá, E., and Lessa, M.A. (2005). Medicamentos anti-hipertensivos que atuam no sistema nervoso central. *075 Measuring blood pressure: the importance of understanding variation* 12(2), 93-96.
- Torres, G.E., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2003). Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci* 4(1), 13-25. doi: 10.1038/nrn1008.
- Trotter, R.N., Stornetta, R.L., Guyenet, P.G., and Roberts, M.R. (2007). Transneuronal mapping of the CNS network controlling sympathetic outflow to the rat thymus. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 131(1-2), 9-20. doi: 10.1016/j.autneu.2006.06.001.

- Van Zwieten, P.A., and Peters, S.L. (1999). Central I1-imidazoline receptors as targets of centrally acting antihypertensive drugs. Clinical pharmacology of moxonidine and rilmenidine. *Ann N Y Acad Sci* 881, 420-429.
- Veglio, F., Tayebati, S.K., Schiavone, D., Ricci, A., Mulatero, P., Bronzetti, E., et al. (2001). Alpha1-adrenergic receptor subtypes in peripheral blood lymphocytes of essential hypertensives. *J Hypertens* 19(10), 1847-1854.
- Wallin, B.G., Esler, M., Dorward, P., Eisenhofer, G., Ferrier, C., Westerman, R., et al. (1992). Simultaneous measurements of cardiac noradrenaline spillover and sympathetic outflow to skeletal muscle in humans. *J Physiol* 453, 45-58.
- Wang, T.J., Evans, J.C., Meigs, J.B., Rifai, N., Fox, C.S., D'Agostino, R.B., et al. (2005). Low-grade albuminuria and the risks of hypertension and blood pressure progression. *Circulation* 111(11), 1370-1376. doi: 10.1161/01.cir.0000158434.69180.2d.
- Wang, T.J., Gona, P., Larson, M.G., Levy, D., Benjamin, E.J., Tofler, G.H., et al. (2007). Multiple biomarkers and the risk of incident hypertension. *Hypertension* 49(3), 432-438. doi: 10.1161/01.HYP.0000256956.61872.aa.
- Wang, Y., Chen, S., Yao, T., Li, D., Wang, Y., Li, Y., et al. (2014). Homocysteine as a Risk Factor for Hypertension: A 2-Year Follow-Up Study. *PLOS ONE* 9(10), e108223. doi: 10.1371/journal.pone.0108223.
- Ward-Routledge, C., Marshall, P., and Marsden, C.A. (1988). Involvement of central alpha- and beta-adrenoceptors in the pressor response to electrical stimulation of the rostral ventrolateral medulla in rats. *Br J Pharmacol* 94(2), 609-619.
- Weber, M.A., Schiffrin, E.L., White, W.B., Mann, S., Lindholm, L.H., Kenerson, J.G., et al. (2014). Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 16(1), 14-26. doi: 10.1111/jch.12237.
- Wei, S.-G., Zhang, Z.-H., Beltz, T.G., Yu, Y., Johnson, A.K., and Felder, R.B. (2013). Subfornical Organ Mediates Sympathetic and Hemodynamic Responses to Blood-borne Pro-Inflammatory Cytokines. *Hypertension* 62(1), 118-125. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01404.
- Weir, E.G., and Borowitz, M.J. (2001). Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Semin Hematol* 38(2), 124-138.
- Wenzel, P., Knorr, M., Kossmann, S., Stratmann, J., Hausding, M., Schuhmacher, S., et al. (2011). Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *Circulation* 124(12), 1370-1381. doi: 10.1161/circulationaha.111.034470.
- WHO, W.H.O. (2017). *Cardiovascular diseases (CVDs) Fact sheet* [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> [Accessed].

- Xu, F., Gainetdinov, R.R., Wetsel, W.C., Jones, S.R., Bohn, L.M., Miller, G.W., et al. (2000). Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat Neurosci* 3(5), 465-471. doi: 10.1038/74839.
- Zhou, J. (2004). Norepinephrine transporter inhibitors and their therapeutic potential. *Drugs Future* 29(12), 1235-1244.
- Zoukos, Y., Thomaidis, T., Pavitt, D.V., Leonard, J.P., Cuzner, M.L., and Mathias, C.J. (1992). Up-regulation of  $\beta$ -adrenoceptors on circulating mononuclear cells after reduction of central sympathetic outflow by clonidine in normal subjects. *Clinical Autonomic Research* 2(3), 165-170. doi: 10.1007/BF01818957.

## 8. ANEXOS

A seguir, serão listados os trabalhos finalizados referentes ao mestrado sobre doença de Chagas em modelo *in vitro* e *in vivo* e o manuscrito da tese desenvolvidos no período entre 2013 e 2017.

### 8.1 ARTIGO PUBLICADO

**Nisimura LM**, Estato V, de Souza EM, Reis PA, Lessa MA, Castro-Faria-Neto HC, Pereira MC, Tibiriçá E, Garzoni LR. Acute Chagas disease induces cerebral microvasculopathy in mice. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Jul 10;8(7):e2998. doi: 10.1371/journal.pntd.0002998. eCollection 2014 Jul. Erratum in: PLoS Negl Trop Dis. 2014 Aug;8(8):e3151.



# Acute Chagas Disease Induces Cerebral Microvasculopathy in Mice

Lindice Mitie Nisimura<sup>1</sup>, Vanessa Estado<sup>1</sup>, Elen Mello de Souza<sup>2</sup>, Patricia A. Reis<sup>3</sup>, Marcos Adriano Lessa<sup>1</sup>, Hugo Caire Castro-Faria-Neto<sup>3</sup>, Mirian Claudia de Souza Pereira<sup>4</sup>, Eduardo Tibiriçá<sup>1†</sup>, Luciana Ribeiro Garzoni<sup>1†\*</sup>

**1** Laboratório de Investigação Cardiovascular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Laboratório de Ultra-estrutura Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

## Abstract

Cardiomyopathy is the main clinical form of Chagas disease (CD); however, cerebral manifestations, such as meningoencephalitis, ischemic stroke and cognitive impairment, can also occur. The aim of the present study was to investigate functional microvascular alterations and oxidative stress in the brain of mice in acute CD. Acute CD was induced in Swiss Webster mice (SWM) with the Y strain of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Cerebral functional capillary density (the number of spontaneously perfused capillaries), leukocyte rolling and adhesion and the microvascular endothelial-dependent response were analyzed over a period of fifteen days using intravital video-microscopy. We also evaluated cerebral oxidative stress with the thiobarbituric acid reactive species TBARS method. Compared with the non-infected group, acute CD significantly induced cerebral functional microvascular alterations, including (i) functional capillary rarefaction, (ii) increased leukocyte rolling and adhesion, (iii) the formation of microvascular platelet-leukocyte aggregates, and (iv) alteration of the endothelial response to acetylcholine. Moreover, cerebral oxidative stress increased in infected animals. We concluded that acute CD in mice induced cerebral microvasculopathy, characterized by a reduced incidence of perfused capillaries, a high number of microvascular platelet-leukocyte aggregates, a marked increase in leukocyte-endothelium interactions and brain arteriolar endothelial dysfunction associated with oxidative stress. These results suggest the involvement of cerebral microcirculation alterations in the neurological manifestations of CD.

**Citation:** Nisimura LM, Estado V, de Souza EM, Reis PA, Lessa MA, et al. (2014) Acute Chagas Disease Induces Cerebral Microvasculopathy in Mice. *PLoS Negl Trop Dis* 8(7): e2998. doi:10.1371/journal.pntd.0002998

**Editor:** Herbert B. Tanowitz, Albert Einstein College of Medicine, United States of America

**Received:** February 8, 2014; **Accepted:** May 30, 2014; **Published:** July 10, 2014

**Copyright:** © 2014 Nisimura et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* Email: largarz@ioc.fiocruz.br, largarz@gmail.com

† These authors are joint senior authors on this work.

## Introduction

Chagas disease (CD), which is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), is endemic in Latin America and affects approximately 10 million people worldwide [1]. Cardiomyopathy is the main clinical manifestation of CD, but digestive and neurological forms can also occur [2]. Meningoencephalitis is an important manifestation of acute CD in children under 2 years of age [3], and it is also frequently observed in immunosuppressed patients suffering from acute CD reactivation [4]. Ischemic stroke is the main neurological manifestation observed in chronic CD [5], and cognitive impairment and depression can also occur [6,7]. Moreover, experimental studies in mice have shown that depressive-like behavior is independent of central nervous system inflammation but is associated with high levels of systemic tumor necrosis factor (TNF) [8].

Acute CD has re-emerged in oral transmission outbreaks in countries where vector transmission has been controlled [9]. During acute CD, the peripheral inflammatory response is characterized by the presence of macrophages [10], NK cells [11] and intense lymphocyte polyclonal activation [12]. This

response is followed by the systemic synthesis of pro-inflammatory cytokines [13], nitric oxide (NO) [14] and reactive oxygen species [15]. Microvascular alterations have been implicated in the pathogenesis of Chagas cardiomyopathy and include vascular constrictions, microaneurysms, dilatations and platelet aggregation, resulting in the formation of transient occlusive thrombi. These alterations contribute to myocytolytic necrosis followed by inflammatory infiltration and interstitial fibrosis. Moreover, vasoactive substances, including endothelin-1 and thromboxane, are involved in the modulation of vascular responses during *T. cruzi* infection, contributing to platelet aggregation, microvascular spasms and endothelial dysfunction [16].

Using intravital video-microscopy (IM), our research group recently demonstrated that cerebral functional microvascular alterations are pathophysiologically relevant in models of systemic severe infectious syndromes, such as sepsis and malaria, in mice [17,18]. Moreover, IM has been used as an important tool with which to evaluate the microcirculation during *T. cruzi* infection, e.g., using the hamster cheek pouch and cremaster muscle models [19–21].



## 8.2 ARTIGOS SUBMETIDOS

**Nisimura LM**, de Souza EM, Gonzaga BM, Coelho LL, Ferrão PM, Waghbi MC, Ferreira RR, Pereira MC, Mendonça-Lima L, Tibiriçá E, Moreira OC, Lannes-Vieira J, Garzoni LR. Increased angiogenesis parallels cardiac tissue remodeling in experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection. Immunobiology.

Ferrão, PM, **Nisimura, LM**, Moreira, OC, Pereira, MC, Mendonça-Lima, L, Araujo-Jorge, TC, Feige, JJ, Bailly, S, Waghbi, MC and Garzoni, LR. Three-dimensional cardiac cell culture: an in vitro model to study pharmacological targets against fibrosis triggered by *T. cruzi* infection. Experimental Cell Research.

### 8.3 MANUSCRITOS FINALIZADOS

#### **Tyrosine hydroxylase and $\beta_2$ -adrenergic receptor expression in spontaneously hypertensive rat leukocytes**

Lindice Mitie Nisimura<sup>1,2</sup>, Pascal Bousquet<sup>3</sup>; Eduardo Tibiriçá<sup>2</sup> and Luciana Ribeiro Garzoni<sup>1</sup>

Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos<sup>1</sup> - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Laboratório de Investigação Cardiovascular<sup>2</sup> - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Laboratory of Neurobiology and Cardiovascular Pharmacology<sup>3</sup>, Faculty of Medicine, Louis Pasteur University, Strasbourg, France.

#### **Effect of Posaconazole on Trypanosoma cruzi infected cardiomyocytes and cardiac microtissues: trypanocidal and antifibrotic activities**

Lindice Mitie Nisimura<sup>1,2</sup>; Patrícia Mello Ferrão<sup>1,3</sup>; Alanderson da Rocha Nogueira<sup>4</sup>; Mariana Calda Waghabi<sup>3</sup>, Marcelo Meuser-Batista<sup>1</sup>; Otacílio da Cruz Moreira<sup>5</sup>; Julio A. Urbina<sup>6</sup>; Luciana Ribeiro Garzoni<sup>1</sup>.

Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos<sup>1</sup>, Laboratório de Investigação Cardiovascular<sup>2</sup>; Laboratório de Genômica funcional e Bioinformática<sup>3</sup>, Laboratório de Ultra-estrutura Celular<sup>4</sup>, Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas<sup>5</sup> - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas - Caracas, Venezuela<sup>6</sup>.

#### **Bevacizumab, a Vascular Growth Factor Inhibitor, improves cardiac dysfunction and fibrosis in Chagas Disease**

Lindice Mitie Nisimura<sup>1</sup>, Laura Lacerda Coelho<sup>1</sup>, Gabriel Mello de Oliveira<sup>2</sup>, Beatriz Matheus Gonzaga<sup>1</sup>, Marcelo Meuser Baptista<sup>1</sup>, Joseli Lannes-Vieira<sup>3</sup>, Tania Araújo-Jorge<sup>1</sup> and Luciana Ribeiro Garzoni<sup>1\*</sup>

Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos<sup>1</sup>, Laboratório de Biologia Celular<sup>2</sup>, Laboratório de Biologia das Interações<sup>3</sup>- Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil