

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Fernanda Costa da Cruz de Pontes

*Investigação de marcadores periféricos alternativos da
hiperatividade simpática central em modelo experimental de
hipertensão arterial.*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriçá

RIO DE JANEIRO

2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P814

Pontes, Fernanda Costa da Cruz de.

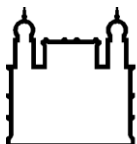
Investigação de marcadores periféricos alternativos da hiperatividade simpática central em modelo experimental de hipertensão arterial / Fernanda Costa da Cruz Pontes. – Rio de Janeiro, 2012.
iv, 48 f. il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012.

Bibliografia: f. 44-48

1.Hipertensão arterial. 2. Hiperatividade simpática. 3.Catecolaminas.
I.Título.

CDD 616.132



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Fernanda Costa da Cruz de Pontes

Investigação de marcadores periféricos alternativos da hiperatividade simpática central em modelo experimental de hipertensão arterial.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriçá

Aprovada em: 15/02/2012

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Clarissa M. Maya-Monteiro

Profa. Dra. Vanessa Estado

Prof. Dr. Antônio Felipe Sanjuliani

Profa. Dra. Isis Hara Trevenzolli

Profa. Dra. Isabela Bonomo

Rio de Janeiro, de de 20

AGRADECIMENTOS

É impossível agradecer nominalmente a todos que contribuíram para a realização desta dissertação. Não porque eu não saiba os nomes de meus familiares ou de meus colegas de trabalho, mas porque não só eles merecem ser lembrados. Cada professor que me ensinou a ler, a pensar, que me criticou... cada colega que me trouxe palavras de incentivo, que me desvirtuou dos estudos ou que assinou para mim a presença em um dia que eu não me sentia bem... cada auxiliar que lavou minhas pipetas ou retirou o lixo do meu laboratório. Todos estes têm parte com este trabalho e merecem ser lembrados e agradecidos. É óbvio que somente alguns destes possuem um lugar especial em meu coração e dividirão comigo os louros da vitória, mas não é por isso que me esquecerei da infantaria que lutou a guerra. Então é a todos eles que agradeço de forma sincera pela contribuição, e relembro as palavras de Virgínia Woolf: "Obras-primas não são fruto de um nascimento solitário. Elas são a consequência de vários anos de pensamento em comum, de tal modo que a experiência da massa está por trás de uma única voz".

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
1. Introdução	1
1.1. Hipertensão Arterial Sistêmica	1
1.2. Estratégias terapêuticas na HAS	2
1.3. Controle da Pressão Arterial	3
1.3.1 Quimiorreceptores.....	3
1.3.2. Barorreceptores	4
1.3.3. Atividade Simpática no Controle da Pressão.....	4
1.4. A Via de Síntese das Catecolaminas	6
1.5. A Atividade Simpática na Hipertensão Arterial.....	8
1.6. Medidas da Atividade Simpática em Clínica Médica	9
1.6.1. Medidas de Catecolaminas Circulantes	10
1.6.2. <i>Spillover</i> de Noradrenalina.....	10
1.6.3. Análise Espectral da Frequência Cardíaca	10
1.6.4. Microneurografia	11
1.7. Drogas anti-hipertensivas de ação central	11
1.8. A integração entre o SNS e o Sistema Imune	12
2. Objetivos	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos:	16
3. Metodologia	16
3.1. Modelos Experimentais	17
3.2 .Medidas Hemodinâmicas.....	17
3.3. Leucometria	18
3.4. Experimento Terminal.....	18
3.5. Obtenção de Plasma	18
3.6. Dosagem de Catecolaminas.....	19
3.7. Isolamento dos Leucócitos	19
3.8. Processamento das Amostras	19
3.9. Dosagem de Proteínas	20
3.10. SDS-PAGE.....	20
3.11. Análise Estatística	21

4. Resultados	22
4.1. Pressão Arterial	22
4.2. Leucometria	23
4.3. Catecolaminas Plasmáticas	23
4.4. Expressão da Tirosina Hidroxilase (TH)	26
4.5. Correlações	32
5. Discussão	35
6. Conclusão	43
7. Referências	44

RESUMO

Atualmente, a hipertensão arterial constitui uma doença cardiovascular de altíssima prevalência. A hiperatividade do sistema nervoso simpático é considerada como uma importante característica fisiopatológica da hipertensão arterial. Portanto, sua modulação farmacológica pode ser considerada como um alvo terapêutico estratégico. No entanto, a avaliação da atividade simpática sistêmica em pacientes é ainda bastante controversa. O objetivo principal do presente estudo foi avaliar a existência de uma possível relação entre a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) em leucócitos periféricos e a concentração plasmática de catecolaminas. Os experimentos foram realizados em ratos Wistar Kyoto (WKY-VEI) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Os animais foram tratados por gavagem com losartan (SHR-LOS, 10 mg/kg/dia), clonidina (SHR-CLO, 0,1 mg/kg/dia) ou veículo (SHR-VEI) durante 28 dias. A pressão arterial sistólica (PAS) e a leucometria foram avaliadas antes e após o tratamento. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e foi feita a coleta de sangue, bulbo raquidiano e glândulas supra-renais para análises posteriores. A expressão da TH foi avaliada através da técnica de *western blotting*. A PAS estava elevada nos ratos SHR-VEI antes e após o tratamento com veículo, em comparação com o grupo WKY-VEI. Já nos grupos SHR-LOS e SHR-CLO, o tratamento farmacológico foi capaz de reduzir a PAS para níveis semelhantes àqueles encontrados em animais normotensos. Não foram observadas diferenças significativas na leucometria entre os diferentes grupos experimentais. As concentrações de adrenalina plasmática estavam aumentadas no grupo SHR-VEI, mas não foram reduzidas de maneira significativa por nenhum dos tratamentos farmacológicos. Já a noradrenalina, também elevada no grupo SHR-VEI, foi marcadamente reduzida pelos tratamentos utilizados. A expressão da TH se encontrava elevada nos animais do grupo SHR-VEI em todos os tecidos estudados, tendo sido também reduzida significativamente após o tratamento SHR-CLO em todos os tecidos. No grupo SHR-LOS não houve redução significativa da expressão de TH em nenhum tecido. Nossos achados sugerem que os leucócitos periféricos são diretamente influenciados pela hiperatividade simpática sistêmica presente neste modelo experimental. Tais resultados podem abrir novos caminhos para o desenvolvimento de um novo método de análise da hiperatividade simpática em pacientes, o que seria de grande valia não só para o tratamento da hipertensão arterial como também para outras condições patológicas que apresentam esta hiperatividade como característica.

ABSTRACT

Currently, hypertension is a cardiovascular disease with high prevalence. The hyperactivity of the sympathetic system is shown to be present and important for the development of this disease and its modulation become a therapeutic target, although there are no clinic accurate measures of sympathetic activity. The aim of this study was to evaluate the possible relationship between the expression of the tyrosine hydroxylase enzyme from peripheral leukocytes and plasma catecholamine's concentration. We conduct experiments in Wistar Kyoto (WKY-VEI) and spontaneously hypertensive rats (SHR). The animals were treated by gavage with losartan (SHR-LOS), clonidine (CLO-SHR) or vehicle (SHR-VEI) for 28 days. Systolic blood pressure (SBP) and white blood cell count was conducted before and after the treatment. At the end of treatment period, animals' blood was collected and plasma was separated for the measurement of catecholamines, ~~and~~ peripheral leukocytes were separated to analyze the expression of the key enzyme in the metabolism of catecholamines (tyrosine hydroxylase - TH) by Western blotting. The animals were sacrificed and were collected for the same analysis the medulla oblongata and the adrenal gland. SBP was higher in SHR-VEI before and after treatment compared with the WKY-VEI. In groups SHR-LOS and SHR-CLO pharmacological treatment was able to reduce SBP. In leukocytes counting there was no statistical difference in either group before or after the treatment. The plasma adrenaline was increased in SHR-VEI and there was no significantly reduce in the other groups. Norepinephrine, also elevated in SHR-VEI, was markedly reduced by the treatments. The expression of TH was higher in SHR-VEI in all tissues studied and was also significantly reduced after treatment in SHR-CLO in leukocytes, medulla and adrenal gland. There was no reduction of TH expression in SHR-LOS. Based in our findings, we can conclude that the expression of TH in leukocytes is directly influenced by systemic sympathetic hyperactivity present in this experimental model of hypertension. These results may open the door to the development of a new method of analysis of sympathetic hyperactivity in human, which would be of great value not only for the treatment of hypertension as well as other pathological conditions that have this hyperactivity characterized.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pressões arteriais sistólicas dos animais experimentais. Barras abertas representam o basal, barras fechadas após o tratamento de 28 dias.	22
Figura 2. Contagem de leucócitos periféricos dos animais experimentais. Barras abertas representam o basal, barras fechadas após o tratamento de 28 dias.	23
Figura 3. Concentração das catecolaminas plasmáticas – (a) adrenalina dos animais WKY e SHR e (b) adrenalina nos animais SHR e tratados com CLO e LOS - em sangue periférico dos animais experimentais.	24
Figura 4. Concentração das catecolaminas plasmáticas – (a) noradrenalina dos animais WKY e SHR e (b) noradrenalina nos animais SHR e tratados com CLO e LOS - em sangue periférico dos animais experimentais.	25
Figura 5. Expressão da TH em bulbos isolados dos animais experimentais: (a) relação TH/Actina dos animais WKY e SHR (b) relação TH/Actina dos animais após o tratamento com os fármacos ou veículos.	27
Figura 6. Expressão da TH em glândulas supra-renais isoladas dos animais experimentais: (a) relação TH/Actina dos animais WKY e SHR (b) relação TH/Actina dos animais após o tratamento com os fármacos ou veículos..	29
Figura 7. Expressão da TH em leucócitos periféricos isolados dos animais experimentais: (a) relação TH/Actina dos animais WKY e SHR (b) relação TH/Actina dos animais após o tratamento com os fármacos ou veículos..	31
Figura 8. Correlação entre a expressão da TH nas supra-renais e nos bulbos dos animais experimentais.	32
Figura 9. Correlação entre a expressão da TH nas supra-renais e nos leucócitos periféricos dos animais experimentais.	33
Figura 10. Correlação entre a expressão da TH nos bulbos isolados e nos leucócitos periféricos dos animais experimentais.	33
Figura 11. Correlação entre a adrenalina plasmática e a expressão da TH nos leucócitos periféricos dos animais experimentais.....	34
Figura 12. Correlação entre a noradrenalina plasmática e a expressão da TH nos leucócitos periféricos dos animais experimentais.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

SNS – Sistema Nervoso Simpático

SNP – Sistema Nervoso Parassimpático

NTS – Núcleo do Trato Solitário

PA – Pressão Arterial

MAO – Monoamina Oxidase

COMT – Catecol Metil-O-Transferase

TH – Tirosina Hidroxilase

DBH – Dopamina β -hidroxilase

CT – Catecolamina

NE – Noradrenalina

D – Dopamina

SHR – Ratos Espontaneamente Hipertensos

WKY – Ratos Wistar Kyoto

EPM – Erro Padrão da Média

CLO – Clonidina

LOS – Losartan

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico

1. INTRODUÇÃO

1.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é definida como o aumento crônico da pressão arterial em níveis maiores que 140/90mmHg¹. Há uma relação direta entre a pressão arterial e o risco de doenças cardiovasculares², e, mesmo a partir de medidas maiores que 115/75mmHg, a mortalidade por doenças cardiovasculares conseqüentes aumenta contínua e linearmente^{1,3}. Apesar dos constantes alertas, sua prevalência alcança níveis cada vez maiores em todo o mundo. Em 2003, a prevalência desta doença já alcançava 30% da população nas principais capitais brasileiras⁴, sendo gastos milhões de reais todo ano com o tratamento e a distribuição de medicamentos para hipertensos. Doença silenciosa, a hipertensão arterial não possui sintomas ou sinais claros em seus estágios iniciais, sendo diagnosticada muitas vezes somente após o surgimento de complicações relacionadas. Tais complicações incluem além de aterosclerose, insuficiência renal e acidentes vasculares cerebrais, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca, esta última causa líder de morte no Brasil e no mundo já há vários anos^{1,5}. Sua freqüência ainda aumenta com a idade, sendo 75% dos maiores de 70 anos hipertensos^{1,5}. No entanto, ao contrário do que esta observação induz, a HAS não é uma doença da terceira idade, sendo detectada mesmo em jovens⁶. Entre os fatores de risco para seu desenvolvimento destacam-se o excesso de peso e a obesidade, o sedentarismo, álcool, fumo e o consumo excessivo de sal¹, todos estes males inerentes à vida moderna, contribuindo para as taxas cada vez maiores de hipertensos ao redor do mundo.

Contraditoriamente à sua demonstrada importância, a HAS ainda não é uma doença plenamente compreendida, sendo fato que uma parcela significativa da população hipertensa não é idealmente controlada^{7,8}. Os fatores envolvidos em sua gênese, desenvolvimento e manutenção são diversos, com o envolvimento de vários órgãos e sistemas em ordem cronológica não definida. Torna-se então um grande desafio para os

clínicos a elucidação das causas e o tratamento de um paciente hipertenso.

1.2. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NA HAS

Estando a hipertensão arterial tão profundamente arraigada na sociedade contemporânea, seu tratamento deveria ser protocolado, de fácil aplicação e de alta eficiência. Entretanto, o que vemos na prática é um onde grande parte dos hipertensos não é bem assistida e não tem a doença sob controle⁹. Segundo as diretrizes brasileiras de hipertensão¹ o tratamento do hipertenso deve ser adequado ao seu risco potencial, levando-se em conta seu grau de hipertensão, a existência de doenças associadas e os fatores de risco cardiovascular conhecidos. Este tratamento deve sempre incluir um componente de mudança comportamental, que inclui modificação de hábitos alimentares, estímulo à prática de exercícios e perda de peso. O tratamento não medicamentoso isolado deve ser a primeira escolha para hipertensos limítrofes (até 139/89mmHg) e de baixo risco, e em parceria com o tratamento medicamentoso nos demais casos. De fato, uma mudança positiva de cinco hábitos combinados – alto consumo de sal, alta ingestão sódio/potássio, consumo de álcool, dieta desequilibrada e vida sedentária – é listada como a melhor forma de melhorar a epidemia hipertensiva em curso¹⁰. Quando o paciente alcança um maior risco, a terapia medicamentosa deve ser associada a estas mudanças de comportamento. Atualmente no mercado brasileiro encontram-se disponíveis sete classes de anti-hipertensivos: diuréticos, inibidores adrenérgicos (centrais e periféricos), vasodilatadores diretos, bloqueadores de canal de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II e mais recentemente inibidores diretos de renina. Estão ainda disponíveis associações entre as diferentes classes que objetivam amplificar as melhorias. Não é propósito deste trabalho comparar e avaliar os prós e contras de cada uma destas terapias, frise-se

apenas que o elevado número de hipertensos, nas mais diversas situações, cruza-se com as numerosas opções terapêuticas para criar um quadro complexo de decisão para a comunidade médica e multidisciplinar envolvida no tratamento desta doença. Melhorias no escopo do diagnóstico, baseando-o não somente na medida da pressão arterial sistêmica, mas em outros desbalanços metabólicos nitidamente envolvidos e definições mais particulares dos quadros hipertensivos seriam de grande valia na escolha do tratamento ideal para cada paciente.

1.3. CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL

Para melhor compreender a doença, é necessário primeiro entender o funcionamento do sistema na condição saudável. Sabe-se que a pressão arterial é o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica. Tais componentes são centralmente regulados através de um equilíbrio na atividade do sistema nervoso simpático (SNS) e do sistema nervoso parassimpático (SNP). Estes, regulam-se através de informações recolhidas em barorreceptores e quimiorreceptores.

1.3.1 QUIMIORRECEPTORES

Os quimiorreceptores são localizados em bifurcações na artéria carótida e na aorta, sendo irrigados por uma rede capilar abundante. São extremamente especializados, sensíveis às pressões de oxigênio e carbono, além do pH sanguíneo. Sua função é relacionada principalmente à manutenção de estados ventilatórios e cardiovasculares ideais, sendo capazes de promover reflexamente vasoconstrição e hipertensão arterial, provavelmente por ativação simpática^{11,12}. Os principais mecanismos que levariam à hipertividade simpática através dos quimiorreceptores seriam guiados pela hipóxia tissular e/ou carotídea, associado a uma disfuncionalidade dos barorreceptores, que sabidamente exercem papel mais importante nesta regulação¹³.

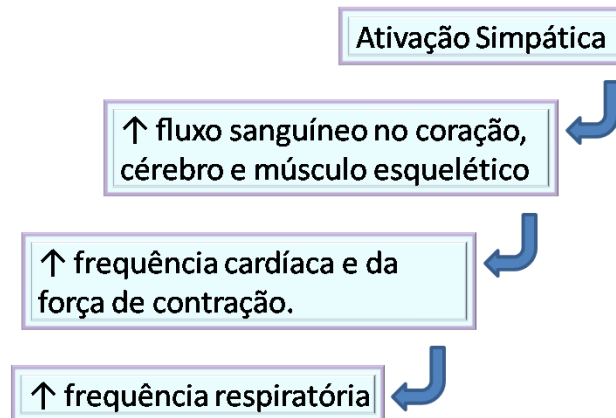
1.3.2. BARORRECEPTORES

No seio carotídeo e no arco aórtico os barorreceptores são ativados pelo estímulo físico do cisalhamento – distensão e retração da parede aórtica de acordo com o fluxo sanguíneo. Tais estímulos são rapidamente convertidos em potenciais de ação que viajam até o núcleo do trato solitário (NTS) considerado o centro do controle da pressão arterial no cérebro. Após a rápida transmissão o resultado obtido é um aumento da atividade parassimpática via nervo vago, resultando em dilatação arteriolar, venodilatação, bradicardia e redução da contratilidade miocárdica^{14,15}.

1.3.3. ATIVIDADE SIMPÁTICA NO CONTROLE DA PRESSÃO

Ao receber os estímulos dos sensores ao longo do corpo, o cérebro os converte em sinais que são efetivados pelo SNS e SNP, funcionando a regulação neuro-humoral da pressão arterial (PA) como um arco-reflexo envolvendo receptores, aferências, centros de integração, eferências e efetores. Esses sinais são potenciais de ação conduzidos ao sistema nervoso central, especificamente ao núcleo do trato solitário (NTS) via nervo glossofaríngeo (fibras carotídeas) e vago (fibras aórticas). Neurônios secundários do NTS excitam neurônios pré-ganglionares do parassimpático localizados no núcleo dorsal motor do vago e no núcleo ambíguo, que por sua vez se projetam (eferentes vagais) aos neurônios pós-ganglionares intramurais situados no coração, determinando o aumento da atividade vagal e queda da frequência cardíaca¹⁵. Os sinais periféricos são recebidos em primeira instância no NTS, que os agrupa e os encaminha para a região de interesse: seja ela de controle simpático, a área ventrolateral rostral do bulbo raquidiano (RVLM) de onde os neurônios se projetam para os neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso simpático, ou de controle parassimpático, no núcleo ambíguo e no núcleo dorsal motor do nervo vago, que contêm os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso parassimpático.

A ativação simpática é traduzida pelo corpo através da liberação de catecolaminas nos terminais neuronais e no sistema circulatório, principalmente noradrenalina e adrenalina. Consideradas as moléculas efetoras do SNS, estas catecolaminas circulantes irão alcançar as diferentes regiões do corpo incitando as respostas típicas conforme o esquema abaixo:



Esquema 1: didático das conseqüências da ativação simpática.

Uma vez atingidos pela ativação simpática, em cada região há também uma compensação hormonal a fim de se atingir os objetivos supracitados. Nos rins, há o estímulo a produção de renina, que eleva os níveis de aldosterona, culminando numa retenção de sódio e conseqüentemente de líquidos, aumentando a volemia do sistema. Na glândula hipófise há a liberação de cortisol, que age no fígado aumentando a glicogenólise e o suprimento energéticos do organismo como um todo. Na glândula adrenal há a liberação de mais catecolaminas, principalmente adrenalina, que vão atuar mantendo o estado de alerta no corpo enquanto for necessário. Todas estas ações são constantemente reguladas não só pelo sistema central (através da atividade parassimpática) como também por mecanismos intrínsecos de *feedback* que auxiliam na regulação do tônus simpático regional, mantendo um equilíbrio dinâmico necessário ao funcionamento do organismo¹⁵.

1.4. MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL

O primeiro modelo animal de hipertensão surgiu na década de 30 quando Goldblatt e colaboradores¹⁶ alcançaram uma elevação persistente da pressão arterial em cães, após constrição da artéria de um dos rins. De lá para cá, os modelos de hipertensão evoluíram passando por modelos psicológicos, cirúrgicos, alimentares e genéticos. Nosso modelo de eleição foi dos ratos espontaneamente hipertensos desenvolvidos por Okamoto e Aoki em 1963¹⁷. Este modelo é considerado um modelo de hipertensão arterial primária e foi desenvolvido através da seleção fenotípica de animais Wistar ao longo de várias gerações. A primeira grande vantagem deste modelo é que a utilização de animais wistar confere o controle ideal do próprio modelo, uma vez que os animais SHR derivam dos Wistar Kyoto. Adiciona-se que, diferente dos modelos nocaute, este método permite a seleção não de um único gene alvo, mas de todo um grupo de alterações genéticas que levam a um fenótipo comum. Apesar de maior variabilidade intra-grupo, acredita-se que este modelo esteja mais próximo da condição humana, aonde as primeiras pistas da doença são o histórico familiar e o fenótipo hipertenso. A ampla evolução deste modelo trouxe novas informações a respeito do mecanismo hipertensivo destes animais que têm sido atribuídos a alterações neurais somadas a alterações vasculares importantes¹⁸. Particularmente o sistema nervoso simpático ocupa uma posição especial no desenvolvimento e manutenção da doença nos SHR, cuja hiperatividade é encontrada na totalidade dos animais¹⁹. Outros modelos animais nos quais a hiperatividade simpática representa ponto chave na hipertensão arterial estão disponíveis. Animais com bloqueio crônico dos receptores adrenérgicos α_{2A} desenvolvem hipertensão²⁰ assim como camundongos nocaute para o receptor β_2 apresentam uma resposta hipertensiva exagerada aos estímulos externos²¹. Tais modelos servem para exemplificação da importância do SNS na hipertensão arterial, mas, mais uma vez, a adjacência com a situação humana faz dos animais SHR a melhor opção para o desenvolvimento deste trabalho.

1.5. A VIA DE SÍNTESE DAS CATECOLAMINAS

As catecolaminas são um grupo de substâncias que têm em comum a presença de um radical catecol, que consiste em um benzeno com duas hidroxilas. No corpo humano, estas moléculas agem como comunicadores do SNS e são produzidas a partir da tirosina. A tirosina pode ser obtida diretamente da dieta ou através da transformação da fenilalanina, executada pela fenilalanina hidroxilase. Após a obtenção, a tirosina é transformada pela tirosina hidroxilase em DOPA, através da adição de uma hidroxila em seu anel benzênico. A DOPA é a primeira catecolamina produzida e a tirosina hidroxilase, e sua respectiva expressão e atividade, considerada enzima limitante para a síntese de todas as catecolaminas endógenas. A cascata segue de forma linear: a DOPA é convertida primeiramente em dopamina, o primeiro neurotransmissor de fato, no citoplasma principalmente dos neurônios noradrenérgicos. A dopamina é então internalizada em vesículas aonde ocorre a sua transformação em noradrenalina. A noradrenalina pode ainda ser convertida em adrenalina, reação que acontece principalmente nas células cromafins da glândula supra-renal. Todas as três substâncias podem atuar sinapticamente ou como hormônios através da estimulação de diferentes tipos de receptores adrenérgicos. Sabe-se, no entanto, que a dopamina tem sua maior atuação como neurotransmissor, a noradrenalina atua como ambos tendo preferência por receptores α -adrenérgicos e a adrenalina atua majoritariamente como hormônio, tendo maior afinidade por receptores β -adrenérgicos^{15,22,23}.

São considerações importantes a respeito desta via o seu caráter linear, de forma que a produção de uma substância sempre passa em algum ponto pela produção de outra semelhante, o que faz com que a regulação do momento de liberação seja quase tão importante quanto a quantidade da substância em si. É ainda de se notar que todas as reações envolvidas são reversíveis, podendo uma catecolamina ser convertida na

outra dependendo do momento fisiológico. A recaptação e conversão destas é inclusive uma das principais formas de retirada das catecolaminas da fenda sináptica ou da circulação, associando-se a enzimas de degradação específicas como a monoamina oxidase (MAO) ou a catecol-O-metiltransferase (COMT).

No plasma sanguíneo cerca da metade das catecolaminas liberadas circulam associadas a proteínas plasmáticas, permitindo que suas quantidades circulantes sejam elevadas rapidamente em momentos de estresse ou de resposta de luta ou fuga. Igualmente rápida é a meia-vida destas substâncias, que não ultrapassa alguns minutos. Esta observação é importante, pois a elevação crônica destes elementos no plasma sanguíneo indica um estado de constante e massiva produção e não pode ser atribuído a situações transientes.

Por fim, os efeitos desencadeados pela ativação deste sistema são uma série de alterações metabólicas de longo alcance, que incluem vasodilatação periférica, aumento da força e velocidade contrátil dos músculos esquelético e cardíaco, disponibilização de recursos energéticos pelo fígado e até efeitos nos sentidos, principalmente para melhora da acuidade visual. Sua ação rápida e transitória e seus efeitos diversos fazem com que as catecolaminas e muitos análogos sintéticos venham sendo de longa data utilizados como medicamentos para condições cardíacas, respiratórias e outros quadros aonde tais efeitos possam trazer vantagem para o quadro geral do paciente²⁴.

1.6. A ATIVIDADE SIMPÁTICA NA HIPERTENSÃO ARTERIAL

Já de longa data é sabido que alterações na função do SNS são cabais no desenvolvimento e manutenção do estado hipertensivo, por levarem a alterações na frequência e no débito cardíacos, na resistência vascular periférica, na microcirculação e no controle renal da volemia²⁵⁻²⁸. Há ainda a perda de sensibilidade do barorreflexo, aumentando a

tolerância a maiores pressões²⁹. Em animais experimentais, o controle energético prejudicado pela hiperatividade do SNS leva ao aumento de peso podendo levar até mesmo à obesidade³⁰, esta mais um fator multiplicador de risco na HAS. A presença da hiperatividade simpática na hipertensão arterial correlaciona-se com maior risco do desenvolvimento de complicações cardíacas³¹ e é encontrada mesmo em indivíduos jovens³². Os dados disponíveis na literatura corroboram a idéia de que quanto mais severa a hipertensão, maior a ativação simpática, o que contribui para a manutenção do quadro e a resistência ao tratamento³³. O exato momento do desenvolvimento deste estado excitado do SNS ainda é muito debatido. É incerto se este faz parte da gênese ou apenas da manutenção da doença, sendo o consenso atual de que há quadros hipertensivos diversos o suficiente para apoiar ambas as teorias^{34,35}.

Em resumo, a atividade simpática desempenha papel importante tanto na saúde como na doença^{36,37}. A ativação simpática é responsável por efeitos essencialmente hipertensivos, que incluem vasoconstrição, efeitos cardíacos cronotrópicos e inotrópicos positivos, ativação do sistema renina-angiotensina, alteração no crescimento e permeabilidade vascular e atuação na sensibilidade do sistema barorreflexo³⁸. A regulação ineficiente do SNS afeta diferentes sistemas, envolvendo-se em diversos quadros patológicos, como dislipidemia, resistência à insulina, obesidade, aumento do hematócrito, intolerância à glicose³⁹ e a própria hipertensão arterial⁴⁰. A hiperatividade simpática, presente em cerca de 30% dos pacientes hipertensos, está ainda relacionada com o aumento do tônus vascular^{33,34}.

1.7. MEDIDAS DA ATIVIDADE SIMPÁTICA EM CLÍNICA MÉDICA

Dada sua importância, seria de se esperar que houvesse maneiras eficientes de se mensurar a atividade simpática em pacientes das diversas patologias onde esta é implicada. No entanto, as metodologias atualmente

aplicadas apresentam desvantagens impossíveis de serem ignoradas, contribuindo para as incertezas acerca do tema.

1.7.1. MEDIDAS DE CATECOLAMINAS CIRCULANTES

A primeira tentativa de se estudar a atividade simpática em clínica médica veio através da medida do neurotransmissor noradrenalina na urina. No entanto esta forma já é considerada obsoleta, dada a inconsistência dos resultados obtidos devido a uma série de alterações fisiológicas não necessariamente conectadas à situação simpática que podem influenciar tal medida. O método mais utilizado atualmente é a medição de catecolaminas circulantes: noradrenalina e adrenalina no plasma sanguíneo. Tal método esbarra em duas grandes limitações. A primeira delas é que obtêm-se apenas informações sistêmicas, o que não é interessante visto que a ativação simpática possui efeitos diferenciados nas regiões do corpo. A segunda é que a quantidade destas moléculas no plasma depende de uma relação entre a secreção e a retirada destas substâncias do plasma, de forma que se torna impossível inferir se os resultados alterados são resultantes de uma secreção pronunciada, de uma remoção deficiente ou de um desequilíbrio nesta manutenção, que pode ser distinta principalmente em condições patológicas^{41,42}.

1.7.2. *SPILLOVER* DE NORADRENALINA

Através da infusão de noradrenalina tritiada e seqüentes retiradas de amostra de sangue na região de interesse, pode-se medir o alcance da noradrenalina nos diferentes órgãos e a velocidade da sua retirada pelo corpo. Esta técnica, no entanto, é pouco usada, pois representa risco ao voluntário da pesquisa devido à exposição radioativa, além de introduzir um viés artificial na ativação simpática intrínseca⁴³.

1.7.3. ANÁLISE ESPECTRAL DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Esta técnica somente fornece informações a respeito da atividade simpática no coração, pois são matematicamente identificáveis as variações no ciclo cardíaco impostos pela SNS. No entanto, dado o fato de que as alterações são muito sensíveis e podem resultar não da atividade

simpática somente, mas do equilíbrio dinâmico entre a atividade simpática e a atividade parassimpática, tais dados facilmente geram resultados enganadores⁴⁴.

1.7.4. MICRONEUROGRAFIA

Esta técnica consiste na inserção de eletrodos de tungstênio sob a pele, diretamente nos nervos peroneais ou medianos da perna. O disparo dos nervos pode então ser medido diretamente na fibra nervosa. As principais desvantagens desta técnica incluem seu caráter invasivo, a medição da atividade somente no músculo quando o mais interessante é a avaliação dos órgãos internos e a discutida natureza mista dos nervos acessados⁴⁵.

1.8. DROGAS ANTI-HIPERTENSIVAS DE AÇÃO CENTRAL

Dada a descoberta do papel do SNS no desenvolvimento e manutenção do estado pressórico elevado, foram desenvolvidos medicamentos capazes de, através de ação no sistema nervoso central, regular a atividade do SNS. Dos medicamentos atualmente descritos como inibidores simpáticos centrais, o mais antigo e que está há mais tempo em uso é a clonidina. Inicialmente desenhada como agonista de receptores alfa-adrenérgicos, rapidamente foram verificados efeitos hipotensores deste fármaco. Com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, o alvo preferencial de ação da clonidina situa-se na medula oblongata do bulbo cerebral, onde se encontram receptores imidazolínicos em maior quantidade⁴⁶. As ações da clonidina incluem a redução de secreção de renina e de vasopressina, ações que contribuem para redução da pressão arterial^{47,48}. A clonidina também é capaz de reduzir a concentração plasmática de noradrenalina, como resultado direto da inibição simpática. No entanto, os fortes efeitos colaterais deste fármaco, que incluem boca seca e sonolência, limitam seu uso atualmente apenas em casos específicos. Após a caracterização das propriedades

farmacológicas dos receptores imidazolínicos, foi possível dissociar os mecanismos farmacológicos envolvidos no efeito terapêutico (controle da pressão arterial) e o principal efeito colateral (sonolência)⁴⁹. Foram desenvolvidas então novas drogas, ditas anti-hipertensivos de ação central de segunda geração, cuja principal promessa era a manutenção do efeito anti-hipertensivo sem a severidade dos efeitos colaterais. Surgiram então a rilmenidina e a moxonidina, que cumprem o prometido. Apesar de menos potente que a clonidina na redução da hipertensão, a rilmenidina possui afinidade trinta vezes maior para os receptores imidazolínicos, do que para os receptores α_2 -adrenérgicos. Por apresentar menor afinidade pelos receptores α_2 -adrenérgicos, a rilmenidina causa menor efeito sedativo, já que a ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos inibe a atividade neuronal no *locus coeruleus*⁵⁰. Vale lembrar que apesar de medicamentos mais modernos estarem chegando ao mercado, a clonidina ainda é o modelo mais fiel de inibição simpática, sendo utilizado inclusive em outras situações que envolvem o SNS como a síndrome da abstinência e o gerenciamento da dor^{51,52}.

1.9. A INTEGRAÇÃO ENTRE O SNS E O SISTEMA IMUNE

É de história recente a confirmação da presença de catecolaminas em célula do sistema imune. Apesar do primeiro relato sobre a modulação de respostas destas moléculas ter ocorrido em 1904 quando médicos observaram uma migração robusta de leucócitos após injeção subcutânea de catecolaminas⁵³, o assunto somente foi abordado novamente nas décadas de 70 e 80, quando foi mostrada a presença de receptores adrenérgicos em linfócitos humanos. Os primeiros trabalhos avaliavam leucócitos provenientes do líquido cérebro espinhal, porém os mais recentes já se utilizavam de técnicas de cultura e de coleta de leucócitos do sangue humano periférico. No começo dos anos 90 foram apresentados inúmeros trabalhos que demonstravam a presença de catecolaminas no interior de células de defesa. Mais recentemente, no final da década de 90

e começo do século 21, todos os outros componentes da via foram demonstrados: tirosina hidroxilase (TH), dopamina β -hidroxilase (DBH), transportadores específicos de catecolaminas, metabólitos dessas catecolaminas e até enzimas capazes de degradá-las como a MAO e a COMT foram relatadas como presentes nestas células. Havia sido confirmada a capacidade de células do sistema imune de receber estímulos, captar, armazenar, sintetizar, produzir, secretar e metabolizar catecolaminas. Apesar do entusiasmo da pesquisa da área, nenhum trabalho foi ainda definitivo em demonstrar a função dessas catecolaminas (CT) leucocitárias, ou mesmo a diferença na atuação delas.

Em 1996, Musso descreve em um trabalho pioneiro⁵⁴ sobre o tema a presença das diferentes catecolaminas nas diferentes células do sistema imune. Em seu trabalho é apresentado que neutrófilos e linfócitos apresentaram níveis de noradrenalina (NE), dopamina (D) e L-DOPA, um precursor de ambas as moléculas. Ele não encontrou, porém, CTs em fagócitos ou no meio de cultura, não apresentando evidência da secreção destas catecolaminas. É também demonstrado que linfócitos provenientes do sangue venoso (mais próximo aos terminais nervosos simpáticos) possuíam um nível maior de CTs que os provenientes de sangue arterial. Neste trabalho é concluído que a capacidade de liberar estas moléculas não está provada, mas que existem indícios de uma comunicação entre o sistema nervoso e o sistema imune através da utilização de um mediador comum: as catecolaminas.

Em seus múltiplos trabalhos⁵⁵⁻⁵⁸, o grupo de Cosentino foi capaz de confirmar a presença de CTs no interior dos linfócitos e no meio de cultura, provando que as células eram capazes de externalizar estas substâncias. Com diversas manipulações farmacológicas (por exemplo inibição de enzimas chave como a TH) foi feita também prova definitiva de que os linfócitos produzem as produzem. Em um de seus trabalhos mais recentes⁵⁸ é investigado qual seria o papel destas CTs. Utilizando linfócitos diferenciados (T CD4+CD25+) mostrou-se que as CTs eram capazes de

afetar a produção de citocinas por estes linfócitos, mostrando um papel modulatório delas na resposta imune. Previamente já se sabia que havia influência de CTs na hematopoese, mas este trabalho é o primeiro a mostrar esta influência em leucócitos ativados, que estão mais próximos da resposta imune propriamente dita. Outro dado interessante dos trabalhos deste grupo é uma gradação da quantidade de CTs nas células, que seria: Linfócitos T = Linfócitos B > Monócitos > Granulócitos. Ele demonstra ainda a NE como principal CT nos linfócitos, mostrando que a maior parte da NE produzida é secretada e que o bloqueio do sistema de transporte da NE aumenta em 8 vezes sua concentração no meio de cultura. Na tentativa de elucidar qual o papel destas CTs na resposta inflamatória, os resultados não foram cabais, mas foi mostrado que a utilização de L-DOPA, um precursor das CTs, reduziu a proliferação e a diferenciação dos leucócitos isolados, a incubação com L-DOPA, noradrenalina ou dopamina também induziram a apoptose de forma dose-dependente⁵⁹. A ativação das células imunes (em modelos de injúria pulmonar ou através de estimulação por lipopolissacarídeo) é capaz de aumentar as CTs produzidas e secretadas por estas células. Outro dado importante é que apesar de os fagócitos terem sido minimizados nesta área, quando ativados, foram capazes de apresentar quantidades significantes de CTs, principalmente na secreção de adrenalina⁶⁰. Mostram também que citocinas como o interferon gama são capazes de reduzir a produção de CTs nestas células ativadas. Todos os trabalhos indicam que as CTs teriam função reguladora autócrina/parácrina na resposta inflamatória. O contrário nunca foi investigado: será que as CTs provenientes de leucócitos se relacionariam com as CTs neuronais?

O recolhimento de leucócitos provenientes de animais com a atividade adrenérgica bloqueada farmacologicamente resultou em um aumento da expressão de TH, DBH e CTs em geral, que o autor justifica como um possível mecanismo compensatório. Sendo esse o caso, na hiperatividade simpática poderíamos encontrar leucócitos com menos CTs,

bem como uma diminuição do número de leucócitos, uma vez que as CTs influenciam também a hematopoese⁶¹.

Em resumo, foi recentemente provada a existência e o papel modulador das CTs em células do sistema imune. Seu papel exato ainda é obscuro, apesar de haver fortes indícios da atuação delas na regulação da resposta imune (principalmente como fator inibidor) e na comunicação deste sistema com o sistema nervoso autônomo. A investigação destes fatores tem momentaneamente se concentrado em elucidar os mecanismos através dos quais estas CTs influenciam a resposta imune, de forma que a investigação do papel delas no sistema nervoso (em condições saudáveis ou patológicas) representariam uma abordagem inovadora.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a existência de uma correlação entre a expressão da enzima limitante da via de síntese de catecolaminas, tirosina hidroxilase, proveniente de leucócitos periféricos e a atividade simpática sistêmica em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Mensurar a expressão da enzima tirosina hidroxilase em animais normotensos, hipertensos e hipertensos tratados, em sítios de regulação da atividade simpática e em leucócitos isolados de sangue periférico.
- Mensurar a adrenalina e noradrenalina plasmáticas nos animais experimentais.
- Avaliar o efeito do bloqueio central da atividade simpática na pressão arterial e na expressão da enzima tirosina hidroxilase dos animais experimentais.
- Avaliar o efeito da modulação periférica do sistema renina-angiotensina na pressão arterial e na expressão da enzima tirosina hidroxilase dos animais experimentais.

- Correlacionar o nível de expressão da enzima tirosina hidroxilase nos diferentes tecidos com a presença de hipertensão arterial e com a atividade simpática nos animais experimentais.

3. METODOLOGIA

3.1. MODELOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos da linhagem de Okamoto (Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil) com 12 a 14 semanas e ratos machos normotensos Wistar Kyoto (WKY, Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz, Brasil), com idades pareadas.

Os animais foram mantidos sob condições controladas de luz (ciclos de 12-12h claro-escuro) e temperatura (22 ± 1 °C) com acesso livre a água e ração padrão até o dia do experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ, protocolo # L-0034/08).

Vinte e quatro ratos SHR foram divididos de maneira aleatória em grupos (8 animais por grupo) e tratados durante 28 dias por gavagem com veículo (SHR-VEI, grupo controle), clonidina (SHR-CLO, 0,1 mg/kg/dia) ou losartan (SHR-LOS, 10 mg/kg/dia). Um grupo de oito ratos WKY foi tratado com veículo durante 28 dias e foi considerado como o grupo controle normotenso (WKY-VEI). Os experimentos foram realizados em duas etapas temporalmente distintas, cada uma contendo 4 animais.

3.2 .MEDIDAS HEMODINÂMICAS

Foram realizadas medidas da pressão arterial sistólica em animais conscientes, através de um sistema computadorizado de pletismografia caudal (BP-2000, *Visitech blood pressure analysis system*, USA), um método não invasivo de medida da PA.

Antes da medida da PA, os ratos eram adaptados por 3 dias consecutivos no aparelho de pressão caudal pré-aquecido. A PA era medida antes do início do tratamento e após a quarta semana, sendo adquiridas 10 medidas individuais por animal e utilizada a média destas medidas.

3.3. LEUCOMETRIA

Com o objetivo de avaliar a contagem geral de leucócitos nos animais experimentais, foi realizada leucometria antes e após o tratamento de 28 dias. Seguindo a administração de anestésico local, foi feita uma pequena incisão na extremidade da cauda dos animais e retirado 5µl de sangue periférico. A este foi adicionado o diluente conhecido como reagente de Turk (ácido acético 2%; violeta de genciana 0,1%). Uma alíquota de 20 µl desta solução foi adicionada à câmara de Neubauer e os leucócitos periféricos foram contados em microscópio ótico com objetiva de 40x ou 100x.

3.4. EXPERIMENTO TERMINAL

Após o término dos 28 dias de tratamento, os animais foram anestesiados com uretano (1,5 mg/kg) e tiveram coletados 5 ml de sangue periférico em seringas com EDTA 8% para prevenir a coagulação. Após esse procedimento os animais foram sacrificados, e foram retirados e isolados as glândulas adrenais e o bulbo raquidiano. Os tecidos foram armazenados em nitrogênio líquido para posterior processamento.

3.5. OBTENÇÃO DE PLASMA

A separação do plasma sanguíneo se deu por centrifugação simples, a 3500 rpm, por 15 minutos, a 4°C. O plasma obtido foi congelado a -20 °C para ensaio posterior por até 6 meses.

3.6. DOSAGEM DE CATECOLAMINAS

A dosagem de catecolaminas no plasma sanguíneo foi realizada conforme kit comercial (2-CAT ELISA Fast Track[®] - Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG). O kit consiste em um ensaio de extração e concentração das catecolaminas através de um gel de afinidade, seguido de um ensaio de ELISA aonde amostras, controles e padrões se ligam a sítios específicos em uma fase sólida, que é posteriormente lavada para retirada de excedentes não ligados e então detectada com a ajuda de um anticorpo conjugado a peroxidase a 450nm. A quantificação das amostras desconhecidas é obtida através da comparação de absorbância com uma curva de referência preparada com padrões de concentrações conhecidas. Por motivos de força maior, somente foi realizado na segunda amostragem.

3.7. ISOLAMENTO DOS LEUCÓCITOS

Na proporção de 1:1 o sangue fresco foi adicionado a um tubo contendo Ficoll-Paque (Ficoll-Paque[™] PREMIUM - GE Healthcare Lifesciences) e centrifugado a 400 g por 20 minutos. Somente foi recolhida a fase das células mononucleares (PBMC) e lavada com PBS gelado em dois ciclos de centrifugação a 800G por 15 minutos. Após as lavagens o *pellet* obtido foi ressuspenso em tampão de lise (HEPES 50mM, MgCl₂, EDTA, Triton X-100 1%) e armazenado a -20°C para ensaio posterior por até 6 meses.

3.8. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A glândula supra-renal foi homogeneizada em baixa temperatura na presença de tampão de lise (HEPES 50mM, MgCl₂, EDTA, Triton X-100 1%) acrescido de mistura comercial de inibidores de proteases (Roche Ltda. - Germany) em baixa temperatura. O homogenato obtido foi centrifugado a 3500rpm por 5 minutos e o

sobrenadante final recolhido e conservado em -80°C para ensaio posterior por até 6 meses.

O bulbo raquidiano previamente dissecado foi homogeneizado em baixa temperatura na presença de tampão de lise de Tris (Tris-HCl 50mM, EDTA 50mM) acrescido de mistura comercial de inibidores de proteases (Roche Ltda. – Germany) em baixa temperatura. O homogenato obtido foi centrifugado a 3500rpm por 5 minutos e o sobrenadante final recolhido e conservado em -80°C para ensaio posterior por até 6 meses.

3.9. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem das proteínas totais das amostras recolhidas foi realizada pelo método de Bradford, conforme kit comercial (Pierce[®] BCA Protein Assay Kit - Thermo Scientific Inc., Rockford, USA)

Todas as amostras – supra-renais, bulbo raquidiano e leucócitos – foram aliqüotados e diluídos em tampão de amostra (Glicerol 2ml; Mercaptoetanol 1ml; SDS 10% 3ml; NaOH 10N 20 μ l; Azul de Bromofenol 2%) e armazenados em -20°C para ensaio posterior por até 12 meses.

3.10. SDS-PAGE

A técnica de SDS-PAGE foi aplicada para quantificar a expressão das proteínas de interesse conforme anteriormente descrito na literatura⁶². Basicamente, uma alíquota de 20 μ g de proteína foi aplicada em gel de bisacrilamida/acrilamida a 10% para separação e transferidas para membrana de nitrocelulose (Trans-Blot[®] Transfer Medium – BioRad Laboratories Inc., CA). Para mensuração da expressão da TH, as membranas foram bloqueadas em solução de albumina 3% em solução

TBS-Tween (Tris 20mM, NaCl 0,5mM, Tween-20 0,05%) por 1 hora, seguindo a incubação com anticorpo policlonal anti-TH (Millipore – Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) na concentração de 1:1000 overnight. Após lavagem, a membrana foi em seguida incubada com o secundário anti-rabbit policlonal com HRP conjugado (Thermo Scientific Inc., Rockford, USA) na concentração de 1:1000. Para o ensaio da β -actina foi utilizado o anticorpo policlonal na concentração de 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA) e secundário 1:5000 (Thermo Scientific Inc., Rockford, USA). A revelação se deu por sistema ECL conforme kit comercial (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate - Thermo Scientific Inc., Rockford, USA). As imagens foram escaneadas e analisadas com ajuda do software Image J e os dados mostrados como uma relação TH/Actina.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como sendo a média \pm erro padrão da média (EPM) para cada grupo e comparações entre grupos diferentes foram feitas através do test t de Student não pareado ou da análise de variância (ANOVA) quando apropriado. Quando foram detectadas diferenças significativas pelo ANOVA, o teste de Bonferroni foi utilizado para localizar as diferenças estatisticamente significativas. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para medir a força da relação linear entre as medidas de expressão enzimática nos diferentes tecidos. Diferenças com valores de p menores que 0,05 foram consideradas significativas. Todos os cálculos foram realizados por análises informatizadas através do programa estatístico comercialmente disponível (Graphpad Instat e Graphpad Prism, Graphpad Software, California, USA).

4. RESULTADOS

4.1. PRESSÃO ARTERIAL

Os animais SHR apresentaram uma pressão arterial significativamente maior que os animais WKY, conforme observado na figura 1. Entre si, os grupos hipertensos não apresentaram diferença antes do tratamento. Após o tratamento de 28 dias, os animais tratados somente com o veículo não apresentaram nenhuma alteração na pressão arterial sistólica, enquanto os animais tratados com clonidina (CLO) ou losartan (LOS) tiveram uma diminuição desta. Esta diminuição equiparou os níveis pressóricos encontrados nos animais SHR tratados com os animais WKY normotensos. O grupo SHR que recebeu veículo foi o único a manter sua pressão arterial sistólica elevada até o fim do experimento.

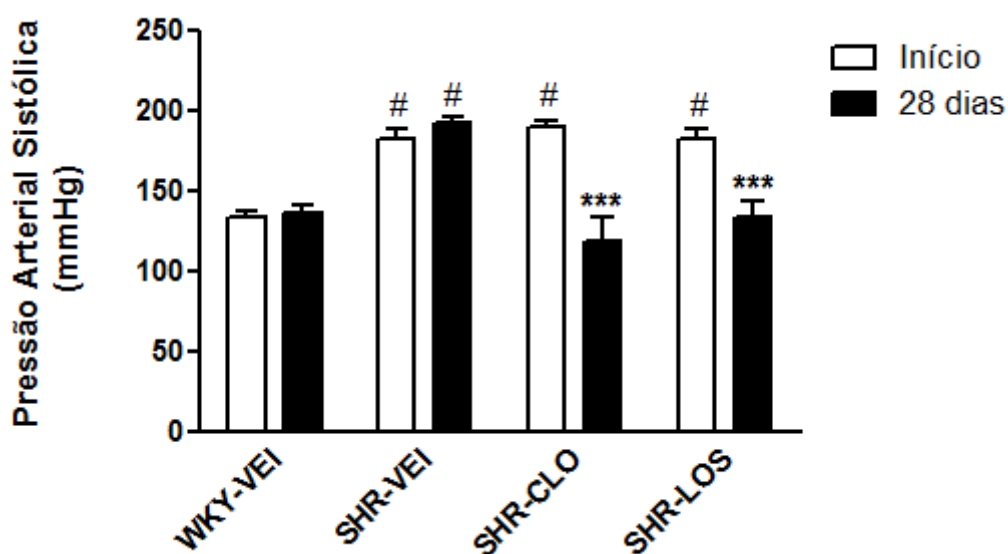


Figura 1. Pressões arteriais sistólicas dos animais experimentais. Barras abertas representam o basal, barras fechadas após o tratamento de 28 dias.

n = 8 e ***p<0,0001 vs. Basal. #p<0,01 vs WKY-VEI por ANOVA.

4.2. LEUCOMETRIA

Não foi observada nenhuma diferença significativa na contagem de leucócitos de nenhum dos grupos (figura 2), independentemente do tratamento utilizado.

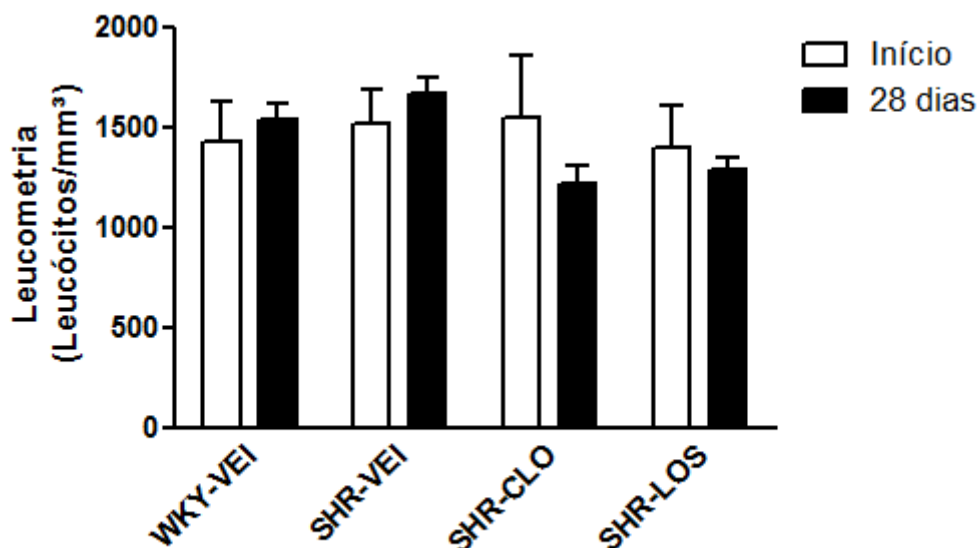


Figura 2. Contagem de leucócitos periféricos dos animais experimentais. Barras abertas representam o basal, barras fechadas após o tratamento de 28 dias. n = 8.

4.3. CATECOLAMINAS PLASMÁTICAS

A medição realizada em plasma de sangue periférico das principais catecolaminas mostrou inicialmente que os animais hipertensos possuem maior nível de catecolaminas circulantes. Tanto para adrenalina (SHR $13,7 \pm 0,7$; WKY $11,3 \pm 0,8$) quanto para noradrenalina (SHR $10,2 \pm 1,2$; WKY $3,5 \pm 1,5$) (Fig.3a e 4a). Tais dados comprovam o frequente achado de hiperatividade simpática em SHR presente na literatura. Para a adrenalina, apesar de forte tendência a redução dos níveis plasmáticos nos animais tratados após 28 dias ($p=0,06$), a diminuição não foi estatisticamente significativa (Fig. 3b). Já para a NE, a redução foi notória e significativa tanto para CLO quanto para a LOS (Fig.4b).

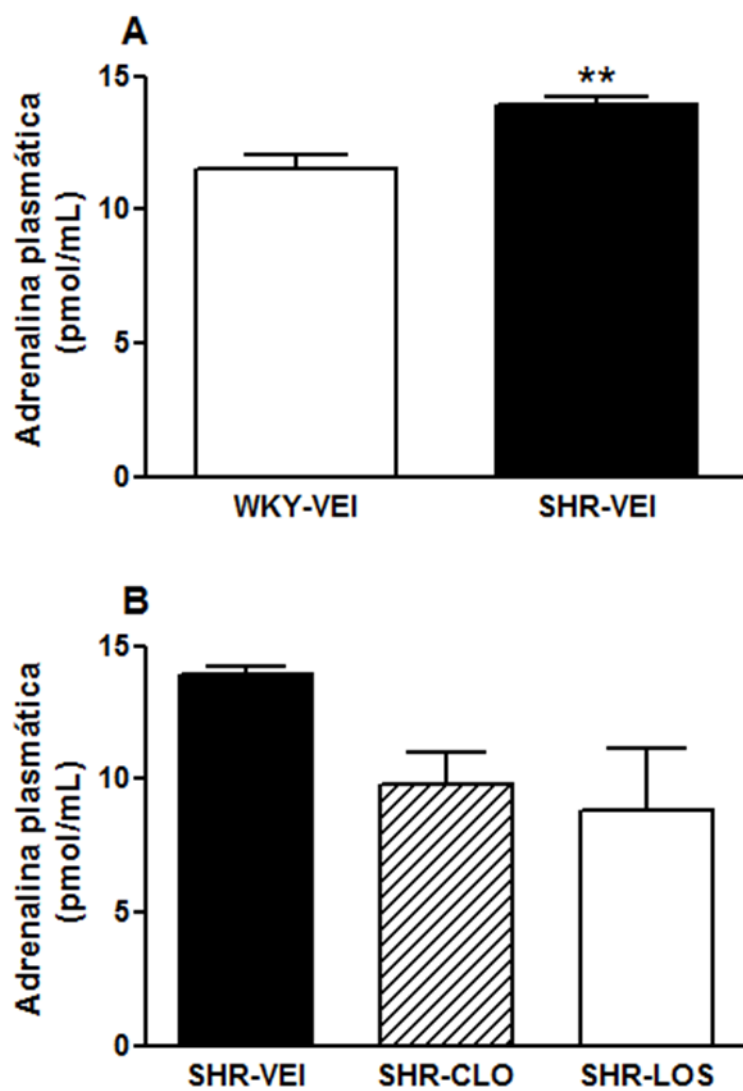


Figura 3. Concentração das catecolaminas plasmáticas – (a) adrenalina dos animais WKY e SHR e (b) adrenalina nos animais SHR e tratados com CLO e LOS - em sangue periférico dos animais experimentais.

n = 4 e **p<0,01 vs. WKY-VEI por teste t.

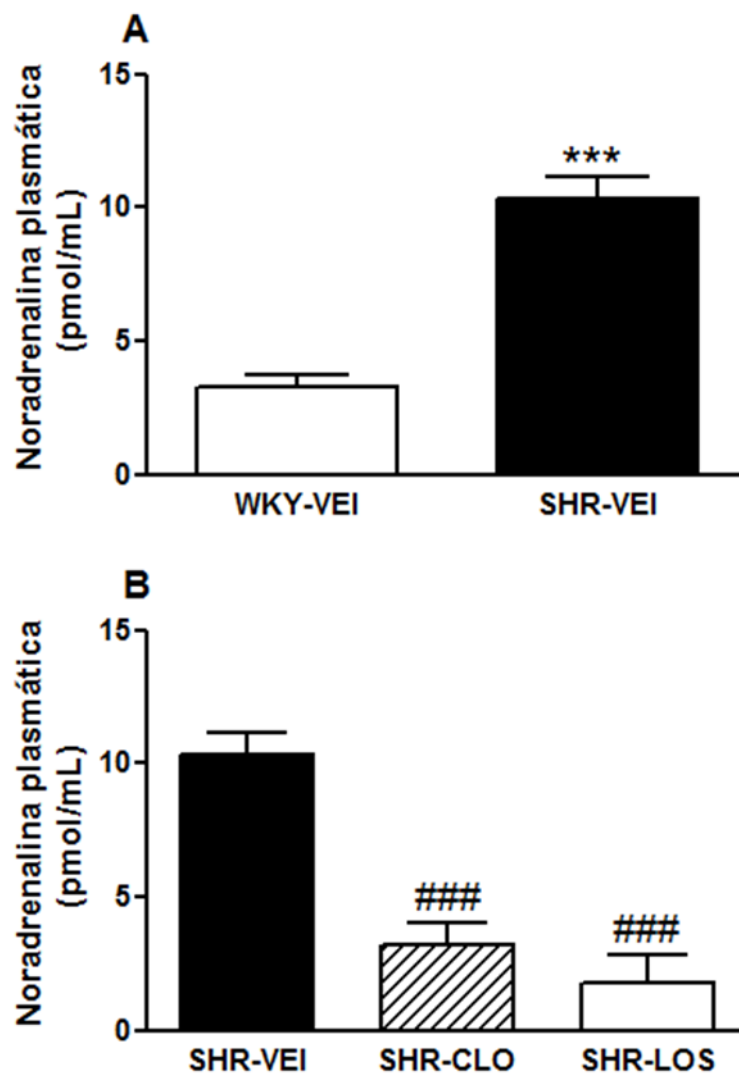


Figura 4. Concentração das catecolaminas plasmáticas - (a) noradrenalina dos animais WKY e SHR e (b) noradrenalina nos animais SHR e tratados com CLO e LOS - em sangue periférico dos animais experimentais.

n = 4 e ***p<0,001 vs. WKY-VEI por teste t; ###p<0,001 vs. SHR-VEI por ANOVA.

4.4. EXPRESSÃO DA TIROSINA HIDROXILASE (TH)

No bulbo raquidiano dos animais estudados a expressão da enzima tirosina hidroxilase dos animais SHR foi significativamente maior que nos animais normotensos. Após o tratamento com CLO, a expressão desta enzima foi reduzida significativamente. Já o tratamento com LOS não foi capaz de reduzir de maneira significativa a expressão da enzima neste tecido (Fig. 5).

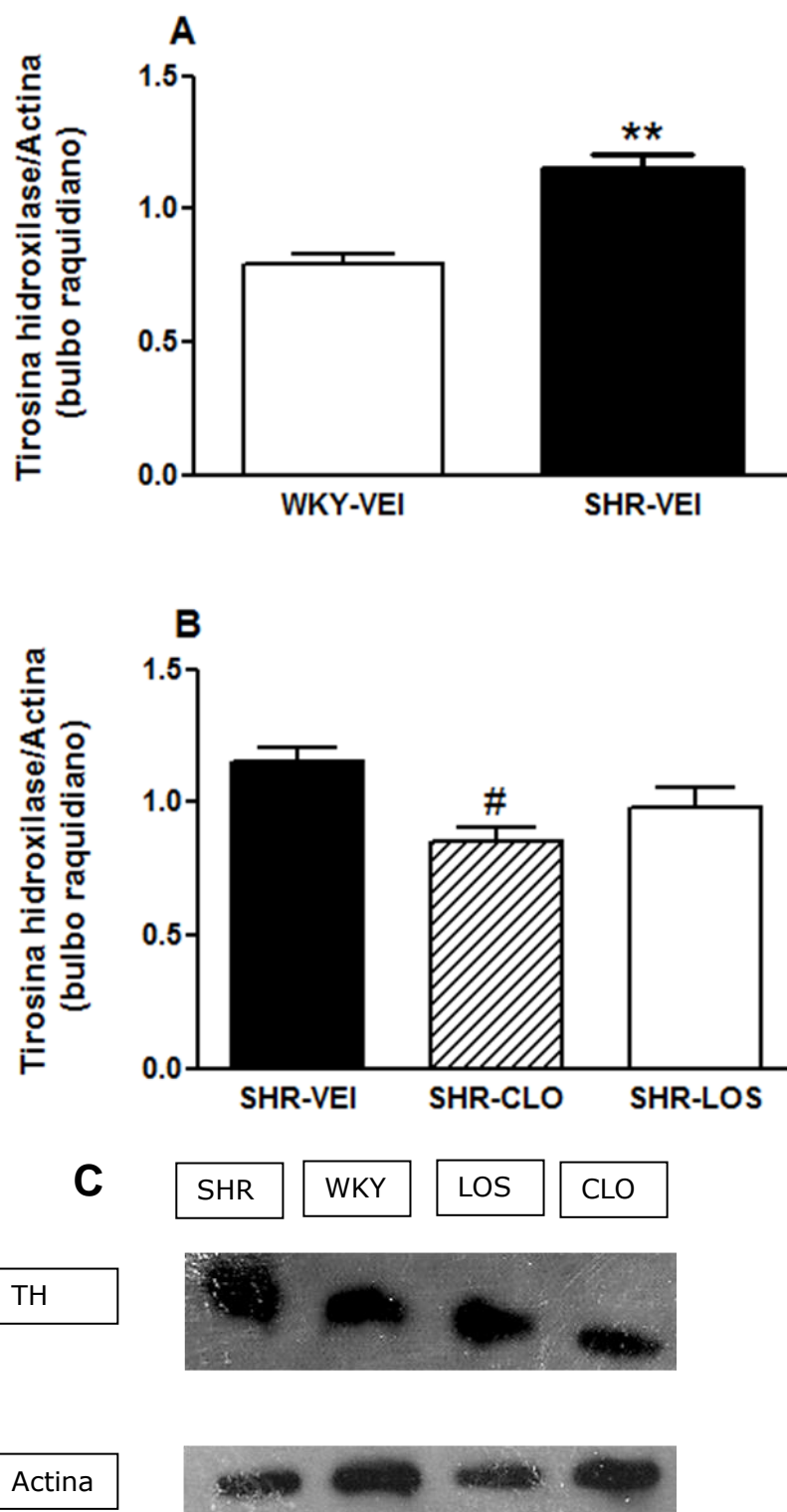


Figura 5. Expressão da TH em bulbos isolados dos animais experimentais: (a) relação TH/Actina dos animais WKY e SHR (b) relação TH/Actina dos animais após o tratamento com os fármacos ou veículos (c) imagem representativas dos *westerns* realizados.

n = 7 e **p<0,001 vs. WKY-VEI por teste t; #p>0,05 vs. SHR-VEI por ANOVA.

Nas glândulas supra-renais isoladas de animais SHR a expressão foi significativamente aumentada em comparação com os animais WKY. Após o tratamento com CLO a expressão da proteína reduziu significativamente com o grupo controle, mas o tratamento com LOS, apesar de causar discreta redução, não foi capaz de reduzir significativamente (Fig. 6).

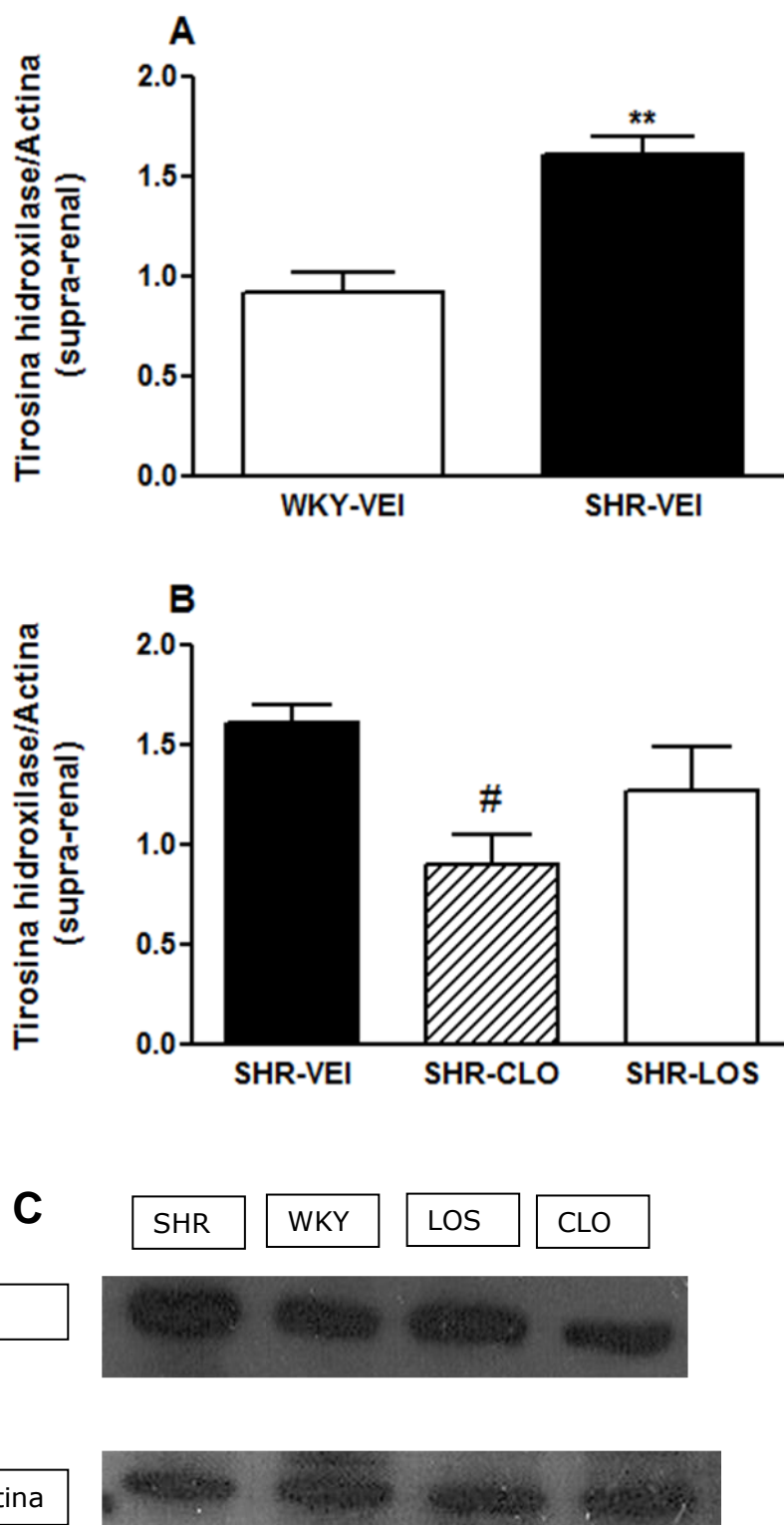


Figura 6. Expressão da TH em glândulas supra-renais isoladas dos animais experimentais: (a) relação TH/Actina dos animais WKY e SHR (b) relação TH/Actina dos animais após o tratamento com os fármacos ou veículos. (c) imagens representativas dos *westerns* realizados.

n = 8. **p<0,001 vs. WKY-VEI por teste t; #p<0,05 vs. SHR-VEI por ANOVA.

A análise dos leucócitos revelou um padrão que acompanha os resultados dos outros tecidos avaliados. Refletindo a situação sistêmica de hiperatividade simpática e a grande quantidade de catecolaminas circulantes, os animais SHR revelaram uma expressão maior da TH nos leucócitos de sangue periférico em comparação com os animais WKY. O tratamento com CLO foi capaz de reverter essa condição, reduzindo, também nos leucócitos, a expressão da enzima. No grupo LOS não houve redução significativa. Os dados podem ser observados na Figura 7.

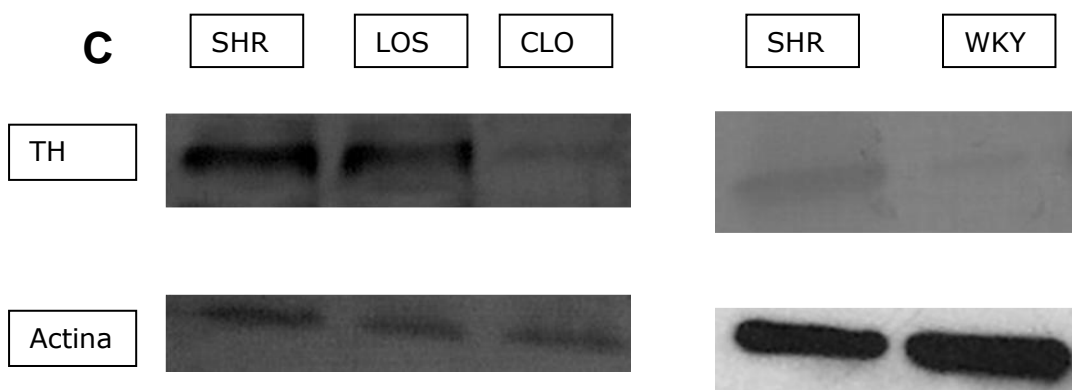
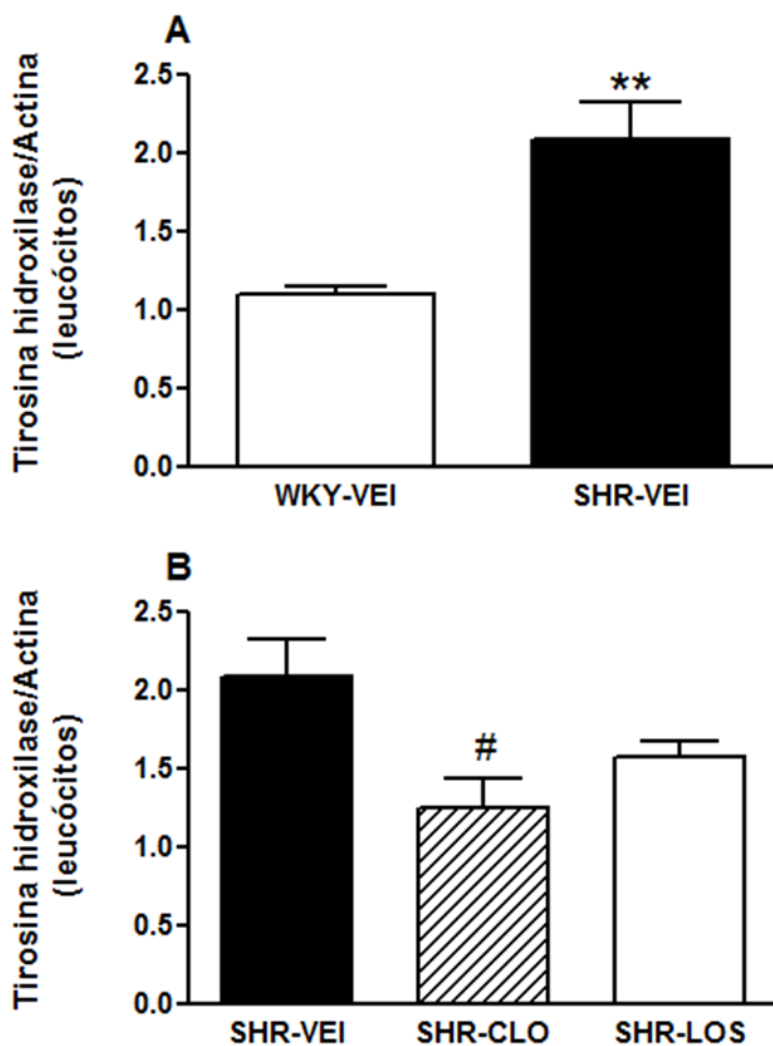


Figura 7. Expressão da TH em leucócitos periféricos isolados dos animais experimentais: (a) relação TH/Actina dos animais WKY e SHR (b) relação TH/Actina dos animais após o tratamento com os fármacos ou veículos. (c) imagens representativas dos *westerns* realizados.

n = 6. **p<0,01 vs. WKY por teste t; #p>0,05 vs. SHR por ANOVA.

4.5. CORRELAÇÕES

A interrelação entre os pontos principais de regulação, o bulbo raquidiano e a glândula supra-renal, mostrou-se significativa (conforme observado na Fig.8). Foi igualmente significativa a correlação entre os leucócitos periféricos e a glândula supra-renal (figura 9) e o bulbo raquidiano (figura 10).

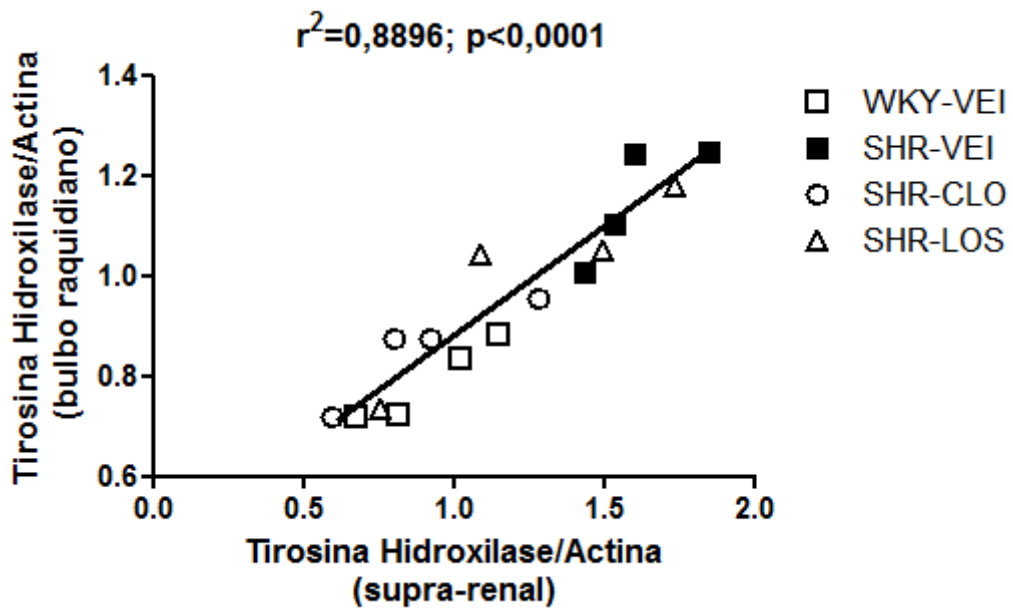


Figura 8. Correlação entre a expressão da TH nas supra-renais e nos bulbos dos animais experimentais. n = 4; Correlação linear de Pearson.

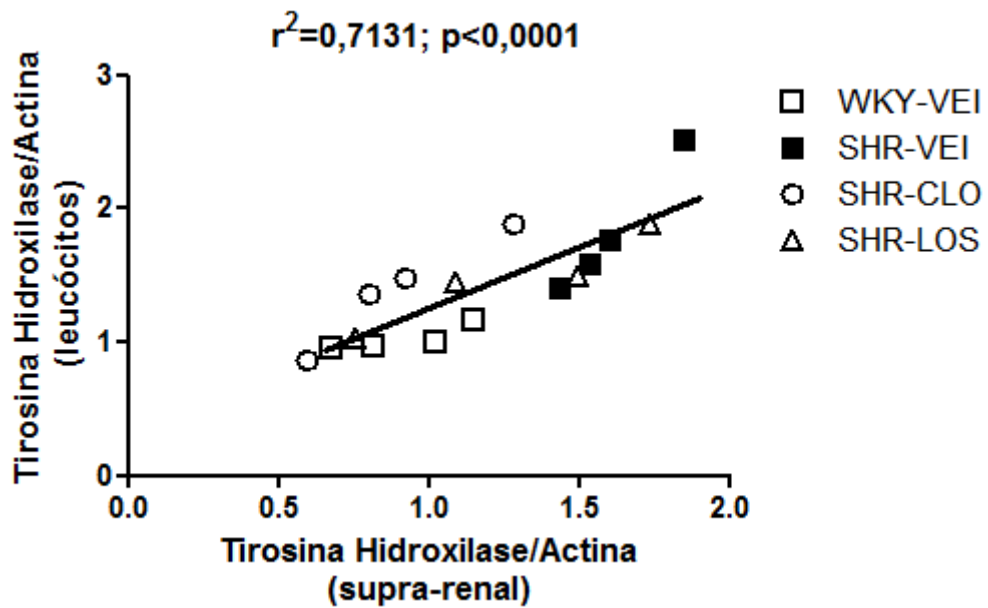


Figura 9. Correlação entre a expressão da TH nas supra-renais e nos leucócitos periféricos dos animais experimentais. n = 4; Correlação linear de Pearson.

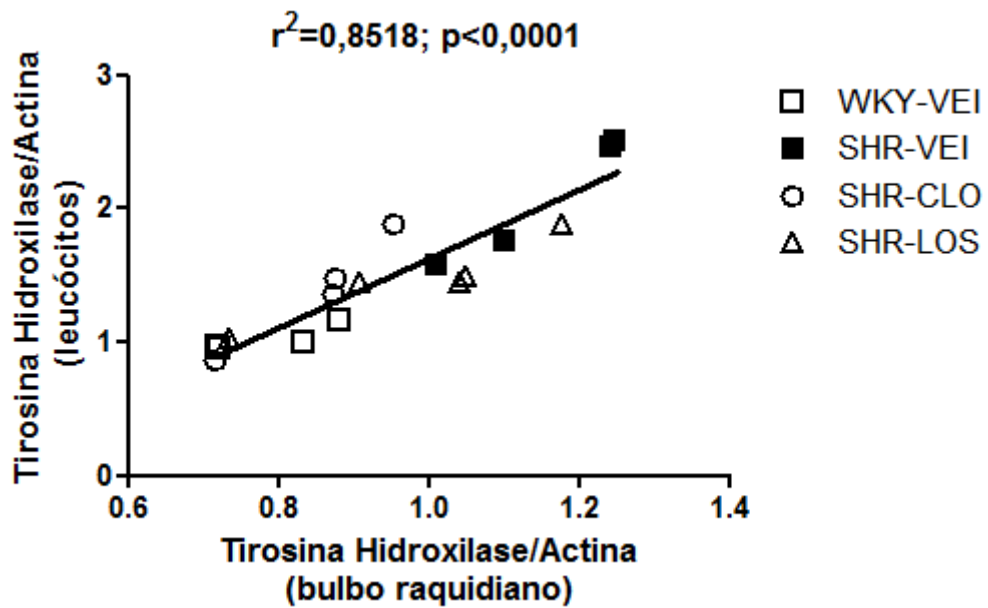


Figura 10. Correlação entre a expressão da TH nos bulbos isolados e nos leucócitos periféricos dos animais experimentais. n = 4; Correlação linear de Pearson.

Já análise da correlação entre os leucócitos periféricos e as catecolaminas plasmáticas tiveram resultados diversos. Enquanto não houve correlação entre a adrenalina e os leucócitos (figura 11), a correlação entre a noradrenalina e os leucócitos foi extremamente significativa (figura 12).

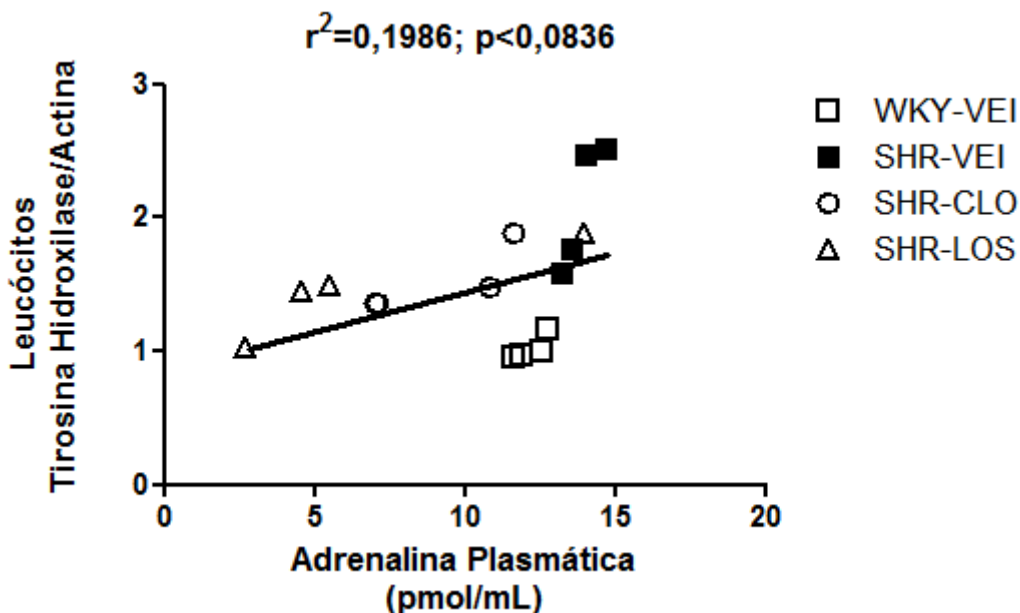


Figura 11. Correlação entre a adrenalina plasmática e a expressão da TH nos leucócitos periféricos dos animais experimentais. n = 4; Correlação linear de Pearson.

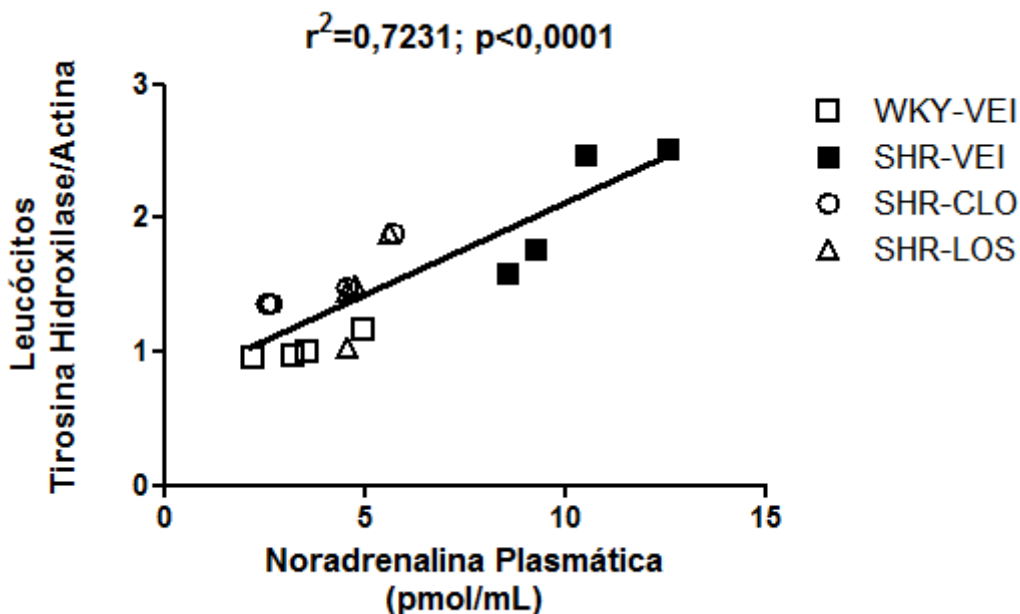


Figura 12. Correlação entre a noradrenalina plasmática e a expressão da TH nos leucócitos periféricos dos animais experimentais. n = 4; Correlação linear de Pearson.

5. DISCUSSÃO

Observa-se de longa data que ratos SHR possuem uma elevação espontânea da pressão arterial que se estabelece nos animais por volta da 10ª semana de vida. Os animais utilizados neste estudo, com 12 semanas de idade, não foram diferentes, apresentando uma pressão arterial significativamente maior que a dos ratos WKY, compatível com um quadro de hipertensão arterial. Este dado ocorreu em todos os grupos SHR antes do tratamento. Após as 4 semanas de tratamento ambos os fármacos foram capazes de reduzir a pressão arterial dos animais tratados a níveis estatisticamente semelhantes aos dos animais normotensos controle (Fig 1). Os animais tratados com veículo mantiveram o estado hipertenso até o final do experimento. A pressão dos animais WKY não se alterou durante todo o curso do tratamento farmacológico.

Tais dados, embora não inéditos, confirmam a lisura do método de tratamento, uma vez que a manipulação humana não alterou a pressão dos animais e tanto a clonidina quanto o losartan cumpriram seu propósito de desenho, tratando o estado hipertensivo adequadamente. Tais resultados comprovam não só a eficácia dos fármacos desenvolvidos com este propósito, mas também a adequação do tratamento por nós utilizado. Em clínica, muitas vezes apesar de altas doses de medicamentos anti-hipertensivos, não se obtém um controle tão adequado sobre a pressão arterial dos pacientes.

Antes e após o tratamento era necessário realizar uma contagem geral dos leucócitos dos animais. Dada a hiperatividade simpática destes, poderia supor-se que animais SHR tivessem um número diferenciado de leucócitos circulantes, uma vez que o estresse possui efeito imunomodulador controverso⁶³⁻⁶⁵. A interação com fármacos capazes de reduzir esta atividade poderiam também alterar esta contagem. Ainda era preciso avaliar se todos os grupos possuíam contagem de leucócitos semelhante para que a quantidade de proteína deste extraída fosse também similar.

Ao contrário do que a condição de hiperatividade simpática poderia sugerir, não foi encontrada diferença na leucometria dos animais experimentais. É sabido que o tônus simpático afeta diferenciação, proliferação e responsividade dos diferentes tipos de leucócitos, inclusive durante o curso de doenças imunes⁶⁶. No entanto, nos animais SHR, a condição hipertensa não afeta a contagem geral de células sanguíneas, permitindo a direta comparação com os animais normotensos.

A aferição das catecolaminas plasmáticas, apesar de controversa, é hoje ainda a mais prática maneira de se obter dados sobre a atividade simpática do paciente em clínica. Assim sendo, apesar de em animais experimentais ser possível medidas mais diretas e precisas (como a medição do disparo de nervos renais e análises matemáticas complexas^{67,68}), optamos por utilizar uma metodologia de fácil aplicação em consultórios, uma vez que consiste em uma simples amostragem sanguínea. Suas principais limitações são o caráter sistêmico da informação e a obtenção apenas de informações da quantificação final, sem especificar as diferentes etapas de produção e degradação de catecolaminas, que podem ser diferentemente reguladas em um mesmo organismo. A hiperatividade simpática dos animais SHR é de longa data conhecida, sendo citada em estudos tão antigos como 1984⁶⁹. Os primeiros estudos, como o citado, observaram principalmente alterações renais, tendo sido posteriormente encontrada hiperatividade simpática em outros órgãos importantes como o coração, o cérebro e as glândulas adrenais. Nossos achados mostraram um aumento na concentração das catecolaminas plasmáticas em ratos SHR corroborado pela ampla literatura sobre a hiperatividade simpática destes animais. Foi também demonstrado que ambos os tratamentos foram capazes de reduzir a concentração plasmática da noradrenalina. Esse dado indica uma redução da atividade simpática sistêmica, mas por si só não permite a discussão dos diferentes mecanismos envolvidos. Sabe-se no entanto que, a CLO possui uma ação central principal, associada a uma forte ação periférica,

por inibição simpática direta através da ativação de receptores α_2 pré sinápticos e diminuição da liberação de noradrenalina nas fendas sinápticas⁷⁰. Já o LOS, medicamento antagonista do receptor de angiotensina (AT1), pode reduzir a atividade simpática de maneira indireta ao agir principalmente nos mecanismos renais influenciando o sistema renina-angiotensina-aldosterona, aonde se sabe que a angiotensina possui papel modulador, inclusive na secreção de catecolaminas e na resposta ao estresse⁷¹. Estando a hipertensão arterial e a hiperatividade simpática tão intimamente relacionadas, não há tratamento que altere a pressão arterial sem alterar a atividade simpática e vice-versa. O losartan, diferentemente da clonidina, possui fraca ou nenhuma passagem através da barreira hemato-encefálica, sendo seus efeitos reflexos periféricos e sendo também esta a principal razão de sua escolha como comparação.

É interessante destacar que, apesar de ambas as catecolaminas demonstrarem diferença significativa nos animais hipertensos em comparação com os animais Wistar, a diferença encontrada na noradrenalina é muito mais marcante que a encontrada na adrenalina. Pelo fato de o hormônio periférico efetor ser principalmente a adrenalina e os efeitos desta serem muito mais pronunciados que a de seu precursor, tal achado pode parecer, a princípio, um contra-senso. Ao achar que, pelo fato de os efeitos da adrenalina serem mais pronunciados que o da noradrenalina, é necessária uma quantidade menor de hormônio para se obter o mesmo efeito, resvala-se nos dados literários que mostram que a liberação de adrenalina/noradrenalina pela glândula adrenal acontece em uma proporção de 4:1. A verdadeira resposta está em três pontos de grande relevância quando estudamos a ação sistêmica do SNS. Primeiro nas fibras simpáticas em si, porque estas liberam noradrenalina e não adrenalina, que embora na maior parte das vezes tenham uma ação local, pode se difundir também para o plasma resultando em interações não sinápticas⁷². Segundo, nas conexões da glândula supra-renal, somente as

células cromafins secretoras de noradrenalina se comunicam com o sistema barorreflexo⁷³, dando a esta mais notabilidade principalmente no quadro hipertensivo. Por fim, já foi mostrado que em situações de estresse há um aumento das catecolaminas circulantes, e que órgãos linfóides são capazes de captá-las e convertê-las principalmente em noradrenalina antes de liberá-las novamente no meio⁷⁴. Alguns estudos relatam ainda a capacidade dos receptores imidazolínicos, alvo secundário da clonidina, reduzirem a liberação de noradrenalina⁷⁵. Faltam estudos que estendam o mesmo padrão de comportamento aos linfócitos maduros, mas tendo sido demonstrado que a maquinaria necessária para tal é neles presente, há de se inferir que esta é uma boa possibilidade. Quando nos referimos ao quadro hipertensivo em particular, tais resultados fazem ainda mais sentido. Apesar de não ser o hormônio principalmente liberado, a noradrenalina em seu conjunto de efeitos atua mais extensivamente nos vasos sanguíneos, enquanto a adrenalina tem seus efeitos mais evidentes no músculo cardíaco. Tem sido recentemente levantado que pacientes hipertensos carregam alterações microcirculatórias importantes, como a rarefação capilar funcional e estrutural, e que tais alterações não só se estendem aos animais SHR como são de vital importância para manutenção do estado hipertensivo^{76,77}. Juntos, estes dados conferem à noradrenalina um papel modulatório de igual, ou mesmo maior relevância que a adrenalina em nosso cenário. Expõem ainda a grande fraqueza da medida isolada das catecolaminas plasmáticas como aferição da atividade simpática no indivíduo, uma vez que esta pode ser alterada por uma grande gama de fatores não necessariamente correlatos com um quadro de hiperatividade simpática crônica.

Através da técnica de *western blotting* é possível medir a expressão direta da proteína limitante na via de síntese de catecolaminas nos tecidos estudados. Em cada caso, as proteínas são medidas através da extração protéica do plasma das células componentes de cada tecido. Tal fato

implica que a proteína medida pode ser proveniente tanto de produção quanto de recaptação, mecanismo demonstrado em todos os tecidos estudados. Analisar a expressão da TH é feito comum de trabalhos que estudam o SNS, mas o principal objetivo costuma ser a marcação de inervação noradrenérgica. No estudo da HAS vem se tornando também comum o rastreamento desta enzima, tendo sido sua elevação achado corriqueiro em animais SHR⁷⁸. No presente estudo encontramos o mesmo padrão de expressão nos três tecidos avaliados. Os animais hipertensos apresentam uma expressão significativamente maior que os animais normotensos. Esta expressão somente é reduzida de forma estatisticamente após o tratamento com a CLO. A maior redução por ela obtida era esperada devido ao seu mecanismo de inibição do SNS e a interpretação inversa deste dado traz uma certeza interessante. Já foi levantado que as catecolaminas aferidas plasmaticamente são balanço de uma série de sistemas fisiológicos atuando em conjunto, nos quais o tônus simpático pode ser diferenciado por muitos motivos. Encontrar com a administração de CLO uma queda significativa e marcante nestas catecolaminas é a confirmação de que, ao menos parte destes hormônios provém de uma hiperatividade simpática patológica encontrada nos animais hipertensos. Os resultados encontrados nos bulbos e adrenais acompanham os achados das catecolaminas plasmáticas e a maior parte dos trabalhos publicados nesta área⁷⁹. Em leucócitos, no entanto é a primeira avaliação feita em animais hipertensos com o objetivo de se conectar com o quadro dos outros órgãos moduladores do SNS, e obtivemos um resultado positivo. Há na literatura um único trabalho controverso, que mostra uma redução da expressão da TH na glândula adrenal de ratos SHR⁶². Neste, o autor utilizou animais no momento do estabelecimento da HAS (6 semanas de idade) o que pode explicar a diferença encontrada. Nenhum outro grupo de pesquisa foi capaz de reproduzir os resultados deste trabalho, inclusive quando foram utilizadas outras técnicas, como RT-PCR⁷⁹, dando aos nossos resultados.

É notório que no tecido bulbar a diferença encontrada foi menos pronunciada que nas glândulas adrenais. Uma vez que a glândula adrenal não é um alvo farmacológico direto de nenhum destes medicamentos, tais resultados montam uma consistente rede de informações acerca da função simpática dos animais. Vê-se ainda que, na hierarquia do SNS, conforme os sinais se distanciam do plexo central há uma amplificação destes. Esta amplificação é natural em praticamente todos os sistemas, e a principal responsável pelo alcance do comando cerebral no resto do corpo. Na HAS, a hiperatividade simpática crônica parece ser uma disfunção central que acaba por afetar os mecanismos periféricos como o sistema renina-angiotensina e também o sistema imune. Mostrar cada vez mais o importante papel desta disfunção no desenvolvimento e manutenção da doença pode trazer novamente para o destaque os medicamentos de ação central, que andam, pelo menos no Brasil, fora do uso comum.

Fomos capazes de demonstrar que assim como os outros órgãos diretamente envolvidos na regulação do SNS, o sistema imune apresenta características e é igualmente afetado pela elevação da atividade simpática na hipertensão arterial. Ressalta-se que a quantificação absoluta da enzima não nos traz informações precisas a respeito do balanço entre produção, captação, secreção e degradação de CTs no sistema imune, apesar de não haver na literatura, nenhum trabalho que mostre um aumento na expressão enzimática e não mostre aumento na atividade. Ao contrário, quando a expressão está aumentada, a atividade acompanha, ou até supera, a elevação encontrada na expressão total da enzima.

Após os resultados obtidos na avaliação dos tecidos isolados, se faz necessária a correlação estatística entre os diferentes tecidos observados. Através da correlação entre os tais pode-se inferir a relação e o grau de dependência entre os diferentes pontos de regulação das catecolaminas plasmáticas estudados neste trabalho. E ao cotejar os dados obtidos

encontramos correlação positiva na expressão de TH nos órgãos da via, o bulbo e na supra-renal, de forma extremamente significativa. Ao correlacionarmos a expressão da TH nestes órgãos com os leucócitos periféricos, a correlação significativa ocorreu novamente, sendo encontrada em todos os grupos. Os três tecidos estudados apresentaram correlação entre si, no que diz respeito a expressão da tirosina hidroxilase, enzima chave na síntese de catecolaminas. A disposição dos diferentes grupos na reta gerada é de análise interessante: enquanto os animais WKY-VEI se concentram próximos à intersecção dos eixos, os animais SHR-VEI se concentram no ponto mais distante desta intersecção e os animais SHR-CLO e SHR-LOS se distribuem ao longo da reta, estando os SHR-CLO mais próximos do WKY-VEI e os SHR-LOS mais próximos dos SHR-VEI. Este padrão repetiu-se também nos três tecidos analisados. A interpretação destes fatos nos leva a crer que há uma intrínseca diferença na regulação destes órgãos no quadro hipertensivo, cujo tratamento farmacológico não foi capaz de reverter totalmente. Indo além, pode-se dizer que esta hiperatividade reflete-se de forma precisa nas células do sistema imune. É um ramo emergente de investigação a participação do sistema imune nos diferentes quadros hipertensivos. A participação destas células foi encontrada na gênese da hipertensão, no desenvolvimento de alterações vasculares^{80,81} e na lesão dos órgãos alvo⁸². Esta participação engloba apenas os aspectos da função inflamatória, tendo sido esta exaustivamente dissecada em busca de respostas de como ocorreria a demonstrada interação. Esta busca não foi totalmente infrutífera, e foram encontradas muitas citocinas cruciais no desenrolar do quadro patológico em diferentes modelos⁸³⁻⁸⁵. Uma pesquisa com o foco da por nós desenvolvida é um trabalho inédito e representa um novo rumo de investigação do sistema imune e da HAS como um todo. Observamos que não somente a função inflamatória pode ser relevante para o desenvolvimento patológico, mas que, antes mesmo dos eventos inflamatórios descritos nas referências acima citadas, podemos ter uma participação do SNS e uma intensa comunicação entre o SNS e o sistema

imune. Mais estudos são necessários para se avaliar possíveis diferenças na interação catecolaminas-leucócitos encontrada neste trabalho, não só nos quadros hipertensivos, como na síndrome metabólica e em muitas outras condições cuja hiperatividade simpática possui papel importante.

Em clínica é inviável obter amostras de bulbo ou de glândula suprarrenal de indivíduos hipertensos. Daí nosso interesse em verificar tais informações com as obtidas no plasma. Foi frustrante constatar que não houve correlação significativa entre os leucócitos periféricos e adrenalina. No entanto, uma vez que os tratamentos farmacológicos também não alteraram a quantidade circulante desta catecolamina, temos mais uma indicação de que a regulação deste hormônio está corrompida no quadro hipertensivo crônico. Considere-se também que as catecolaminas são rapidamente liberadas e/ou retiradas do plasma, motivo inclusive pelo qual são indicadores tão ruins. O quadro sistêmico pode ainda não se repetir em uma avaliação local, uma vez que diferentes sítios sofrem diferentes conseqüências do quadro hipertensivo de uma forma geral. Já foi abordado também na introdução que a noradrenalina seria a principal catecolamina de comunicação no sistema imune⁵⁵⁻⁵⁸, o que dá sentido ao resultado encontrado. Frisa-se mais uma vez que, a noradrenalina é o principal neurotransmissor do SNS. Surge então o seguinte cenário: o sistema imune, sistema que embora tenha sido implicado em centenas de situações, tem como função principal a defesa do organismo de agressões do meio. Para tal, este sistema precisa se comunicar de forma continuada com os outros sistemas do corpo, a fim de saber do curso de eventos prejudiciais e quando nos referimos a comunicação com o SNS, a catecolamina mais expressiva é a noradrenalina. Apesar de alguns autores se referirem ao sistema imune como um "órgão endócrino difuso"⁸⁶, esta pode ser uma visão equivocada, uma vez que não é função do sistema imune regular hormonalmente a atividade dos outros sistemas, apenas comunicar-se com estes sistemas e desenvolver as respostas e resoluções inflamatórias necessárias. Ao olharmos por esta ótica, nossos resultados

encaixam-se perfeitamente na condição patológica estudada. Seria de grande interesse ainda, uma vez que foi encontrada correlação significativa entre os leucócitos, a supra-renal e o bulbo, comparar nossos resultados com outras medidas mais precisas e diretas de atividade simpática. Vale lembrar que a correlação de Pearson não é uma ferramenta matemática perfeita e que, mesmo grandezas intimamente relacionadas podem apresentar uma correlação nula. Em nosso caso específico, são necessários estudos mais profundos para que se valide a utilização do sistema imune como referência de atividade simpática em indivíduos portadores da hipertensão arterial sistêmica.

6. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados indicam que os leucócitos podem ser um bom indicador da atividade simpática sistêmica na hipertensão arterial, embora estudos mais profundos, que comparem medidas mais diretas de atividade simpática e outros modelos de HAS, sejam necessários para validá-los como medida.

7. REFERÊNCIAS

1. Nefrologia. VI Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial.: Arq Bras Cardiol; 2010.
2. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002 Dec 14;360(9349):1903-13.
3. Cardiologia SBd. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão.: Arq Bras Cardiol; 2006. p. 1-48.
4. SUS. Estatísticas nacionais]. In: Indicadores de morbidade e fatores de risco. 2002-2005. Rio de Janeiro:
5. Muxfeldt ES, Nogueira Ada R, Salles GF, Bloch KV. Demographic and clinical characteristics of hypertensive patients in the internal medicine outpatient clinic of a university hospital in Rio de Janeiro. *Sao Paulo Med J*. 2004 May 6;122(3):87-93.
6. Almeida FA, Konigsfeld HP, Machado LM, Canadas AF, Issa EY, Giordano RH, et al. [Assessment of social and economic influences on blood pressure of adolescents in public and private schools: an epidemiological study]. *J Bras Nefrol*. 2011 Jun;33(2):142-9.
7. Organization W-WH. International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. 1999;17.
8. Martha N. Hill RN P, Nancy H. Miller RN, BSN, Sabina DeGeest RN, PhD. Adherence and Persistence With Taking Medication to Control High Blood Pressure. *J Clin Hypertens*. 2010;12:757-764.
9. Organization W-WH. International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *J Hypertens* 1999;17:151-185.
10. Suter PM, Sierro C, Vetter W. Nutritional factors in the control of blood pressure and hypertension. *Nutr Clin Care*. 2002 Jan-Feb;5(1):9-19.
11. Bernthal T. Chemo-reflex control of vascular reactions through the carotid body. *Am J Physiol*; 1938.
12. Gonzales C AL, Obeso A, Rigual and R. . Carotid body chemoreceptors: From natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev*. 1994;74(4):98.
13. Franchitto N, Despas F, Labrunee M, Roncalli J, Boveda S, Galinier M, et al. Tonic chemoreflex activation contributes to increased sympathetic nerve activity in heart failure-related anemia. *Hypertension*. 2010 Apr;55(4):1012-7.
14. Melo RM, Martinho E, Jr., Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension*. 2003 Oct;42(4):851-7.
15. Guyton AC HJ. Guyton & Hall: Textbook of Medical Physiology.: Elsevier Health Medicine ed; 2005.
16. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on Experimental Hypertension : I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. *J Exp Med*. 1934 Feb 28;59(3):347-79.
17. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963 Mar;27:282-93.
18. Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res*. 1998 Jul;39(1):77-88.
19. Oparil S. The sympathetic nervous system in clinical and experimental hypertension. *Kidney Int*. 1986 Sep;30(3):437-52.
20. Makaritsis KP, Johns C, Gavras I, Altman JD, Handy DE, Bresnahan MR, et al. Sympathoinhibitory function of the alpha(2A)-adrenergic receptor subtype. *Hypertension*. 1999 Sep;34(3):403-7.
21. Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, Desai KH, Bernstein D, Kobilka BK. Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem*. 1999 Jun 11;274(24):16694-700.
22. Joh TH, Hwang O. Dopamine beta-hydroxylase: biochemistry and molecular biology. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;493:342-50.

23. Bennett MR. One hundred years of adrenaline: the discovery of autoreceptors. *Clin Auton Res*. 1999 Jun;9(3):145-59.
24. Rang HD, M. M. *Farmacologia*. 6ª Edição ed: Elsevier - Campus.
25. Grassi G. Role of the sympathetic nervous system in human hypertension. *J Hypertens*. 1998 Dec;16(12 Pt 2):1979-87.
26. Grassi G, Mancia G. Neurogenic hypertension: is the enigma of its origin near the solution? *Hypertension*. 2004 Feb;43(2):154-5.
27. Amerena J, Julius S. The role of the autonomic nervous system in hypertension. *Hypertens Res*. 1995 Jun;18(2):99-110.
28. Sabino B, Lessa MA, Nascimento AR, Rodrigues CA, Henriques MG, Garzoni LR, et al. Effects of antihypertensive drugs on capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats: intravital microscopy and histologic analysis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008 Apr;51(4):402-9.
29. Heesch CM, Crandall ME, Turbek JA. Converting enzyme inhibitors cause pressure-independent resetting of baroreflex control of sympathetic outflow. *Am J Physiol*. 1996 Apr;270(4 Pt 2):R728-37.
30. Reaven GM, Lithell H, Landsberg L. Hypertension and associated metabolic abnormalities--the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl J Med*. 1996 Feb 8;334(6):374-81.
31. Esler M, Lambert G, Jennings G. Increased regional sympathetic nervous activity in human hypertension: causes and consequences. *J Hypertens Suppl*. 1990 Dec;8(7):S53-7.
32. Julius S. Changing role of the autonomic nervous system in human hypertension. *J Hypertens Suppl*. 1990 Dec;8(7):S59-65.
33. Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A, Mancia G. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension*. 1998 Jan;31(1):68-72.
34. Ruy Campos Júnior EC, Sérgio Cravo, Osvaldo Ubriano Lopes. Hipertensão arterial: o que tem a dizer o sistema nervoso. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2001;8:41-54.
35. Dominiczak GCEMFCGPAF. Disorders of Blood Pressure Regulation - Role of Catecholamine Biosynthesis, Release and Metabolism. *Curr Hypertens Rep*. 2012;14:38-45.
36. Julius S, Nesbitt S. Sympathetic overactivity in hypertension. A moving target. *Am J Hypertens*. 1996 Nov;9(11):113S-120S.
37. Mark AL. The sympathetic nervous system in hypertension: a potential long-term regulator of arterial pressure. *J Hypertens Suppl*. 1996 Dec;14(5):S159-65.
38. Sinski M, Lewandowski J, Abramczyk P, Narkiewicz K, Gaciong Z. Why study sympathetic nervous system? *J Physiol Pharmacol*. 2006 Nov;57 Suppl 11:79-92.
39. Smith S, Julius S, Jamerson K, Amerena J, Schork N. Hematocrit levels and physiologic factors in relationship to cardiovascular risk in Tecumseh, Michigan. *J Hypertens*. 1994 Apr;12(4):455-62.
40. Mancia G. Bjorn Folkow Award Lecture. The sympathetic nervous system in hypertension. *J Hypertens*. 1997 Dec;15(12 Pt 2):1553-65.
41. Esler M, Jennings G, Lambert G, Meredith I, Horne M, Eisenhofer G. Overflow of catecholamine neurotransmitters to the circulation: source, fate, and functions. *Physiol Rev*. 1990 Oct;70(4):963-85.
42. Esler M. The sympathetic system and hypertension. *Am J Hypertens*. 2000 Jun;13(6 Pt 2):99S-105S.
43. Kaye DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A, Esler MD. Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol*. 1995 Nov 1;26(5):1257-63.
44. Airaksinen KE, Tahvanainen KU, Kuusela TA, Huikuri HV, Niemela MJ, Karjalainen P, et al. Cross spectral analysis in assessment of baroreflex gain in patients with coronary artery disease. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 1997 Jul;2(3):229-35.
45. Vallbo AB, Hagbarth KE, Torebjork HE, Wallin BG. Somatosensory, proprioceptive, and sympathetic activity in human peripheral nerves. *Physiol Rev*. 1979 Oct;59(4):919-57.
46. Tibirica E MC, Feldman J, Gonon F, Bousquet P. Correlation between the inhibitory effect on catecholaminergic ventrolateral medullary neurons and the hypotension evoked by clonidine: a voltammetric approach. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;250(2):642-7.

47. Ganong WF. The renin-angiotensin system and the central nervous system. *Fed Proc.* 1977 Apr;36(5):1771-5.
48. von Bohlen und Halbach O. The renin-angiotensin system in the mammalian central nervous system. *Curr Protein Pept Sci.* 2005 Aug;6(4):355-71.
49. van Zwieten PA, Thoolen MJ, Timmermans PB. The hypotensive activity and side effects of methyl dopa, clonidine, and guanfacine. *Hypertension.* 1984 Sep-Oct;6(5 Pt 2):II28-33.
50. Tibirica E, Feldman J, Mermet C, Monassier L, Gonon F, Bousquet P. Selectivity of rilmenidine for the nucleus reticularis lateralis, a ventrolateral medullary structure containing imidazoline-preferring receptors. *Eur J Pharmacol.* 1991 Dec 17;209(3):213-21.
51. Spies CD, Dubisz N, Neumann T, Blum S, Muller C, Rommelspacher H, et al. Therapy of alcohol withdrawal syndrome in intensive care unit patients following trauma: results of a prospective, randomized trial. *Crit Care Med.* 1996 Mar;24(3):414-22.
52. Neil MJ. Clonidine: Clinical Pharmacology and Therapeutic Use in Pain Management. *Curr Clin Pharmacol.* 2011 Aug 9.
53. Loeper M CO. L'action de l'adrenaline sur le sang. *Arch. Med. Exp. Anat. Pathol.* 1904;16:83-108.
54. Musso NR BS, Setti M, Indiveri F, Lotti G. Catecholamine content and in vitro catecholamine synthesis in peripheral human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* . 1996;81(10):3553-7.
55. Cosentino M, Marino F, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage and uptake in human neutrophils. *Life Sci.* 1999;64(11):975-81.
56. Marino F, Cosentino M, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp Hematol.* 1999 Mar;27(3):489-95.
57. Cosentino M, Bombelli R, Ferrari M, Marino F, Rasini E, Maestroni GJ, et al. HPLC-ED measurement of endogenous catecholamines in human immune cells and hematopoietic cell lines. *Life Sci.* 2000 Dec 8;68(3):283-95.
58. Cosentino M, Fietta AM, Ferrari M, Rasini E, Bombelli R, Carcano E, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood.* 2007 Jan 15;109(2):632-42.
59. Josefsson E, Bergquist J, Ekman R, Tarkowski A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology.* 1996 May;88(1):140-6.
60. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature.* 2007 Oct 11;449(7163):721-5.
61. Leposavić G PI, Radojević K, Pešić V, Perišić M, Kosec D. Catecholamines as immunomodulators: a role for adrenoceptor-mediated mechanisms in fine tuning of T-cell development. *Auton Neurosci.* 2008;144(1-2):1-12.
62. Moura E, Afonso J, Serrao MP, Vieira-Coelho MA. Effect of clonidine on tyrosine hydroxylase activity in the adrenal medulla and brain of spontaneously hypertensive rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009 Feb;104(2):113-21.
63. Adamo SA. The effects of the stress response on immune function in invertebrates: An evolutionary perspective on an ancient connection. *Horm Behav.* 2012 Feb 21.
64. Costa-Pinto FA, Palermo-Neto J. Neuroimmune interactions in stress. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17(3):196-9.
65. Xiang L, Del Ben KS, Rehm KE, Marshall GD, Jr. Effects of acute stress-induced immunomodulation on TH1/TH2 cytokine and catecholamine receptor expression in human peripheral blood cells. *Neuropsychobiology.* 2012;65(1):12-9.
66. Shahabi S, Hassan ZM, Jazani NH, Ebtekar M. Sympathetic nervous system plays an important role in the relationship between immune mediated diseases. *Med Hypotheses.* 2006;67(4):900-3.
67. Gallet C, Chapuis B, Barres C, Julien C. Time-frequency analysis of the baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in the rat. *J Neurosci Methods.* 2011 Jun 15;198(2):336-43.

68. Katia Burgi MTC, Adilson S. Alves, Luiz R. G. Britto, Vagner R. Antunes,, Michelini aLC. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;300:264-271.
69. Lundin S, Ricksten SE, Thoren P. Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. *Acta Physiol Scand*. 1984 Feb;120(2):265-72.
70. Szabo B. Imidazoline antihypertensive drugs: a critical review on their mechanism of action. *Pharmacol Ther*. 2002 Jan;93(1):1-35.
71. Saavedra JM. Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol*. 2005 Jun;25(3-4):485-512.
72. Miles PR, Mundorf ML, Wightman RM. Release and uptake of catecholamines in the bed nucleus of the stria terminalis measured in the mouse brain slice. *Synapse*. 2002 Jun 1;44(3):188-97.
73. Morrison SF, Callaway J, Milner TA, Reis DJ. Rostral ventrolateral medulla: a source of the glutamatergic innervation of the sympathetic intermediolateral nucleus. *Brain Res*. 1991 Oct 18;562(1):126-35.
74. Bencsics A, Sershen H, Baranyi M, Hashim A, Lajtha A, Vizi ES. Dopamine, as well as norepinephrine, is a link between noradrenergic nerve terminals and splenocytes. *Brain Res*. 1997 Jul 4;761(2):236-43.
75. WALTER RAASCH BJ, ULRICH SCHÄFER, WALTER HÄUSER, AND PETER DOMINIÁK. Norepinephrine Release Is Reduced by I1-Receptors in Addition to α 2-Adrenoceptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2003;1009:270-273.
76. Francischetti EA, Tibirica E, da Silva EG, Rodrigues E, Celia BM, de Abreu VG. Skin capillary density and microvascular reactivity in obese subjects with and without metabolic syndrome. *Microvasc Res*. 2011 May;81(3):325-30.
77. Nascimento AR, Lessa MA, Sabino B, Bousquet P, Tibirica E. Microvascular effects of centrally acting antihypertensive drugs in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010 Mar;55(3):240-7.
78. Rao F, Zhang L, Wessel J, Zhang K, Wen G, Kennedy BP, et al. 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*. 2007 Aug 28;116(9):993-1006.
79. Reja V, Goodchild AK, Phillips JK, Pilowsky PM. Tyrosine hydroxylase gene expression in ventrolateral medulla oblongata of WKY and SHR: a quantitative real-time polymerase chain reaction study. *Auton Neurosci*. 2002 Jun 28;98(1-2):79-84.
80. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007 Oct 1;204(10):2449-60.
81. Tamosiuniene R, Tian W, Dhillon G, Wang L, Sung YK, Gera L, et al. Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2011 Sep 30;109(8):867-79.
82. Muller DN, Kvakan H, Luft FC. Immune-related effects in hypertension and target-organ damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011 Mar;20(2):113-7.
83. Tran LT, MacLeod KM, McNeill JH. Chronic etanercept treatment prevents the development of hypertension in fructose-fed rats. *Mol Cell Biochem*. 2009 Oct;330(1-2):219-28.
84. Elmarakby AA, Quigley JE, Imig JD, Pollock JS, Pollock DM. TNF-alpha inhibition reduces renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Jan;294(1):R76-83.
85. Schrader LI, Kinzenbaw DA, Johnson AW, Faraci FM, Didion SP. IL-6 deficiency protects against angiotensin II induced endothelial dysfunction and hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Dec;27(12):2576-81.

86. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang M, Sarma JV, Ward PA. Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Mol Med*. 2008 Mar-Apr;14(3-4):195-204.