

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ATALIA FERREIRA DE LIMA FLÔR

ESTUDO DOS MECANISMOS GLUTAMATÉRGICOS ASTROGLIAIS DO
BULBO E HIPOTÁLAMO NA MODULAÇÃO CARDIOVASCULAR EM RATOS
COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

Tese de Doutorado

JOÃO PESSOA-PB

2021

ATALIA FERREIRA DE LIMA FLÔR

**ESTUDO DOS MECANISMOS GLUTAMATÉRGICOS ASTROGLIAIS DO
BULBO E HIPOTÁLAMO NA MODULAÇÃO CARDIOVASCULAR EM RATOS
COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Multicêntrico em Ciências Fisiológicas / UFPB - SBFis,
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: Ciências Fisiológicas

Orientadora: Profa Dra Josiane de Campos Cruz

JOÃO PESSOA-PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F632e Flôr, Atalia Ferreira de Lima.

Estudo dos mecanismos glutamatérgicos astrogliais do bulbo e hipotálamo na modulação cardiovascular em ratos com hipertensão renovascular / Atalia Ferreira de Lima Flôr. - João Pessoa, 2021.
261 f. : il.

Orientação: Josiane de Campos Cruz.
Tese (Doutorado) - UFPB/CBiotec.

1. Fisiologia - Sistema nervoso. 2. Astrócitos. 3. Bulbo. 4. Angiotensina. 5. Hipertensão arterial. I. Cruz, Josiane de Campos. II. Título.

UFPB/BC

CDU 612.8:616.12-008.331.1(043)

FICHA DE APROVAÇÃO

Aluna: Atalia Ferreira de Lima Flôr

Título: **ESTUDO DOS MECANISMOS GLUTAMATÉRGICOS ASTROGLIAIS DO BULBO E HIPOTÁLAMO NA MODULAÇÃO CARDIOVASCULAR EM RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas / UFPB - SBFis, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Ciências Fisiológicas.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

Instituição: ICB / USP

Assinatura:



Profa. Dra. Maria do Socorro de França Falcão

Instituição: CBIotec / UFPB

Assinatura:



Profa. Dra. Renata Maria Lataro

Instituição: CCB / UFSC

Assinatura:



Documento assinado digitalmente

Renata Maria Lataro

Data: 10/12/2021 09:56:50-0300

CPF: 012.401.826-27

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz

Instituição: CAV / UFPE

Assinatura:



JOÃO PESSOA-PB

2021

*Ao meu mimo do céu, Marie Valentine Flôr;
Sua existência trouxe sentido a toda minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre me ouviu nos momentos em que eu, em silêncio, orava. Porque mesmo diante dos desafios, ele nunca me deixou desistir dos meus sonhos ou abandonar as minhas esperanças.

Aos meus pais, Onã e Terezinha, que mais do que me proporcionar uma boa infância e vida acadêmica, moldaram os fundamentos do caráter que hoje tenho e me orgulho. Em especial a minha querida mãe, que por vezes sorria e sofria com minhas conquistas e desenganos, mas que sempre me estimulou a lutar e a nunca desistir do futuro que eu desejo. Seu espírito guerreiro e materno sempre será meu maior exemplo.

Ao meu esposo, Felipe, um amigo improvável que Deus moldou à sua maneira para ser meu maior companheiro e me fazer feliz. Te amo!

À minha filha amada, Marrie Valentine, sua chegada me trouxe um sentimento que não cabe em mim, que transborda e me faz, a cada dia, querer ser melhor para você. Te amo!

À minha outra família, Ivanize, Airton e Fernanda, vocês são uns dos melhores presentes que Deus me deu. Obrigada sempre pelo apoio constante, pela acolhida e pelo amor de vocês.

À minha querida Orientadora, Profa Josiane Cruz, uma das pessoas mais competentes das quais tive o prazer de trabalhar. Que apertou minha mão nos

momentos difíceis e não desistiu de mim. O meu mais profundo afeto, agradecimento e admiração.

Às técnicas do nosso laboratório LACONCHA, Clênia e Sara, e aos demais Professores da área de Fisiologia do Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB – Profa Camille, Profa Maria de Socorro, Prof José Luiz, Profa Juliana e especialmente ao Prof Valdir Braga pela coorientação e por todo o suporte laboral que nos proporcionou no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores José Antunes-Rodrigues e Lucila Leico Kagohara Elias, especialmente à Dra. Gislaine Almeida-Pereira por todo o treinamento com a técnica de *Western Blotting* e pela amizade sincera nos bons e maus momentos.

Ao Professor Hélio César Salgado do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP pelo auxílio e apoio com outros trabalhos que desenvolvi nesse período do doutorado. À Profa Renata Maria Lataro do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina/SC por me ensinar com excelência e gentileza a técnica cirúrgica de ligadura da coronária para outros trabalhos correlatos, que desenvolvi nesse período do doutorado.

Aos técnicos Val, Milene, Jaci, Carlos Alberto e Rubens dos laboratórios do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP por todo suporte técnico e laboratorial.

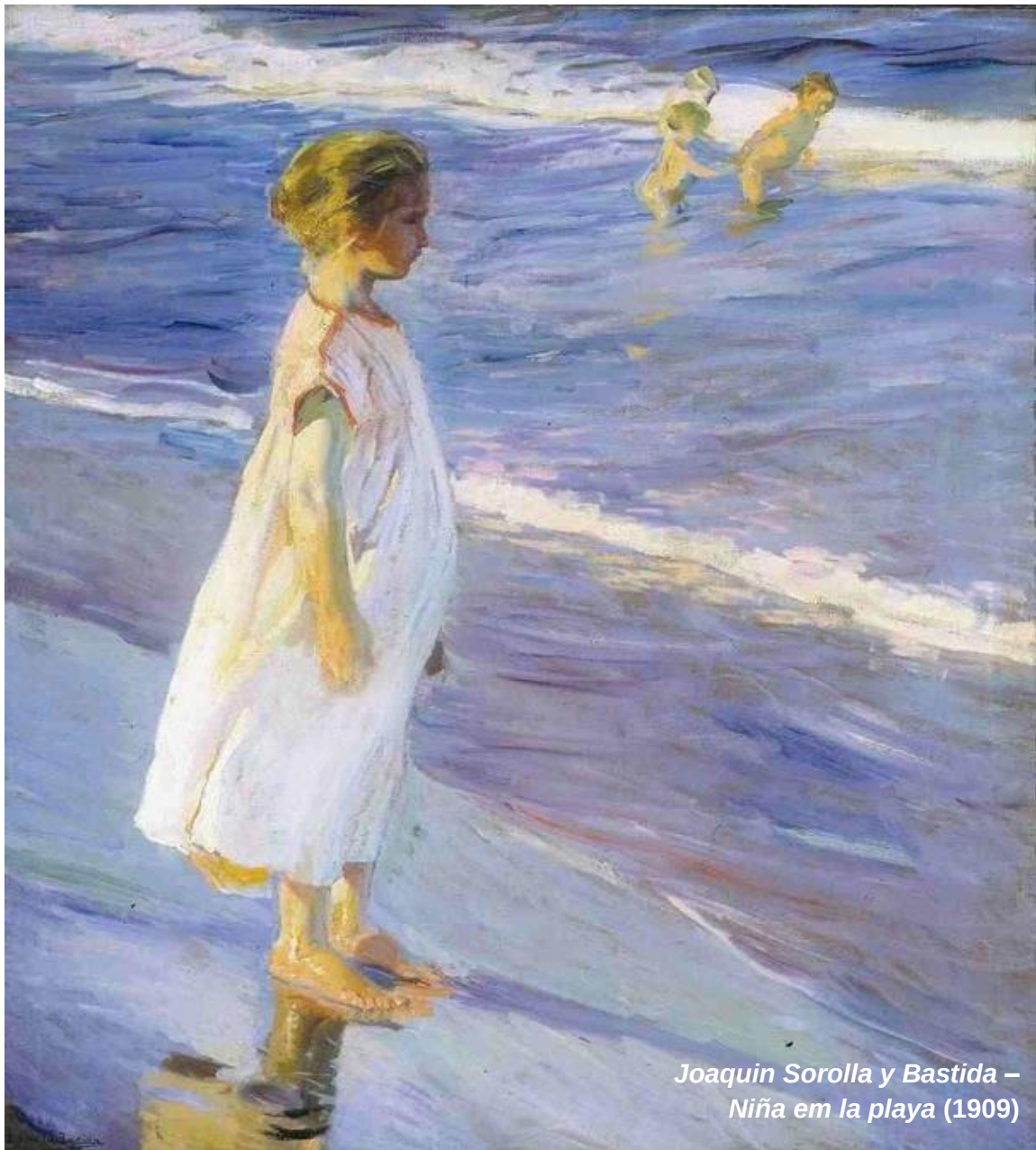
Aos meus colegas de Pós Érica, Clara, Lucas, Júnior, Francineide, Rayane, Ivanildo, Airla, Patrícia, Clênia, Fany, Dayse e Larissa. Especialmente à Érica e à Clara, vocês são duas joias que ganhei com a pós graduação.

Aos meus amigos do laboratório Brenda, Guilherme, João, Samuel, Rayanelly, Juliana e a todos os alunos de iniciação científica pelo carinho e apoio direto ou indireto.

A todos os demais professores da Pós de Fisiologia: Prof Ian Porto, Profa Tatjana Keesen, Profa Sandra Mascarenhas, Profa Fabíola Nunes e à Dayana, secretária do nosso programa multicêntrico na UFPB.

À minha banca do exame de qualificação Prof Vagner Antunes, Prof José Luiz e Prof Francisco Júnior pelas contribuições valiosas à versão final do meu trabalho. Além dos conselhos dados no decorrer da minha pós-graduação em conversas informais, reuniões, simpósios, congressos e outros. Muito obrigado!

Aos órgãos de fomento, CAPES e CNPq, sem os quais muito não seria concretizado. Especialmente a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.



*Joaquín Sorolla y Bastida –
Niña en la playa (1909)*

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos”.

Isaac Newton

APOIO FINANCEIRO
PVE/CAPES 8888.1.062209/2014.1.

CNPq 161260/2015-2

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2R1C	Modelo experimental 2 Rins - 1 Clipe
2R1C/LOS	Modelo experimental 2Rins-1Clipe tratado com Losartana
4V	Quarto ventrículo cerebral
Ang-II	Angiotensina II
AT1R	Receptor de Angiotensina tipo 1
BHE	Barreira hematoencefálica
Dahl	Ratos geneticamente sensíveis à ingestão de sódio
DHK	Dihidrokalainato
DOCA	Acetato de desoxicorticosterona
DOCA-Sal	Acetato de desoxicorticosterona e NaCl
EAAT's	Transportadores de aminoácidos excitatórios
ECA	Enzima conversora de Angiotensina I
FC	Frequência Cardíaca
FCA	Fluoroacetato
FCt	Fluorocitrato
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein
GLAST/EAAT1	Transportadores de aminoácidos excitatórios de glutamato-aspartato / Transportador de Aminoácidos Excitatório 1
Gln	Glutamina
GLT1/EAAT2	Transportador de Glutamato do Tipo 1/ Transportador de Aminoácidos Excitatório 2
Glu	Glutamato
GS	Glutamina Sintetase

HA	Hipertensão Arterial
HRv	Hipertensão Renovascular
ICM	Intracisterna Magna
ICV	Via Intracerebroventricular
L-AAA	Ácido L- α -aminoadípico
m/iGLUR	Receptor de glutamato metabotrópico / ionotrópico
NTS	Núcleo do Trato Solitário
PA	Pressão Arterial
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PC	Peso corporal
PRD	Peso do rim direito
PRE	Peso do rim esquerdo
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RPR	Receptor de Pró-Renina
RVLM	Bulbo Ventrolateral Rostral
SFO	Órgão Subfornicial
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SLC1 a 3	Genes que codificam para os transportadores EAAT's
SNC	Sistema Nervoso Central
SRA	Sistema renina-angiotensina
TGR mRen2	Ratos transgênicos para o gene da renina

Demais siglas ou abreviações não citadas aqui acompanha seu respectivo significado no texto.

LISTA DE FIGURAS

Figura I Condução esquemática mostrando as fases de desenvolvimento da HRV (Hipertensão de Goldblatt) experimental ou clínica (Adaptado de MARTINEZ-MALDONADO, 1991)..... 29

Figura II |Na hipertensão, a super ativação do SRA periférico resulta em aumento na concentração da Ang-II plasmática (1), a qual promove ativação de núcleos centrais desprovidos de BHE envolvidos com a modulação cardiovascular, tais como o SFO (2). Nessa condição, há um aumento na permeabilidade da BHE, permitindo que a ANG-II plasmática ative neurônios hipotalâmicos (PVN) e bulbares (RVLM e NTS) envolvidos com a modulação e da atividade simpática e cardiovascular (3) ^{74,76}. Ang-II: Angiotensina II, ECA: Enzima conversora de Ang-II, ROS: Espécies reativas de oxigênio, SFO: Órgão subfornicial, PVN: Núcleo paraventricular, NTS: Núcleo do trato solitário, RVLM: Bulbo ventral rostral, BHE: Barreira hematoencefálica, MIL: Medula intermediolateral. Fonte: Autor. 35

Figura III: Participação dos astrócitos e da Ang-II na modulação das sinapses glutamatérgicas. Nas terminações pré-sinápticas (em azul), a glutaminase converte a glutamina em glutamato, o qual é armazenado em vesículas para ser liberado na fenda sináptica. Na região da fenda sináptica o glutamato atua em receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos dos neurônios pós-sinápticos (em vermelho). Os astrócitos próximos às sinapses (em amarelo) previnem a superativação neural pela ativação adicional dos receptores extrasinápticos de glutamato através da: a) recaptação do glutamato extrasináptico feito pelos EAAT's – GLT1 e GLAST, b) conversão do glutamato em glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS), e c) redução da comunicação neuronal para difusão de neurotransmissores através da polimerização do citoesqueleto astrocítico (GFAP). A Ang-II prejudica a recaptação de glutamato pelos astrócitos aumentando assim a disponibilidade do glutamato no espaço extracelular e consequente aumento da excitabilidade do neurônio pós-sináptico ^{17,69,82}. Fonte: Autor..... 38

Figura IV | Ilustração de um corte sagital do cérebro de um rato, evidenciando a localização anatômica no espaço da região da cisterna magna na região bulbar, em detalhe a coordenada DV (- 14,5mm) a partir do Bregma utilizada para a introdução da cânula-guia. 4V- 4º ventrículo; NTS- núcleo do trato solitário, RVLM- bulbo ventrolateral rostral, DV- dorso-ventral. Fonte: Autor..... 49

Figura 1 | Pressão de cauda (sistólica; PAS, mmHg) por pletismografia de cauda antes (Semana zero) e após 6 semanas da cirurgia de SHAM e 2R1C. Os dados foram analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo teste de Tukey e expressos como MÉDIAS ± EPM. * $p < 0,05$ vs. semana 0. # $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C na semana 6. 65

Figura 2 | Valores basais da PAM [(mmHg) Painel A] e FC [(bpm) Painel B] de ratos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS (30mg/kg/ml/dia durante 4 semanas) não anestesiados. Os

dados foram analisados pelo ANOVA One-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey e expressos como MÉDIAS $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ vs. grupo SHAM; # $p < 0.05$ vs. grupo 2R1C. 68

Figura 3 | Traçados cardiovasculares representativos de um rato não anestesiado dos grupos SHAM (n=8), 2R1C (n=5) e 2R1C/LOS (n=8), mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) basais após a microinjeção ICM de solução salina (NaCl 0,15 M/5 μ L). As setas indicam a microinjeção de salina nos diferentes animais. 71

Figura 4 | Alterações na pressão arterial média (PAM, mmHg) promovidas pela microinjeção ICM de solução salina (NaCl 0,15M) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da PAM basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da resposta pressora (Δ PAM, mmHg) após a microinjeção. *Painel C:* Valores da PAM basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D:* Média da variação da resposta pressora (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. $\dagger p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C. 72

Figura 5 | Alterações na frequência cardíaca (FC, bpm) promovidas pela microinjeção ICM de solução salina (NaCl 0,15M) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da FC basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da resposta bradicárdica (Δ FC, bpm) após a microinjeção. *Painel C:* Valores da FC basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D:* Média da variação da resposta bradicárdica (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM; $\dagger p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C. 73

Figura 6 | Traçados cardiovasculares representativos de um rato não anestesiado dos grupos SHAM (n=8), 2R1C (n=5) e 2R1C/LOS (n=8), mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) basais após a microinjeção ICM de DHK (1mM/ 5 μ L). As setas indicam a microinjeção ICM de DHK nos diferentes animais. 76

Figura 7 | Alterações na pressão arterial média (PAM, mmHg) promovidas pela microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da PAM basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da resposta pressora (Δ PAM, mmHg) após a microinjeção. *Painel C:* Valores da PAM basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D:* Média da variação da resposta pressora (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. $\dagger p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C. 77

Figura 8 | Alterações na frequência cardíaca (FC, bpm) promovidas pela microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da FC basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da

resposta bradicárdica (ΔFC , bpm) após a microinjeção. *Painel C*: Valores da FC basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D*: Média da variação da resposta bradicárdica (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. † $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C..... 78

Figura 9| Traçados dos registros cardiovasculares, representativos de um rato dos grupos SHAM (n=8), 2R1C (n=5) e 2R1C/LOS (n=8), mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) basais após a microinjeção ICM de L-AAA (2mM/ 5 μ L). As setas indicam a microinjeção de L-AAA nos diferentes animais..... 81

Figura 10 | Alterações na pressão arterial média (PAM, mmHg) promovidas pela microinjeção ICM de L-AAA (2 mM) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A*: Valores da PAM basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B*: Variação da resposta pressora (ΔPAM , mmHg) após a microinjeção. *Painel C*: Valores da PAM basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D*: Média da variação da resposta pressora (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. † $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C. 82

Figura 11 | Alterações na frequência cardíaca (FC, bpm) promovidas pela microinjeção ICM de L-AAA (2 mM) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A*: Valores da FC basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B*: Variação da resposta bradicárdica (ΔFC , bpm) após a microinjeção. *Painel C*: Valores da FC basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D*: Média da variação da resposta bradicárdica (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. † $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C..... 83

Figura 12| Traçados cardiovasculares representativos de ratos dos grupos SHAM (n=8), 2R1C (n=5) e 2R1C/LOS (n=8), mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) basais após a microinjeção ICM de FCt (0,2mM/ 5 μ L). As setas indicam a microinjeção de FCt nos diferentes animais. 86

Figura 13| Alterações na pressão arterial média (PAM, mmHg) promovidas pela microinjeção ICM de FCt (0,2 mM) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A*: Valores da PAM basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B*: Variação da resposta pressora (ΔPAM , mmHg) após a microinjeção. *Painel C*: Valores da PAM basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D*: Média da variação da resposta pressora (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. † $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C. 87

Figura 14 | Alterações na frequência cardíaca (FC, bpm) promovidas pela microinjeção ICM de FCt (0,2 mM) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da FC basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da resposta bradicárdica (Δ FC, bpm) após a microinjeção. *Painel C:* Valores da FC basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D:* Média da variação da resposta bradicárdica (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. † $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C..... 88

Figura 15| Fotomicrografias das porções dorsal (painel A), ventral (painel B) e lateral (painel C) mostrando o sítio anatômico da fixação do corante azul de Evans 2% na região do bulbo com um aumento de 4X, por meio da microinjeção intracisterna magna (ICM). 89

Figura 16| Expressão proteica do citoesqueleto astrocítico [(GFAP) *Painel A*], dos transportadores de glutamato astrocíticos [GLT1/EAAT2 (*Painel B*) e GLAST/EAAT1(*Painel C*)] e da glutamina sintetase [(GS) *Painel D*] na região do NTS nos grupos SHAM e 2R1C. Os dados foram expressos como MÉDIAS $\pm$ EPM e comparados pelo teste *t-student*, não pareado. * $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. 93

Figura 17| Expressão proteica do citoesqueleto astrocítico [(GFAP) *Painel A*], dos transportadores de glutamato astrocíticos [GLT1/EAAT2 (*Painel B*) e GLAST/EAAT1(*Painel C*)] e da glutamina sintetase [(GS) *Painel D*] na região do RVLM nos grupos SHAM e 2R1C. Os dados foram expressos como MÉDIAS $\pm$ EPM e comparados pelo teste *t-student*, não pareado. * $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. 95

Figura 18| Expressão proteica do citoesqueleto astrocítico [(GFAP) *Painel A*], dos transportadores de glutamato astrocíticos [GLT1/EAAT2 (*Painel B*) e GLAST/EAAT1(*Painel C*)] e da glutamina sintetase [(GS) *Painel D*] na região do SFO nos grupos SHAM e 2R1C. Os dados foram expressos como MÉDIAS $\pm$ EPM e comparados pelo teste *t-student*, não pareado. * $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. 97

Figura 19| Expressão proteica do citoesqueleto astrocítico [(GFAP) *Painel A*], dos transportadores de glutamato astrocíticos [GLT1/EAAT2 (*Painel B*) e GLAST/EAAT1(*Painel C*)] e da glutamina sintetase [(GS) *Painel D*] na região do PVN nos grupos SHAM e 2R1C. Os dados foram expressos como MÉDIAS $\pm$ EPM e comparados pelo teste *t-student*, não pareado. * $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. 99

Figura 20| Expressão proteica do citoesqueleto astrocítico [(GFAP) *Painel A*], dos transportadores de glutamato astrocíticos [GLT1/EAAT2 (*Painel B*) e GLAST/EAAT1(*Painel C*)] e da glutamina sintetase [(GS) *Painel D*] na região do Córtex nos grupos SHAM e 2R1C. Os dados foram expressos como MÉDIAS $\pm$ EPM e comparados pelo teste *t-student*, não pareado. * $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. 101

Figura A 1| Alterações na pressão arterial sistólica [PAS, mmHg (*Painéis A e B*)] e diastólica [PAD, mmHg (*Painéis C e D*)] após a microinjeção ICM de solução de salina (NaCl 0,15 M) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. Dados analisados pelo ANOVA

Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. *Tempo 0*; # $p < 0,05$ vs. *grupo SHAM*; $\dagger p < 0,05$ vs. *Grupo 2R1C*. 175

Figura A 2| Alterações na pressão arterial sistólica [PAS, mmHg (*Painéis A e B*)] e diastólica [PAD, mmHg (*Painéis C e D*)] após a microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. Dados analisados pelo ANOVA *Two-Way*; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. *Tempo 0*; # $p < 0,05$ vs. *grupo SHAM*; $\dagger p < 0,05$ vs. *Grupo 2R1C*. 181

Figura A 3| Alterações na pressão arterial sistólica [PAS, mmHg (*Painéis A e B*)] e diastólica [PAD, mmHg (*Painéis C e D*)] após a microinjeção ICM de L-AAA (2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. Dados analisados pelo ANOVA *Two-Way*; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. *Tempo 0*; # $p < 0,05$ vs. *grupo SHAM*; $\dagger p < 0,05$ vs. *Grupo 2R1C*. 187

Figura A 4| Alterações na pressão arterial sistólica [PAS, mmHg (*Painéis A e B*)] e diastólica [PAD, mmHg (*Painéis C e D*)] após a microinjeção ICM de FCt (0,2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. Dados analisados pelo ANOVA *Two-Way*; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. *Tempo 0*; # $p < 0,05$ vs. *grupo SHAM*; $\dagger p < 0,05$ vs. *Grupo 2R1C*. 193

LISTA DE TABELAS

Tabela II | Parâmetros antropométricos e cardiovasculares dos diferentes grupos submetidos à quantificação proteica por *Western Blotting*. 91

Tabela III | Coeficientes de correlação (r) e os valores P das equações de regressão correlacionando a expressão dos diferentes marcadores da atividade astrogliar (GFAP, GLT1, GLAST e GS) no NTS e RVLM com a PAS (mmHg) dos animais SHAM e 2R1C. 103

Tabela A 1 | Valores expressos da pressão arterial média (PAM, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de solução salina (NaCl 0,15M) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 173

Tabela A 2 | Valores expressos da frequência cardíaca (FC, bpm) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de solução salina (NaCl 0,15M) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 174

Tabela A 3 | Valores expressos da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de salina (0,15M) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 176

Tabela A 4 | Valores expressos da pressão arterial diastólica (PAD, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de salina (0,15 M) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 177

Tabela A 5 | Valores expressos da pressão arterial média (PAM, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 179

Tabela A 6 | Valores expressos da frequência cardíaca (FC, bpm) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. . 180

Tabela A 7 | Valores expressos da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 182

Tabela A 8 | Valores expressos da pressão arterial diastólica (PAD, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 183

Tabela A 9 | Valores expressos da pressão arterial média (PAM, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de L-AAA (2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 185

Tabela A 10 | Valores expressos da pressão arterial média (PAM, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de L-AAA (2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 186

Tabela A 11 | Valores expressos da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de L-AAA (2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 188

Tabela A 12 | Valores expressos da pressão arterial diastólica (PAD, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de L-AAA (2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 189

Tabela A 13 | Valores expressos da pressão arterial média (PAM, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de FcT (0,2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 191

Tabela A 14 | Valores expressos da frequência cardíaca (FC, bpm) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de FcT (0,2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 192

Tabela A 15 | Valores expressos da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de FcT (0,2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 194

Tabela A 16 | Valores expressos da pressão arterial diastólica (PAD, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de FcT (0,2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. 195

Resumo|

Os Astrócitos modulam a atividade neuronal por meio de diferentes mecanismos, incluindo a recaptação de neurotransmissores do meio extracelular. Sabe-se que na hipertensão renovascular (HRv) há aumento na liberação do glutamato por neurônios de núcleos bulbares envolvidos com a modulação cardiovascular, contribuindo para o aumento da atividade de neurônios pré-simpáticos. Entretanto, pouco se sabe sobre a participação dos astrócitos na recaptação e conversão do glutamato na região do bulbo de ratos hipertensos. O objetivo deste estudo foi analisar a participação dos astrócitos na recaptação e reciclagem do glutamato no bulbo e no hipotálamo de ratos com HRv. Para tanto, realizamos o implante de cânula-guia na região intracisterna magna (ICM) de ratos normotensos e com HRv (pelo modelo 2 Rins -1 Clipe / 2R1C) para a realização das microinjeções: a) do Inibidor do transportador de glutamato astrocítico GLT1 [DHK (1 mM)], b) do inibidor da glutamina sintetase astrocítica [L-AAA (2 mM)] e c) da gliotoxina fluorocitrato [FCt (0,2 mM)]. Um grupo de animais com 2R1C foi tratado com Losartanaa (antagonista AT1) por gavagem na dose de 30mg/kg/dia durante 4 semanas após o período de estabilização do quadro hipertensivo. Para os estudos *in vitro*, realizamos, por meio da técnica de *western blotting*, a análise da expressão proteica do citoesqueleto astrocítico - *glial fibrillary acid protein* - (GFAP), dos recaptadores de glutamato (GLT1 e GLAST) e da enzima glutamina sintetase (GS) das regiões do órgão subfornicial (SFO), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), bulbo ventrolateral rostral (RVLM), núcleo do trato solitário (NTS) e Córtex. Nossos resultados mostraram que a inibição dos transportadores de glutamato astrocíticos com o DHK ou a inibição da enzima GS com a L-AAA ICM não promoveu alterações cardiovasculares significativas entre os animais dos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. Entretanto, a inibição da atividade da glia com o FCt ICM promoveu aumento significativo pontual na pressão arterial média (PAM) dos animais 2R1C, mas não nos animais SHAM ou 2R1C/LOS. A análise da expressão proteica no bulbo mostrou que os animais hipertensos apresentaram redução da expressão dos transportadores GLT1 e GLAST no RVLM, bem como redução na expressão de GFAP e da GS no NTS e no RVLM. Na região do hipotálamo, observamos redução na expressão proteica do transportador GLAST no SFO e aumento na expressão de GFAP no PVN dos animais hipertensos. Nossos resultados mostraram que os transportadores de glutamato astrocíticos e a GS da superfície bulbar parecem não estar envolvidos com a modulação cardiovascular de animais normotensos ou 2R1C. Entretanto, a glia parece estar envolvida com a modulação da PAM nesta fisiopatologia. Além disso, nossos estudos *in vitro* mostraram alterações na expressão proteica de diferentes marcadores da atividade astrocítica nos núcleos bulbares (NTS e RVLM) e hipotalâmicos (SFO e PVN) de animais 2R1C. Nesse sentido, nossos estudos sugerem a participação das células da glia na modulação da pressão arterial na HRv, contudo são necessários estudos adicionais, para melhor compreendermos a participação dos astrócitos na modulação cardiovascular em ratos hipertensos.

Palavras-Chave: Astrócitos, Bulbo, Angiotensina II, Hipertensão renovascular.

Abstract|

Astrocytic cells modulate neuronal activity, including glutamate uptake from the extracellular environment. In renovascular hypertension (HRv) there is an increase in released glutamate by neurons in brainstem nuclei involved in the cardiovascular modulation, contributing to increasing pre-sympathetic neurons activity. However, it is not clear about the involvement of the astrocytes in the extracellular glutamate uptake and recycling in hypertension. This study aimed to analyze the astroglial participation in the uptake and glutamate recycling in the brainstem and hypothalamus in HRv rats. For this purpose, we performed guide-cannula implantation intracisterna magna (ICM) in SHAM and 2K1C rats (HRv model) for microinjections of: a) astrocytic glutamate transporter EAAT2 / GLT1 inhibitor [DHK (1mM)], b) astrocytic glutamine synthetase inhibitor [L-AAA (2mM)] and c) gliotoxin fluorocitrate [FCt (0.2mM)]. One group of animals (2K1C/LOS) was treated with Losartana (AT1 antagonist) by gavage at a dose of 30 mg/kg/day for 4 weeks. After femoral artery catheterization, we made cardiovascular measurements. For *in vitro* studies, we analyzed by western blotting the astrocytic cytoskeleton - glial fibrillary acid protein - (GFAP), the glutamate receptors (EAAT2 / GLT1 and EAAT1 / GLAST) and the enzyme glutamine synthetase (GS) protein expression. into subfornical organ (SFO), paraventricular nucleus (PVN), rostral ventrolateral brainstem (RVLM), solitary tract nucleus (NTS) and cortex (control area) regions. Our results showed that DHK, or L-AAA ICM microinjection did not change baseline MAP (mmHg) or HR (bpm) in SHAM, 2K1C or 2K1C/LOS groups. FCt ICM microinjection promoted an increase in MAP (mmHg) in the 2K1C group, but not SHAM or 2K1C/LOS. The western blotting analysis showed that in the RVLM a reduction in the GLT1 / EAAT2 and GLAST / EAAT1 transporters expression in the 2K1C. There was also a decrease in the GFAP and GS expression into NTS and RVLM of 2K1C rats. In addition, we observed a reduction in the GLAST / EAAT1 transporter expression into SFO and an increase in GFAP expression into PVN of 2K1C animals. Our results showed that inhibition of astrocytic glutamate transporters or GS on bulbar surface does not seem to be involved in the cardiovascular modulation in normotensive or 2K1C rats. However, glia appears to be involved with BP modulation in HRv. Furthermore, our *in vitro* studies showed HRv induce changes in the expression of different astrocytic protein in the brainstem hypothalamic nuclei involved with the cardiovascular modulation. In that regards, our studies suggest the involvement of glial cells in the modulation of blood pressure in HRv. However further studies are needed to better understand the participation of astrocytes to modulate cardiovascular function in hypertensive rats.

Keywords: Astrocytes, Brainstem, Angiotensin II, Renovascular hypertension.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
1.1	HIPERTENSÃO RENOVASCULAR (HRV): CONTEXTO HISTÓRICO E FASES TEMPORAIS ...	27
1.2	VIAS ANGIOTENSINÉRGICAS CENTRAIS	30
1.3	ANG-II E MECANISMOS GLUTAMATÉRGICOS	34
1.4	INTERAÇÃO ENTRE ASTRÓCITOS E A ANG-II NA MODULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E ATIVIDADE SIMPÁTICA	40
2	OBJETIVOS	44
2.1	OBJETIVO GERAL	44
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3	MATERIAIS & MÉTODOS	46
3.1	ANIMAIS	46
3.2	CIRURGIA 2 RINS 1 CLIPE (2R1C) PARA A INDUÇÃO DA HRV:	46
3.3	PLETISMOGRAFIA DE CAUDA:	47
3.4	ESTEREOTAXIA INTRACISTERNA MAGNA (ICM):	48
3.5	DILUIÇÃO E MICROINJEÇÕES DE FÁRMACOS ICM:	50
3.6	CATETERIZAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL:	50
3.7	REGISTRO SIMULTÂNEO DA PA E FC (ABORDAGEM <i>IN VIVO</i>):	51
3.8	ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES:	52
3.9	FÁRMACOS E SOLUÇÕES UTILIZADAS:	52
3.10	PESAGEM CORPORAL, RENAL E HISTOLOGIA:	53
3.11	EUTANÁSIA PARA ABORDAGEM <i>IN VITRO</i> :	54
3.12	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING (ABORDAGEM <i>IN VITRO</i>):	54
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA:	56
3.14	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: PARTE I – ANÁLISE <i>IN VIVO</i>	56
3.15	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: PARTE II – ANÁLISE <i>IN VITRO</i>	60
4	RESULTADOS	64
4.1	PARTE I - ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	64
4.1.1	ANÁLISE NÃO INVASIVA DA PRESSÃO ARTERIAL DE CAUDA DOS ANIMAIS SHAM E 2R1C:	64
4.1.2	ANÁLISE DOS PESOS CORPORAIS E RENAIIS DOS ANIMAIS SHAM, 2R1C E 2R1C/LOS:	66
4.1.3	ANÁLISE DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) BASAL (MÉTODO DIRETO) DOS RATOS SHAM, 2R1C E 2R1C/LOS:	67
4.1.4	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO ICM DO VEÍCULO SOLUÇÃO SALINA (NaCl 0,15 M) SOBRE AOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DE RATOS SHAM, 2R1C E 2R1C/LOS:	69

4.1.5	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO ICM DO INIBIDOR DO TRANSPORTADOR DE GLT1/EAAT2, DHK (1MM), SOBRE AOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DE RATOS SHAM, 2R1C E 2R1C/LOS:	74
4.1.6	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO ICM DO INIBIDOR DA ENZIMA GLUTAMINA SINTETASE, L-AAA (2MM), SOBRE AOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DE RATOS SHAM, 2R1C E 2R1C/LOS:	79
4.1.7	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO ICM DO INIBIDOR REVERSÍVEL DA ATIVIDADE DA GLIA, FCT (0,2 MM), SOBRE AOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DE RATOS SHAM, 2R1C E 2R1C/LOS:	84
4.1.8	ANÁLISE DA MARCAÇÃO BULBAR COM O CORANTE AZUL DE EVANS:.....	89
4.2	PARTE II - ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	90
4.2.1	ANÁLISE DA HEMODINÂMICA E DOS PESOS CORPORAIS E RENAI DOS ANIMAIS SHAM E 2R1C:.....	90
4.2.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GLIAL FIBRILLARY ACID (GFAP), DOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO ASTROGLIAIS (GLT1 E GLAST) E DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO (NTS):.....	92
4.2.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GLIAL FIBRILLARY ACID (GFAP), DOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO ASTROGLIAIS (GLT1 E GLAST) E DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) NO BULBO VENTROLATERAL ROSTRAL (RVLM):	94
4.2.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GLIAL FIBRILLARY ACID (GFAP), DOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO ASTROGLIAIS (GLT1 E GLAST) E DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) NO ÓRGÃO SUBFORNICIAL (SFO):	96
4.2.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GLIAL FIBRILLARY ACID (GFAP), DOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO ASTROGLIAIS (GLT1 E GLAST) E DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVN):	98
4.2.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GLIAL FIBRILLARY ACID (GFAP), DOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO ASTROGLIAIS (GLT1 E GLAST) E DA GLUTAMINA SINTETASE (GS) NO CÓRTEX:.....	100
4.2.7	ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS DIFERENTES MARCADORES DA ATIVIDADE ASTROCÍTICA E A PAS (MMHG) NO NTS E RVLM:	102
5	DISCUSSÃO	105
5.1.	PARTICIPAÇÃO DOS MECANISMOS GLUTAMATÉRGICOS ASTROGLIAIS DO BULBO SOBRE A MODULAÇÃO CARDIOVASCULAR EM RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR (HRV)	105
5.1.1.	ATIVIDADE FUNCIONAL ASTROCÍTICA MEDIADA PELO GLT1 NÃO ESTÁ ALTERADA NO BULBO DE ANIMAIS COM HRV.....	106
5.1.2.	ATIVIDADE FUNCIONAL ASTROCÍTICA MEDIADA PELA GS NÃO ESTÁ ALTERADA NO BULBO DE ANIMAIS COM HRV.....	111
5.1.3.	ATIVIDADE FUNCIONAL DA GLIA ESTÁ ALTERADA NO BULBO DE ANIMAIS COM HRV.	115
5.1.4.	EXPRESSÃO DOS MARCADORES DA ATIVIDADE ASTROCÍTICA ESTÁ ALTERADA EM NÚCLEOS BULBARES DE RATOS COM HRV	117
5.1.5.	EXPRESSÃO DOS MARCADORES DA ATIVIDADE ASTROCÍTICA ESTÁ ALTERADA EM NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS DE RATOS COM HRV	122
5.2.	CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS SOBRE A DIFUSÃO DOS FÁRMACOS NA CISTERNA MAGNA & A ESCOLHA DAS DOSES UTILIZADAS	124

6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS.....	130
7 CONCLUSÕES	132
8 PERSPECTIVAS.....	134
9 REFERÊNCIAS	137
APÊNDICE A CERTIFICAÇÕES DO CEUA/UFPB	134
APÊNDICE B VALORES EXPRESSOS DA SOLUÇÃO DE SALINA NaCl 0,15 M	128
APÊNDICE C VALORES EXPRESSOS DO DHK 1MM	135
APÊNDICE D VALORES EXPRESSOS DO L-AAA 2MM	135
APÊNDICE E VALORES EXPRESSOS DO FCT 0,2MM	135
APÊNDICE F RESUMOS DE TRABALHOS PARALELOS	196
ANEXO A MANUSCRITO NÃO RELACIONADO À TESE	196
ANEXO B ARTIGO PUBLICADO NÃO RELACIONADO À TESE	202

Introdução|

1 introdução

O controle da pressão arterial (PA) é complexo e dinâmico, resultado de interações entre os sistemas nervoso, cardiovascular, neuroendócrino, renal e os metabólitos locais, os quais modulam e corrigem os desvios na PA ¹⁻³. Assim, as oscilações da PA refletem as ações combinadas dos diferentes mecanismos de *feedback* (de curto, médio e longo prazo) responsáveis pelo seu controle ⁴. Logo, alterações nos mecanismos de controle da PA podem promover mudanças disfuncionais, as quais em longo prazo podem levar ao desenvolvimento da hipertensão arterial (HA) ⁴⁻⁶.

No decorrer das fases do desenvolvimento da HA observam-se alterações funcionais e/ou estruturais em órgãos-alvos como o coração, sistema nervoso central (SNC), rins, bem como no endotélio vascular antes mesmo do estabelecimento da HA ⁷⁻⁹, tornando-se um fator de risco para doenças cardiovasculares e comorbidades ¹⁰.

Em estudos experimentais foi observado que o desenvolvimento da HA está associado ao aumento da atividade simpática em vários modelos experimentais, tais como em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), transgênicos para o gene da renina (TGR mRen2), geneticamente sensíveis à ingestão de sódio (Dahl), uninefrectomizados tratados cronicamente com acetato de desoxicorticosterona (DOCA) e NaCl (DOCA-Sal) e em ratos com hipertensão renovascular (HRv) ¹¹⁻¹⁵. Dentre os mecanismos que desencadeiam e/ou mantêm a hiperatividade simpática, destacam-se os mecanismos angiotensinérgicos ¹⁶, os quais são ativados pelo aumento da sensibilidade à Ang-II no SNC – caracterizada principalmente pelo aumento da

expressão e função dos receptores AT1 - especialmente no modelo de HRv ^{16–}

²⁰.

1.1 Hipertensão renovascular (HRv): contexto histórico e fases temporais

Os estudos pioneiros de Tigerstedt & Bergman ²¹ mostraram que a injeção de extratos de rins na veia jugular promoveu aumento da PA em coelhos, sugerindo que os rins produziram uma secreção pressora, a qual foi nomeada “*renina*” (do latim *renes*: *rim*). No decorrer dos anos, em diversas abordagens experimentais, foi observado que danos renais levavam os animais a desenvolverem hipertensão arterial. Em 1934, Harry Goldblatt e seu grupo desenvolveram uma técnica que limitava o fluxo sanguíneo renal pela inserção de um clipe de prata em cães (o que tornou a técnica conhecida como 2-Rins-1Clipe/2R1C), produzindo isquemia renal e elevação persistente na pressão arterial sistólica (PAS) ^{22,23}. Pouco tempo depois, em 1939, dois grupos independentes publicaram uma série de experimentos que levaram ao entendimento do mecanismo humoral envolvendo o modelo 2R1C, conhecido como hipertensão renovascular (HRv). Inicialmente, um grupo de pesquisadores argentinos liderados por Eduardo Braun-Menendez mostrou que a renina atuava em um substrato específico, uma α -globulina circulante produzida pelo fígado, o qual chamaram “*hipertensinogênio*” em razão deste liberar “*hipertensina*” como produto final ^{24,25}. Na sequência, outro grupo de pesquisadores liderados pelo pesquisador Irvine Page conseguiu purificar a renina a partir dos rins de porcos, a qual reagindo com um substrato formava um potente vasoativo por eles denominado “*angiotonina*” ^{26,27}. Na época

acreditava-se que a hipertensina ou angiotonina, existia em duas formas (I e II), mas os estudos de Skeggs ²⁸ demonstraram que apenas a forma II era responsável por tal efeito vasoconstrictor. Adicionalmente, os autores ainda mostraram que a forma I consistia em um decapeptídeo [Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu] que precisava ser convertido por uma enzima, por eles denominada “enzima conversora de hipertensina I”, para a forma II, o octapeptídeo ativo [Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe]. Nos anos seguintes, os dois grupos – liderados por Eduardo Braun-Menendez e Irvine Page - decidiram unificar as nomenclaturas em: “*Angiotensinogênio*” para o substrato da renina, “*Angiotensina I*” para a forma inativa, “*Angiotensina II*” para a forma vasoconstritora e “*Enzima conversora de angiotensina I*” – ECA1, sendo estes componentes a base dos estudos para o sistema renina-angiotensina (SRA)²⁹.

Posteriormente, outros estudos mostraram que a renina é liberada por células justaglomerulares da arteríola aferente glomerular, não apenas em situações de hipotensão e hipovolemia, mas também frente à queda na concentração de Na⁺, em situações de hiposmolalidade ^{30–32}. Uma vez liberada na circulação periférica, a renina cliva o angiotensinogênio em Ang-I, a qual é novamente clivada pela ECA1 – presente sobretudo no endotélio pulmonar - para formar elevados níveis de Ang-II no plasma, os quais exercem efeitos sobre artérias, órgãos periféricos e SNC ^{25,28}.

Ainda em relação à hipertensão de Godblatt (2-Rins-1Clipe/2R1C), experimentalmente observa-se que há três fases temporais pelas quais passam os animais com HRv ³³ (Figura I). Na primeira fase (4 primeiras semanas), há um aumento nos níveis de renina e Ang-II plasmáticas que podem ser revertidas com o tratamento de fármacos inibidores da ECA. Na

segunda fase (5-8 semanas), há um aumento da retenção de sal e sensibilidade à Angiotensina II, podendo a pressão permanecer estável ou continuar se elevando em resposta à sensibilidade angiotensinérgica. Na terceira fase (9 semanas ou mais), a pressão remanescente permanece alta, enquanto os níveis de Ang II e de renina se estabilizam. Tanto o tratamento com inibidores da ECA, como a remoção do clipe na fase III pode diminuir a condição hipertensiva remanescente não retornando à condição normotensa inicial.

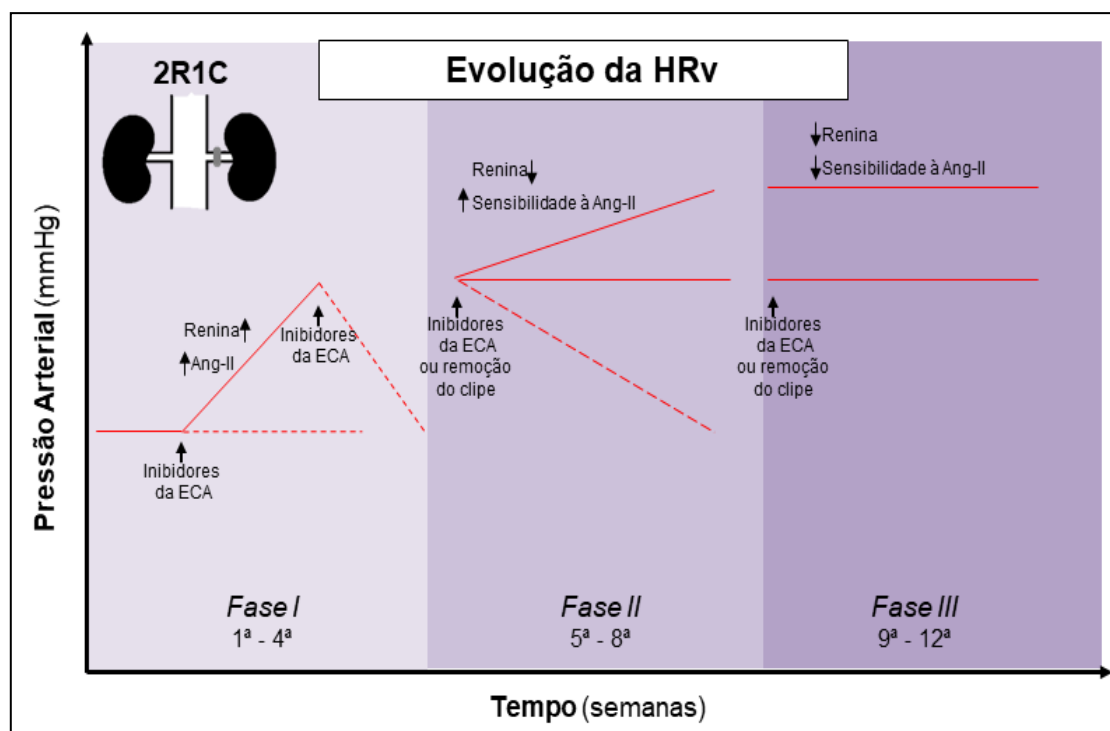


Figura I Condução esquemática mostrando as fases de desenvolvimento da HRv (Hipertensão de Goldblatt) experimental ou clínica (Adaptado de MARTINEZ-MALDONADO, 1991).

As alterações morfoanatômicas e funcionais que ocorrem no decorrer das fases levam a um desbalanço simpato-humoral e hidroeletrolítico que culminam no desenvolvimento e no estabelecimento da HRv ^{1,18,33}.

Os ratos recuperam-se bem da cirurgia 2R1C e desenvolvem a HRv mais facilmente que os cães ³⁴. Além disso, estudos prévios do nosso laboratório observaram que os ratos não apenas tem um quadro hipertensivo estável aliado à simpatoexcitação, como também respondem bem aos tratamentos com fármacos anti-hipertensivos durante a fase II ^{35,36} (Figura I).

1.2 Vias angiotensinérgicas centrais

A microvasculatura do sistema nervoso central (SNC) é protegida por uma estrutura altamente seletiva: a barreira hematoencefálica (BHE), a qual é composta, entre outros componentes, por células endoteliais que expressam *tight junctions*, proteínas de junções apertadas que inviabilizam a passagem de moléculas entre as células do endotélio (transporte paracelular) - além dos astrócitos, pericitos e microglia, os quais formam uma unidade neurovascular ³⁷. Há um consenso de que a estrutura química, o caráter lipofóbico, a carga negativa e o tamanho molecular não permitem a passagem da Ang-II, em baixos níveis, pela BHE ^{38,39}. A hipótese mais aceita é a que atue em núcleos onde a BHE é mais permeável, denominados órgãos circunventriculares (OCV's). A estrutura da BHE dos OCV's permite que o parênquima neural tenha contato direto com íons, hormônios e outras substâncias da circulação periférica, como a Ang-II ⁴⁰⁻⁴².

Entre os OCV's, o órgão subfornicial (SFO) se destaca por possuir astrócitos, neurônios e células da microglia que expressam grande quantidade de receptores AT1 (AT1R) para a Ang-II ^{42,43}. Além de ter conexões diretas com os neurônios pré-simpáticos parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e conexões indiretas aos neurônios pré-simpáticos do bulbo

ventrolateral rostral (RVLM), ambos envolvidos com o controle da atividade simpática cardiovascular^{41,44,45}.

Na região bulbar, a Área postrema (AP), outro OCV, se destaca por possuir uma grande quantidade de receptores AT1, além de possuir conexões diretas recíprocas com outros núcleos cardiovasculares no bulbo, tais como o núcleo do trato solitário (NTS)^{46,47} e o RVLM^{48,49}. O NTS é um núcleo altamente heterogêneo com diferentes regiões funcionais, das quais se destacam as porções intermediária (NTSi; ao nível da AP) e caudal (NTSc; localizada caudal ao *calamus scriptorius*) que mantêm conexões diretas e/ou indiretas com neurônios simpatoexcitatórios do RVLM e do PVN modulando-os tonicamente através de nervos sensoriais periféricos⁵⁰⁻⁵³.

A Ang-II plasmática atuando no SNC pode: i) ativar os neurônios do SFO que se projetam aos neurônios pré-simpáticos do PVN, os quais estimulam diretamente à medula intermédia lateral (IML) ou os neurônios pré-simpáticos do RVLM^{41,45,54-56}, ou/e ii) ativar os neurônios da AP, os quais se projetam aos neurônios do NTS, aos neurônios pré-simpáticos do PVN ou do RVLM^{46-49,57}.

O eixo SFO-PVN-RVLM é visto como a principal via utilizada pela Ang-II para aumentar o tônus simpático e, conseqüentemente, promover a elevação da pressão arterial^{44,58,59}. Interessantemente, a Ang-II periférica atuando no SNC, estimula a produção *de novo* de Ang-II pelos neurônios do SFO com projeções aos neurônios pré-simpáticos do PVN^{41,55}. Isso se deve à atuação de um sistema renina angiotensina (SRA) central, uma vez que observamos a expressão: i) de angiotensinogênio principalmente em astrócitos do SNC⁶⁰, ii) de renina em neurônios e astrócitos⁶¹, iii) do receptor de pró-renina (PRR) em

neurônios ⁶² e células da microglia ⁶³, e iv) da ECA em neurônios ⁶⁴ e células endoteliais ⁶⁵.

Estudos moleculares mostraram que o PVN possui significativa expressão de RNAm para AT1R ⁶⁶, sendo os neurônios, em sua maior parte (aproximadamente 90%), responsivos à aplicação direta de Ang-II com aumento das correntes de influxo e despolarização, as quais são reduzidas pela prévia inibição do receptor AT1 ⁴⁵. Estudos de Chen & Pan ⁶⁷, mostraram que a infusão crônica subcutânea de Ang-II (por 4 semanas) promoveu aumento na concentração de glutamato e redução na concentração de GABA no PVN de ratos. Outros estudos, utilizando a técnica de registros eletrofisiológicos, mostraram que a aplicação de Ang-II em *slices* do hipotálamo de ratos promove aumento significativo nas correntes glutamatérgicas de neurônios pré-simpáticos do PVN com projeções ao RVLM ^{68,69}, bem como redução das correntes gabaérgicas ⁷⁰. Em conjunto, estes estudos demonstram que a Ang-II central estimula as projeções excitatórias dos neurônios pré-simpáticos do PVN, promovendo simpatoexcitação e aumento da PA.

Há diferentes estudos sugerindo que o SRA central está superativado na HRv ^{71,72}. Isto porque animais com esta fisiopatologia apresentam aumento da produção central de Ang-II e da expressão dos receptores AT1 em neurônios pré-simpáticos do PVN e do RVLM ^{17,59,72}, além de apresentarem também redução da PAM frente “*knockout*” gênico do angiotensinogênio central ⁷¹. Estudos de Nunes & Braga ⁵⁸ observaram que a infusão crônica subcutânea de Ang-II (por 14 dias) promoveu aumento na pressão arterial média (PAM), bem como aumento na expressão do RNAm para o receptor AT1 no RVLM e redução no SFO. Adicionalmente, Zubcevic et al., ⁴⁴ mostraram que mesmo

uma única injeção intraperitoneal em *bolus* de Ang-II – efeito agudo - induz um aumento de aproximadamente 20% da atividade neuronal do SFO ou do PVN *versus* aproximadamente 900% na atividade neuronal do RVLM dos ratos. O efeito da Ang-II periférica sobre os núcleos cardiovasculares não parece ser unicamente por meio do eixo SFO-PVN-RVLM, uma vez que outros estudos *in vitro* mostraram que a Ang-II periférica reduz a resistência elétrica e aumenta a permeabilidade transcelular - permitindo a passagem de grandes proteínas como a albumina iodo-marcada - em células endoteliais isoladas da BHE de cérebro de camundongos ⁷³. Outros estudos mais recentes mostraram que em modelos de hipertensão há, de fato, aumento da permeabilidade da BHE, sugerindo que, em altos níveis, a ang-II se torne capaz de facilitar a passagem de proteínas maiores pela barreira ^{74–76}. Nesse sentido, estudos de Fan et al., ⁷⁵ observaram redução na expressão das principais proteínas *tight junctions* - ZO-1 e ocludina - na BHE do diencéfalo de ratos com *hipertensão renalvascular* (modelo 2R2C). Em adição, estudos de Biancardi et al., ⁷⁴ observaram aumento da marcação fluorescente de traçadores de extravasamento, FITC e Rho no PVN, NTS e RVLM de ratos com HRv, sugerindo aumento da permeabilidade da BHE nessa condição. Ao passo que Yao & May ⁷⁷ mostraram que a injeção intracarotídea (ic.) de Ang-II promove aumento da ativação dos neurônios C1 catecolaminérgicos do RVLM, a qual é potencializada quando a permeabilidade da BHE é previamente aumentada pela injeção ic. de Manitol hiperosmótico. Adicionalmente, os autores observaram que a injeção prévia de losartana ic., mesmo com a BHE já prejudicada, é capaz de inibir significativamente a ativação neuronal induzida pela Ang-II. Esses estudos em conjunto confirmam que na hipertensão há um

aumento da permeabilidade da BHE, permitindo que peptídeos, tais como a Ang-II periférica, tenham acesso direto à neurônios localizados em importantes núcleos envolvidos com a modulação cardiovascular, como o NTS, o RVLM e o PVN ⁷³⁻⁷⁷.

1.3 Ang-II e mecanismos glutamatérgicos

Sabe-se que a atividade dos neurônios pré- e pós-sinápticos é resultado da interação entre as funções dos neurotransmissores excitatórios e inibitórios, tais como o glutamato e o GABA respectivamente. Há evidências funcionais mostrando que na hipertensão há a prevalência da função excitatória glutamatérgica no PVN e no RVLM ^{17,59}, uma vez que foi observado em animais com HRv, bem como em animais com hipertensão induzida por infusão subcutânea crônica de Ang-II, uma redução significativa na PAM basal após as microinjeções de inibidores dos receptores de glutamato nos núcleos do PVN ou do RVLM ^{17,59,78}. Além disso, outros trabalhos mostraram que há uma redução significativa na PAM basal dos animais após a microinjeção de muscimol (um agonista GABA) intracebroventricular (icv) ou no PVN de animais com HRv ou Hipertensos por Ang-II ⁷⁹⁻⁸¹. Em conjunto, esses estudos demonstram que há, na hipertensão, um aumento da atividade glutamatérgica em neurônios do PVN e do RVLM, bem como uma redução das sinapses inibitórias gabaérgicas no PVN, podendo esse desequilíbrio ser induzido por um aumento na Ang-II periférica.

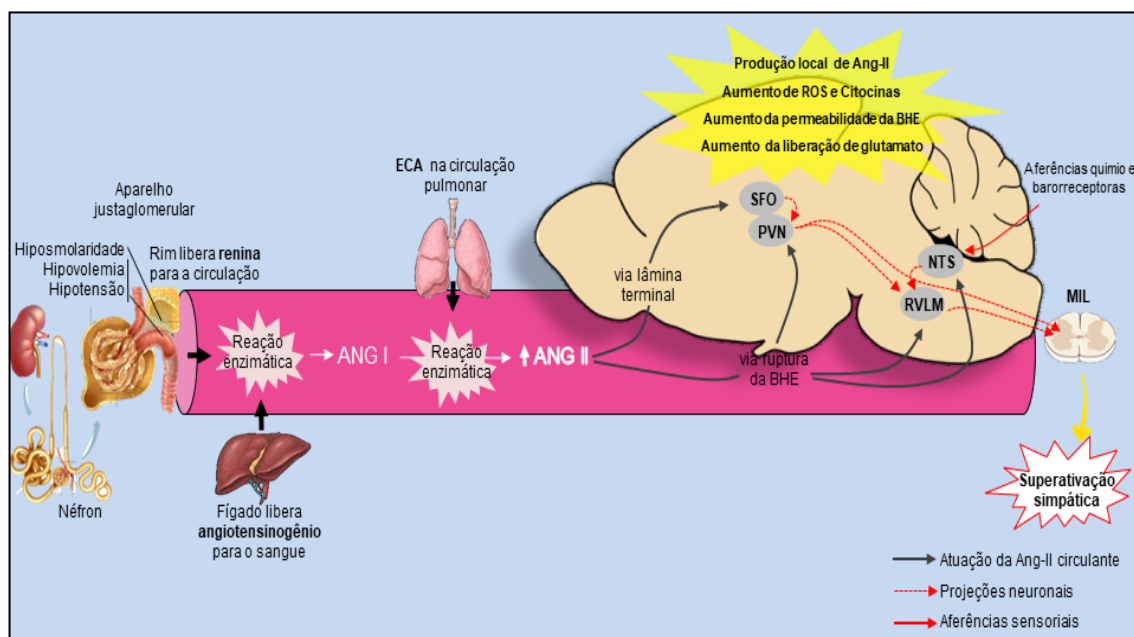


Figura II | Na hipertensão, a super ativação do SRA periférico resulta em aumento na concentração da Ang-II plasmática (1), a qual promove ativação de núcleos centrais desprovidos de BHE envolvidos com a modulação cardiovascular, tais como o SFO (2). Nessa condição, há um aumento na permeabilidade da BHE, permitindo que a ANG-II plasmática ative neurônios hipotalâmicos (PVN) e bulbares (RVLM e NTS) envolvidos com a modulação e da atividade simpática e cardiovascular (3) ^{74,76}. Ang-II: Angiotensina II, ECA: Enzima conversora de Ang-II, ROS: Espécies reativas de oxigênio, SFO: Órgão subfornicial, PVN: Núcleo paraventricular, NTS: Núcleo do trato solitário, RVLM: Bulbo ventral rostralateral, BHE: Barreira hematoencefálica, MIL: Medula intermediolateral. Fonte: Autor.

Outros estudos *in vitro* confirmam que a Ang-II aumenta a frequência de disparo dos neurônios do PVN com projeções ao RVLM, bem como promove um aumento na atividade simpática renal, as quais são abolidas pelo antagonismo dos receptores de glutamato no PVN ⁶⁹. Não obstante, estudos recentes *in vivo* mostraram que a microdiálise de Ang-II no RVLM resulta em um aumento significativo na liberação local de glutamato, sendo essa resposta abolida após perfusão prévia do antagonista do receptor AT1 ⁸². Estes estudos

demonstram que a Ang-II, de fato, exerce um papel estimulatório sobre as sinapses glutamatérgicas no PVN e no RVLM de ratos^{69,82} (Fig II).

1.3.1 Mecanismos glutamatérgicos astrogliais

Os astrócitos são células da macroglia, assim como os oligodentrócitos, microglias, tanícitos e células ependimárias⁸³. Possuem múltiplas funções amplamente discutidas por excelentes revisões incluindo: i) o desenvolvimento das sinapses⁸⁴, ii) a definição da arquitetura funcional do SNC⁸⁵, iii) a formação e manutenção da barreira hematoencefálica^{86,87}, iv) o suporte metabólico neuronal, através da síntese e liberação de lactato⁸⁸, v) a manutenção do meio iônico extracelular (pela recaptção de íons K^+ do meio extracelular)⁸⁹, e v) a modulação da transmissão sináptica pela recaptção e conversão de neurotransmissores, especialmente de glutamato e GABA⁹⁰. A recaptção do glutamato do meio extracelular é um importante mecanismo modulatório da atividade neural, uma vez que esse é o neurotransmissor excitatório mais abundante no SNC⁹⁰. Esta recaptção é mediada por transportadores de glutamato da família SLC1 presentes na membrana celular e representados por cinco subtipos de EAAT's (transportadores de aminoácidos excitatórios) - EAAT1 / SLC1A3, EAAT2 / SLC1A2, EAAT3 / SLC1A1, EAAT4 / SLC1A6 e EAAT5 / SLC1A7, os quais promovem o transporte do glutamato em um cotransporte com $3Na^+$ e H^+ e contra-transporte com o K^+ ⁹¹. Os astrócitos expressam especificamente os subtipos EAAT1 e EAAT2 (em humanos), sendo conhecidos em roedores como GLAST (transportador de glutamato / aspartato) e GLT-1 (transportador de glutamato-

1), respectivamente ⁹². Os transportadores astrocíticos GLT1/EAAT2 e GLAST/EAAT1 são os principais responsáveis pelo *clearance* de glutamato do meio extracelular ^{93,94}. Acredita-se que do total de glutamato liberado pelos neurônios pré-sinápticos, apenas 20% ativam os neurônios pós-sinápticos, enquanto 80% são recaptados pelos transportadores astrocíticos GLT1/EAAT2 e GLAST/EAAT1 ⁹⁰. Estudos com mapeamento genético mostraram que os genes que codificam os transportadores de glutamato astrocíticos (SLC1a3 e SLC1a2) são os mais expressos na região do bulbo de ratos ⁹⁵. Estudos adicionais ainda mostraram que o GLAST e GLT1 já foram encontrados no NTS ⁹⁶ e na porção ventral do bulbo de ratos ⁹⁷. Estudos funcionais de Mattot et al., ^{98,99} mostraram que a microinjeção dos inibidores dos EAAT's (TBOA ou DHK) no NTS aumenta a despolarização neuronal e promove redução da PAM em ratos anestesiados. Mas em relação à porção ventral do bulbo, não há até o momento, estudos funcionais que tenham avaliado o papel da recaptação pelos EAAT's astrocíticos no RVLM. O glutamato recaptado pelos EAAT's astrocíticos é convertido em glutamina (*Gln*) pela *Glutamina Sintetase* (GS) por meio da adição de um grupamento de amônia (NH₃) à molécula de glutamato ¹⁰⁰. A *Gln* produzida é liberada por astrócitos através do transportador de glutamina SN1/SNAT3 e captada por neurônios próximos pelo transportador de glutamina SNAT1, ambos acoplados ao transporte de Na⁺ ¹⁰¹. Uma vez que a *Gln* é captada pelos neurônios, é convertida novamente em glutamato pela *Glutaminase* ¹⁰¹ (Fig III).

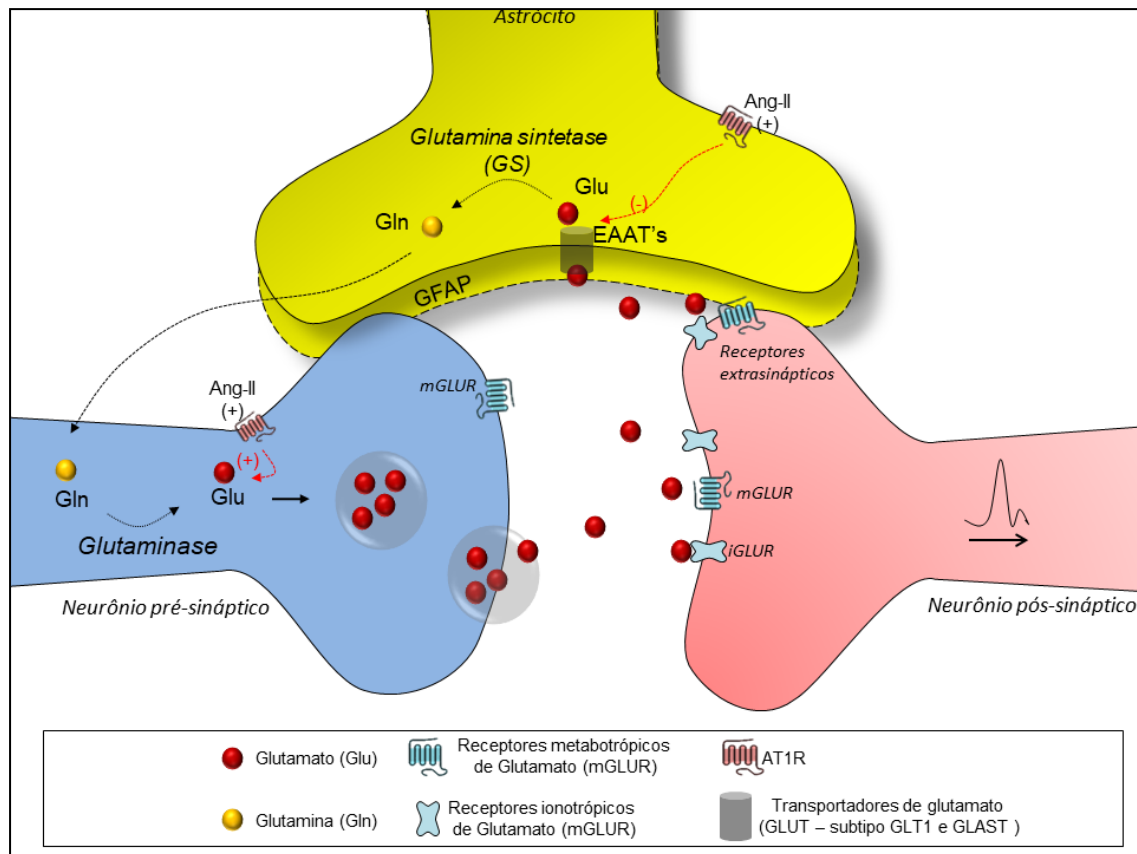


Figura III: Participação dos astrócitos e da Ang-II na modulação das sinapses glutamatérgicas. Nas terminações pré-sinápticas (em azul), a glutaminase converte a glutamina em glutamato, o qual é armazenado em vesículas para ser liberado na fenda sináptica. Na região da fenda sináptica o glutamato atua em receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos dos neurônios pós-sinápticos (em vermelho). Os astrócitos próximos às sinapses (em amarelo) previnem a superativação neural pela ativação adicional dos receptores extrasinápticos de glutamato através da: a) recaptção do glutamato extrasináptico feito pelos EAAT's – GLT1 e GLAST, b) conversão do glutamato em glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS), e c) redução da comunicação neuronal para difusão de neurotransmissores através da polimerização do citoesqueleto astrocítico (GFAP). A Ang-II prejudica a recaptção de glutamato pelos astrócitos aumentando assim a disponibilidade do glutamato no espaço extracelular e consequente aumento da excitabilidade do neurônio pós-sináptico ^{17,69,82}. Fonte: Autor.

Há diferentes estudos sugerindo que a recaptção do glutamato extracelular pelos astrócitos está envolvida nas respostas cardiovasculares

induzidas pela Ang-II no SNC ^{69,102}. Nesse sentido, estudos de Stern et al., ⁶⁹ observaram que a prévia microinjeção de um bloqueador dos transportadores de glutamato astrocíticos (DHK) atenua a reposta simpatoexcitatória e pressora induzidas pela Ang-II no PVN de ratos anestesiados. Os protocolos adicionais deste trabalho, com registro eletrofisiológico dos neurônios pré-simpáticos do PVN, mostraram que na presença do DHK, a Ang-II não foi capaz de promover aumento nas correntes excitatórias nos neurônios PVN-RVLM, sugerindo que tanto os efeitos excitatórios sobre os neurônios pré-simpáticos (PVN-RVLM), quanto as respostas cardiovasculares são mediados indiretamente pela inibição dos mecanismos glutamatérgicos astrocíticos, ou seja, pela inibição da captação de glutamato pelo GLT1 astrocítico. Estes achados ainda foram confirmados por análises adicionais, as quais mostraram que a Ang-II inibe as correntes de entrada glutamatérgicas em astrócitos próximos às sinapses de neurônios pré-simpáticos do PVN–RVLM via inibição do transportador GLT1 ⁶⁹. Os resultados de Stern et al., ⁶⁹ foram posteriormente corroborados pelos estudos *in vitro* do nosso grupo, os quais mostraram que a Ang-II, de fato, promove redução na recaptação de análogos de glutamato em cultura primária de astrócitos do hipotálamo ¹⁰².

Outro mecanismo importante de modulação da transmissão sináptica pelos astrócitos é a regulação dinâmica de filamentos intermediários do citoesqueleto astrocítico *Glial Fibrillary Acid Protein* (GFAP)¹⁰³. O GFAP normalmente encontra-se polarizado formando uma rede insolúvel junto a outras proteínas com a vimentina e a desmina (formando um filamento intermediário do tipo III) (*para revisão consultar* INAGAKI et al., 1994). O GFAP é regulado dinamicamente pela fosforilação-defosforilação induzida por

diversos fatores como pH ¹⁰⁵, cátions divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} ^{105,106}, temperatura ¹⁰⁶, proteínas e aminoácidos ^{107,108}, hormônios ^{109,110} e citocinas ^{111,112}, os quais modificam a estrutura do GFAP promovendo a expansão ou retração dos prolongamentos astrocíticos e alterando sua cobertura sobre os terminais pré e pós-sinápticos neuronais ^{113,114}(Fig III). Estudos de Theodosis et al., ¹¹⁵ observaram que a expansão dos prolongamentos astrocíticos atua como barreira física dinâmica limitando a difusão de neurotransmissores no meio extracelular do núcleo supra-óptico de ratas virgens. Em adição, estudos de Wang e Hatton ¹¹⁶ mostraram que a polimerização e depolimerização do GFAP são processos dinâmicos que promovem o prolongamento/retração dos processos astrocíticos sobre a superfície neuronal. Assim, a distensão ou retração dos processos astrocíticos pode alterar o contato sináptico e limitar a difusão dos neurotransmissores entre as terminações neuronais.

1.4 Interação entre astrócitos e a Ang-II na modulação da pressão arterial e atividade simpática

Há diferentes estudos sugerindo que os astrócitos hipotalâmicos e bulbares participam da modulação da pressão arterial e da atividade simpática ^{69,98,99,102,117–126}. Recentemente nós observamos que a microinjeção icv de um inibidor reversível da atividade da glia, o fluorocitrato (FCt), promove aumento da PAM em ratos normotensos não anestesiados, sugerindo que as células astrogliais do hipotálamo participam da modulação da pressão arterial basal ¹⁰². No entanto, há poucos estudos avaliando a interação astrócito-neurônio em distúrbios cardiovasculares, especialmente em animais não anestesiados ^{122,125}.

Nesse sentido, nosso grupo tem se dedicado a melhor compreender a função dos astrócitos hipotalâmicos e bulbares – dispostos sobre a via SFO-PVN-RVLM e NTS - na gênese e manutenção da hipertensão. Especialmente no contexto da HRv, em que a Ang-II circulante promove um aumento da atividade dos neurônios glutamatérgicos do PVN com projeções aos neurônios pré-simpáticos do RVLM ^{17,59}.

Há vários estudos mostrando que a disfunção da glia, especialmente a astrocítica, está presente em diferentes fisiopatologias cardiovasculares ^{122,123,125,127-130}. Em animais com insuficiência cardíaca, por exemplo, sabe-se que a atividade funcional astrocítica está alterada, contribuindo para o aumento da atividade simpática e o remodelamento ventricular pós-infarto ^{123,125}. Entretanto, em animais hipertensos pouco se sabe sobre a atividade funcional astrocítica, especialmente em núcleos de modulação cardiovascular.

Estudos de Diaz et al., ¹³¹, observaram aumento na ativação astrocítica, mediada pelo cálcio [Ca^{2+}], em *slices* cerebrais de camundongos após o estabelecimento da hipertensão induzida pela infusão crônica de Ang-II. Outros estudos mostraram que a ativação das proteínas ERK1/2 e MAPKs p38 pela Ang-II é maior em astrócitos derivados do bulbo de animais espontaneamente hipertensos (SHR) que em astrócitos derivados de ratos normotensos ¹³². Em conjunto, esses estudos sugerem que a Ang-II altera a função/ativação de astrócitos na região bulbar, inclusive durante o desenvolvimento da hipertensão.

Este estudo será o primeiro a investigar as alterações cardiovasculares e moleculares associadas aos mecanismos astrocíticos de captação e conversão de glutamato na região do bulbo de animais hipertensos e sem o

efeito anestésico. Adicionalmente, também será o primeiro a investigar as alterações moleculares astrocíticas no hipotálamo de animais hipertensos.

Nesse contexto, a hipótese do nosso estudo é que na HRv há redução na atividade/expressão dos transportadores de glutamato astrocíticos em núcleos bulbares e hipotalâmicos, o que poderia promover um aumento na biodisponibilidade do glutamato no espaço extracelular contribuindo para o aumento da simpatoexcitação e da pressão arterial nessa fisiopatologia. Para avaliar esta hipótese, nós realizamos abordagens *in vivo* e *in vitro*. Na abordagem *in vivo* nós realizamos microinjeção intracisterna magna (ICM): i) de um inibidor do GLT1 para analisar a função de recaptação de glutamato mediada por esse transportador, ii) de um inibidor da GS para analisar a função de conversão do glutamato-glutamina e iii) de uma gliotoxina para analisar a função glial em ratos normotensos, 2R1C e 2R1C/ LOS (tratados com Losartanaa).

Na abordagem *in vitro*, nós analisamos a expressão proteica dos marcadores da atividade astrocítica glutamatérgica – GFAP, GLT1, GLAST e GS – nos núcleos bulbares do NTS e RVLM e hipotalâmicos do SFO e PVN de ratos normotensos e 2R1C.

Objetivos|

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a participação dos mecanismos glutamatérgicos astrogliais do bulbo e hipotálamo na modulação cardiovascular em ratos com hipertensão renovascular (modelo 2R1C).

2.2 Objetivos específicos

Na abordagem *in vivo*:

Avaliar sobre as variáveis cardiovasculares basais de ratos SHAM, 2R1C e 2R1C tratados com Losartana o efeito da microinjeção ICM:

- do inibidor do transportador astrocítico de glutamato GLT1;
- do inibidor da enzima astrocítica GS;
- do inibidor reversível da atividade da glia.

Na abordagem *in vitro*:

Avaliar nos núcleos cardiovasculares hipotalâmicos (SFO e PVN) e bulbares (NTS e RVLM) de ratos SHAM e 2R1C a expressão proteica:

- do filamento astrocítico *glial fibrillary acid (GFAP)*;
- dos transportadores de glutamato astrocíticos (GLAST e GLT1); e
- da enzima glutamina sintetase (GS).

Materiais & Métodos|

3 Materiais & Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados 38 ratos *Wistar* adultos, pesando de 180-250g, provenientes do Biotério IPeFarM, Universidade Federal da Paraíba. Imediatamente após a retirada do biotério, os animais foram levados ao Laboratório de Controle da Neural da Circulação e Hipertensão arterial (LACONCHA), regularmente credenciado pelo CEUA/UFPB, onde passaram por indução à HRv e, no decorrer das 6 (seis) semanas seguintes, foram alojados em caixas (5 animais/caixa) alocadas em ambiente com ciclos de claro/escuro (12/12h) com acesso a ração padrão (Purina, Brasil) e água *ad libitum*. Os procedimentos com animais, bem como os protocolos experimentais deste estudo, foram previamente aprovados pela Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba pelos seguintes números de protocolo: 139_2017 e 8025180618 (os quais encontram-se no apêndice A) .

3.2 Cirurgia 2 Rins 1 Clipe (2R1C) para a indução da HRv:

Os animais foram pesados e seguiram para a cirurgia de indução da hipertensão renovascular conforme descrito em estudos anteriores de nosso laboratório ^{35,36,133}. Os animais foram anestesiados com uma mistura anestésica de cloridrato de cetamina 10% e xilazina 2% (75 e 10 mg / kg, respectivamente, i.p.) ou tramadol [(0,1 mg / 100 g, s.c.) John Martin S.R.L. Ciudad Autónoma de Buenos Aires] e somente após a ausência de reflexos dos membros inferiores foi iniciada a cirurgia. Realizamos uma incisão retroperitoneal abaixo do apêndice xifoide para a visualização e identificação da artéria renal direita. Um clipe de prata em forma de U (abertura com 0,2 mm

de largura) foi posicionado ao redor da artéria renal para diminuir o fluxo sanguíneo renal. Após o posicionamento do clipe, a musculatura e a pele foram suturadas com fio de sutura fino. O mesmo procedimento foi realizado com os animais controle cirúrgico (SHAM), exceto o clipe inserido na artéria renal direita. Logo após, doses profiláticas (intramusculares) de penicilina e estreptomicina [(0,1 ml / 100 g) 1.200.000 UI, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil] e Flunixin [(Banamine 2,2 mg / kg, sc.), Schering Arado, SP, Brasil] foram administrados. Os animais foram mantidos em caixas individuais e monitorados continuamente até a recuperação da anestesia.

3.3 Pletismografia de cauda:

Seis semanas após a cirurgia de indução da HRv (2R1C), foi realizada a medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda, a fim de confirmar o estabelecimento do quadro hipertensivo antes da abordagem molecular, por *western blotting*, e antes do tratamento com Losartana. Para isso, os animais foram previamente adaptados por dois dias consecutivos aos contensores cilíndricos de acrílico em uma plataforma pré-aquecida por 5 minutos em uma sala livre de ruídos. O manguito de borracha encaixado na cauda foi manejado à sua região proximal e ligada ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 30 segundos. Próximo ao manguito, um transdutor de pulso cilíndrico (sensor) conectado ao amplificador e conversor analógico digital (Kent Scientific, CODA - Torrington, CT, EUA ou Insight Equipamentos - Vila Amelia, Ribeirão Preto - SP) obteve 10 medidas, no mínimo, da pressão arterial sistólica dos animais em 2 sessões/dias consecutivos. Sendo a média dessas sessões calculadas

para obtenção dos valores finais de PAM, PAS, PAD e FC para a abordagem molecular e PAS para a abordagem *in vivo* dos grupos.

3.4 Estereotaxia intracisterna magna (ICM):

Após o período de estabelecimento do quadro hipertensivo realizamos a estereotaxia para a introdução de uma cânula-guia na região ICM com auxílio de uma estereotáxico para roedores (David-Kopf, Tujunga, CA, EUA), utilizando uma adaptação da técnica descrita por Michelini & Bonagamba ¹³⁴. Cânulas guias de aço inoxidável (14 mm de comprimento) foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (22G) e fixadas no suporte da torre do estereotáxico. Após a anestesia com a mistura de cloridrato de cetamina 10% e xilazina 2% (75 e 10 mg / kg, respectivamente, i.p.) e ausência de reflexos, os animais foram depilados na região dorsal da cabeça e posicionados no aparelho de estereotáxico. Nos músculos do couro cabeludo e nuca foram injetados com 0,2 ml de lidostesina (lidocaína a 3% e noradrenalina 1: 50.000) para reduzir o sangramento.

Foi realizada incisão longitudinal na pele, tecido conjuntivo subjacente e periósteo para limpeza da superfície do crânio e identificação das suturas do bregma e lambda. A barra do incisivo foi ajustada para a posição plana do crânio e os músculos da região da nuca foram retraídos do osso occipital por dissecação para permitir a colocação e fixação da cânula guia vertical na direção da cisterna magna. Logo após, foram fixados 2 furos nos ossos parietais com auxílio de uma broca odontológica, lateralmente à linha média, para a colocação de parafusos de relógio usados para ancorar o capacete feito com acrílico dental. Em seguida, foi realizada uma pequena craniotomia no limite do

interparietal para inserção da cânula guia em direção da cisterna magna usando coordenadas estereotáticas do atlas de Paxinos e Watson ¹³⁵, em relação ao bregma (AP: -14,5 mm; L: $\pm$ 0,0 mm, DV: -7,9 mm). Logo após, doses profiláticas (intramusculares) de penicilina e estreptomicina [(0,1 ml / 100 g im.) 1.200.000 UI, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil] e Flunixin [(Banamine 2,2 mg / kg, sc.), Schering Arado, SP, Brasil] foram administrados.

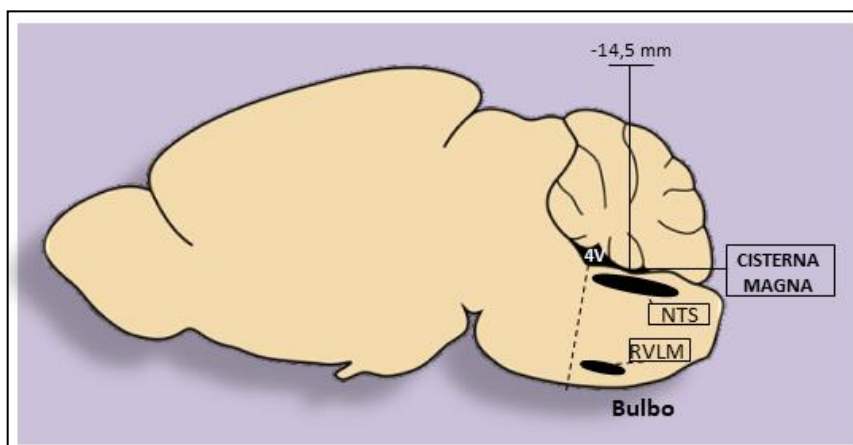


Figura IV| Ilustração de um corte sagital do cérebro de um rato, evidenciando a localização anatômica no espaço da região da cisterna magna na região bulbar, em detalhe a coordenada DV (- 14,5mm) a partir do Bregma utilizada para a introdução da cânula-guia. 4V- 4º ventrículo; NTS- núcleo do trato solitário, RVLM- bulbo ventrolateral rostral, DV- dorso-ventral. Fonte: Autor.

A Cisterna Magna é uma região de tráfego do líquido cefalorraquidiano e está anatomicamente situada entre o cerebelo e o bulbo, conforme mostrado na Figura IV. Dessa maneira, a estereotaxia ICM é comumente usada nos estudos para acessar as respostas da área bulbar ^{136,137}, uma vez que a microinjeção nesta região banha amplamente as porções dorsal, lateral e ventral do Bulbo.

3.5 Diluição e microinjeções de fármacos ICM:

O Dihidrokainato [DHK (TOCRIS; #183102)] foi preparado de acordo com o estudo de Stern et al., ⁶⁹. Foi diluído em solução salina estéril (NaCl 0,15 M) até a concentração de 1 mM e o pH ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil).

O Ácido L- α -aminoadipico [L-AAA (Sigma-Aldrich; #BCBS7518V)] foi preparado de acordo com o estudo de Liu et al., ¹³⁸. Foi diluído em solução de salina estéril (NaCl 0,15 M) até a concentração de 2 mM e o pH ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil).

O Fluorocitrato [FCt (Sigma-Aldrich; # F9634)] foi preparado de acordo com o estudo de Costa et al., ¹²⁴ e Paulsen et al., ¹³⁹. Resumidamente, 2 mg de fluorocitrato de bário foram dissolvidos em 10 μ L de HCl 1M até formar uma solução homogênea e 0,1 mM de Na₂SO₄ foi adicionado gota a gota para precipitar os íons Ba⁺⁺. A seguir, foi adicionado 20 μ L de Na₂HPO₄ à 0,1 M e a solução foi centrifugada a 3000 rpm por 10min. O sobrenadante foi isolado e diluído em solução de salina estéril (NaCl 0,15 M) até a concentração final de 0,2 mM. Logo após, o pH foi ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil).

No momento do protocolo experimental, uma agulha (0,2 mm) conectada a uma microseringa de Hamington (50 μ L) foi introduzida na cânula guia do animal para microinjeção dos inibidores durante o registro cardiovascular. Os fármacos foram microinjetados na região da cisterna magna (ICM) em um volume fixo de 5 μ L.

3.6 Cateterização da artéria femoral:

Após o procedimento da estereotaxia, os animais tiveram 5 (cinco) dias de reabilitação pós-cirúrgica. Um dia antes dos experimentos fizemos, nos animais da abordagem *in vivo*, a cateterização da artéria para a obtenção dos registros cardiovasculares. Os cateteres foram confeccionados a partir de tubos de polietileno [PE-10 Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA (5 cm)], soldados a outro tubo de polietileno PE-50 de aproximadamente 18 cm. Antes de iniciarmos a cateterização, preenchemos o cateter com solução fisiológica [salina (0,9%)] e obstruímos com pino de metal a extremidade livre do PE-50.

Após a anestesia com a mistura de cloridrato de cetamina 10% e xilazina 2% (75 e 10 mg / kg, respectivamente, i.p.) e somente após a ausência de reflexos dos membros inferiores e da córnea foi iniciada a cirurgia, realizamos uma pequena incisão na região femoral, em seguida, separando a musculatura, localizamos o feixe vasculo-nervoso femoral. A Artéria femoral foi dissecada e isolada para posterior inserção e fixação do cateter. A extremidade livre do cateter foi dirigida subcutaneamente com o auxílio de um trocater para a cintura escapular, onde foi cuidadosamente exteriorizado e fixado com linha de sutura fina. Logo após, foi administrado o analgésico Flunixin [(Banamine 2,2 mg / kg, sc.), Schering Arado, SP, Brasil].

3.7 Registro simultâneo da PA e FC (abordagem *in vivo*):

No dia seguinte à canulação da artéria femoral, a cânula foi heparinizada e em seguida conectada a um transdutor de pressão (MLT 0380, AD-Instruments, NSW, Austrália). O sinal foi então transferido para um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, NSW, Austrália) e deste para o computador no qual se encontra instalado o software “Power Lab”

(Power Lab, AD-Instruments, NSW, Australia) para aquisição e análise dos sinais. Sendo assim, a pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg) foi medida diretamente da aorta abdominal dos animais não anestesiados, enquanto a pressão arterial média (PAM, mmHg) e a frequência cardíaca (FC, bpm) foram derivadas por meio de um biotacômetro digital acionado a partir dos pulsos de pressão arterial.

3.8 Análise dos parâmetros cardiovasculares:

Os parâmetros cardiovasculares foram analisados por meio do módulo *Blood Pressure* para o LabChart 8. Através do qual foi possível acessar os valores da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência Cardíaca (FC) nos tempos selecionados. A quantificação cardiovascular foi feita utilizando a média dos segundos anteriores (segundos - 0-1) e posteriores às microinjeções (segundos 1-10) dos inibidores DHK, L-AAA e FcT. Como resultado, foram obtidos os valores absolutos e a variação da resposta pressora e bradicárdica (Δ) da PAS, PAD, PAM e FC dos grupos.

3.9 Fármacos e soluções utilizadas:

- Losartana (Tratamento crônico) - 30mg/kg/dia (LOS) oral via gavagem [Antagonista seletivo AT1R¹⁹];
- Dihidroquinato - [DHK; 1 mM/5 μ L, intracisterna magna (TOCRIS, Bristol, Reino Unido)]- bloqueador seletivo para transportador de glutamato subtipo EAAT2/GLT1⁶⁹;

- Ácido L- α -aminoadípico - [L-AAA; 2 mM/5 μ L, intracisterna magna (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA)]- inibidor da enzima astrocítica glutamina sintetase¹³⁸;
- Sal Fluocitrato de bário - [FCT; 1 nmol/5 μ L, intracisterna magna (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA)]- inibidor reversível da atividade glial^{102,124};
- Solução salina estéril de NaCl 0,15 M [(0,9%)- veículo];
- Heparina – 10% (Parinex® 5000 U.I./mL - Laboratório Hipolabor Brasil);
- Cloridrato de cetamina 10% - 80 mg/kg corporal, ip;
- Cloridrato de Xilazina 2% – 7 mg/kg corporal, ip.
- Penicilina e Estreptomicina - 0,1 ml/100g intramuscular (1.200.000 UI, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil)¹⁰²;
- Banamine – 2,2 mg/kg corporal, subcutâneo (Flunixin, Schering Arado, SP, Brasil)¹⁰².

3.10 Pesagem corporal, renal e Histologia:

Ao final da abordagem *in vivo*, os animais foram novamente pesados e receberam microinjeção ICM do corante azul de Evans 2% (Vetec, Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) no volume de 5 μ L, para a determinação do sítio específico na cisterna magna. Na sequência, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina 10% e xilazina 2% (75 e 10 mg / kg, respectivamente, i.p.) e, após a ausência de reflexos, realizamos uma perfusão intracardíaca com solução de salina (0,15 M) seguida com solução formol (10%) tamponada. Os rins foram coletados, dissecados e pesados para, junto à pletismografia de cauda, confirmar o estabelecimento da HRv pela isquemia renal do rim direito clipado. O cérebro foi removido e a

porção do bulbo foi posicionada e visualizada em microscópio estereoscópio binocular com aumento de 7,5 x - 50 x (SP-ES200, SP Labor, presidente prudente, SP) para fotomicrografia da região bulbar.

3.11 Eutanásia para abordagem *in vitro*:

Na abordagem *in vitro*, após a confirmação do quadro hipertensivo, os animais foram pesados e receberam uma dose subliminar da mistura de cloridrato de cetamina 10% e xilazina 2% (75 e 10 mg / kg, respectivamente, i.p.) e após a ausência de reflexos foram sacrificados por decaptação em guilhotina adequada para roedores, com lâminas em aço Inox 420 com cerca de 200 mm de altura (Bonther, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP). Os cérebros foram coletados e seguiram para a quantificação proteica nos núcleos hipotalâmicos e bulbares. Os resíduos biológicos foram acomodados em sacos apropriados e descartados no freezer do Biotério do IPeFarM.

3.12 Quantificação de proteínas por Western Blotting (abordagem *in vitro*):

Após as 6 semanas de indução à HRv e da segunda medida das variáveis cardiovasculares por pletismografia de cauda, os ratos submetidos a este protocolo foram decapitados para remoção do cérebro, o qual foi imediatamente congelado em recipiente contendo gelo seco. Foram obtidas fatias coronais espessas [~800 a 1.000 µm (*punches*)] da região dos núcleos NTS, RVLM, SFO, PVN e Córtex. Os *punches* foram coletados em microtubo e imediatamente processados para extração proteica e eletroforese como descrito anteriormente por Almeida-Pereira et al.,¹⁴⁰. Inicialmente, as amostras

foram submetidas à homogeneização em 25 mL de tampão de extração [1% Triton-X 100, 100 mM/L Tris-HCl (pH 7,4), 10 µL/mL de coquetel para inibidores de proteases EDTA-free, 10 mM/L EDTA, 2 mM/L PMSF, à 4°C] e foram tamponadas para o pH 7,4. Os fragmentos celulares foram centrifugados por 40 minutos à 14.000.00 rpm à 4°C para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi coletado. A partir do sobrenadante, foi realizada a dosagem de proteína das amostras em duplicata, pelo método BCA (Protein Assay, Bio-Rad), em espectrofotômetro com comprimento de onda de 562 nm. Foram utilizadas 20 µg de proteína por poço. As amostras contendo as proteínas foram solubilizadas em tampão de amostra pH 6,8 (50% de glicerol, 250 mM de Tris 1M pH 6,8, SDS 10%, 500 mM de DTT, azul de bromofenol 0,5%) a 95°C por 5 minutos e aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE 12% com 0,75 mm de espessura. A eletroforese foi padronizada a 100V por 2 horas. As proteínas do gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose 0,45 mm Trans-Blot por meio do sistema de tanque ligado a 100V por 1:15 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (TBS-T e 10% de Leite, com exceção para o GLAST que foi feito em 10% de albumina) por 1h e 30 minutos. Após 3 lavagens de 5 minutos com solução TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo primário GFAP [1:200.000 (#G9269, Sigma-Aldrich, USA)], GLT1/ EAAT2 [1:500 (#WH0006507M10, Sigma-Aldrich, USA)], GLAST/ EAAT1 [1:5000 (#ab127026, Abcam, EUA)], GS [1:2000.000 (#G2781, Sigma-Aldrich, USA) ou β -actina [1:40.000 (#4970, Cell Signaling Technology, USA)] em solução contendo TBS-T e leite 5% (com exceção para GLAST que foi albumina 5%). A incubação ocorreu sob agitação, a 4°C, *overnight*. Posteriormente, a membrana foi submetida a 3 lavagens de 5 minutos com

solução TBS-T e incubada com anticorpo secundário (anti- goat HRP e anti-rb HRP, Santa Cruz biotechnology, Dallas, Texas, EUA) em solução contendo TBS-T e leite 5% (com exceção para GLAST que foi albumina 5%). A incubação ocorreu sob agitação em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada em solução TBS-T e incubada por 6 minutos com os reagentes do kit de quimiluminescência amplificada (ECL Plus, AmerSHAM Biosciences). A detecção por quimioluminescência foi realizada em sistema de detecção Chemidoc XRS + Imaging System (Bio-Rad), com exposição de 30 segundos e as imagens foram capturadas em intervalos de 5 segundos.

3.13 Análise estatística:

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (MEAN $\pm$ EPM). Após a análise do padrão de distribuição normal, foi feita a quantificação ANOVA (Two-Way para a análise *in vivo* e One-Way para a análise molecular) seguido pelo pós-teste de Tukey. As análises do coeficiente de correlação (r) foram realizadas usando a estatística de Pearson ¹⁴¹. A diferença entre as médias foi considerada significativa quando $p < 0,05$. Nos gráficos de correlação foram utilizadas as equações de regressão (p) entre a expressão dos diferentes marcadores da atividade astrogliar (GFAP, GLT1, GLAST e GS) no NTS e RVLM com a PAS (mmHg) dos animais SHAM e 2R1C. Os dados foram analisados e plotados em gráficos por meio do programa GraphPad Prism versão 6.1.

3.14 Delineamento experimental: Parte I – Análise *in vivo*

Foram utilizados entre 5 - 8 oito ($n \leq 8$) animais por grupo para cada protocolo experimental. Os animais foram divididos em três grupos distribuídos da seguinte forma: grupo SHAM; grupo 2R1C; grupo 2R1C + Losartana 30 mg/kg/dia (2R1C/LOS).

3.14.1 Efeito da microinjeção ICM do bloqueador dos transportadores de glutamato astrócíticos (DHK), do inibidor da glutamina sintetase (L-AAA) e do inibidor glial (FCt) sobre os parâmetros cardiovasculares basais de ratos SHAM e 2R1C não anestesiados.

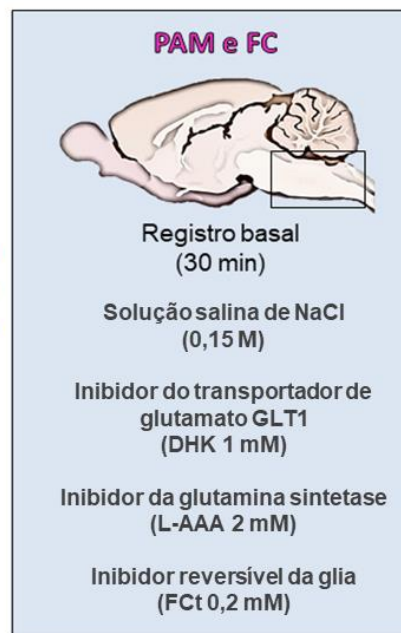
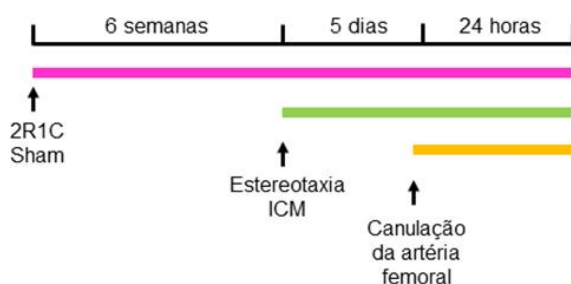
O estudo com os animais SHAM e 2R1C teve duração de 7 (sete) semanas a partir da implantação do clipe de prata (2R1C) ou apenas procedimentos cirúrgicos controle (SHAM) nos animais. Do total de tempo, 6 (seis) semanas foram necessárias para o desenvolvimento da hipertensão nos animais clipados, após esse período, os animais foram submetidos à cirurgia de estereotaxia para o implante de uma cânula-guia na região ICM e permaneceram 5 (cinco) dias em suas caixas para a recuperação (período pós-cirúrgico) (item 3.4). Ao final deste tempo os animais foram anestesiados e tiveram a artéria femoral canuladas (item 3.6), após 24 horas verificou-se os parâmetros cardiovasculares basais onde buscamos avaliar a PAM (mmHg) e FC (bpm) dos animais livres do efeito da anestesia e analgesia, uma vez que diversos estudos mostraram que as respostas cardiovasculares e os mecanismos glutamatérgicos centrais são alterados sob o efeito dos anestésicos.¹⁴²⁻¹⁴⁶

No dia do experimento o cateter inserido na artéria femoral dos animais foi conectado ao transdutor de pressão. Após a ambientação e estabilização

dos parâmetros cardiovasculares (~30 min.) foram realizadas as microinjeções ICM (item 3.7). Todos os inibidores foram microinjetados em um volume fixo de 5 uL, com intervalos de 5-6 minutos entre as microinjeções.

Para avaliar a função de recaptação de glutamato pelos astrócitos bulbares, realizamos a microinjeção de DHK [1 mM⁶⁹], um inibidor do transportador de glutamato astrocítico do subtipo GLT1. Aproximadamente 5 (cinco) minutos depois, para avaliar a função da conversão do glutamato feita pela enzima astrocítica GS, realizamos a microinjeção de L-AAA [2 mM¹³⁸], um inibidor específico da atividade da GS. Após 5 (cinco) minutos, para avaliar a disfunção glial, realizamos a microinjeção de FCt [0,2 mMol¹²⁴], um inibidor reversível da atividade da glia.

Design experimental- 1
Grupos: Sham e 2R1C

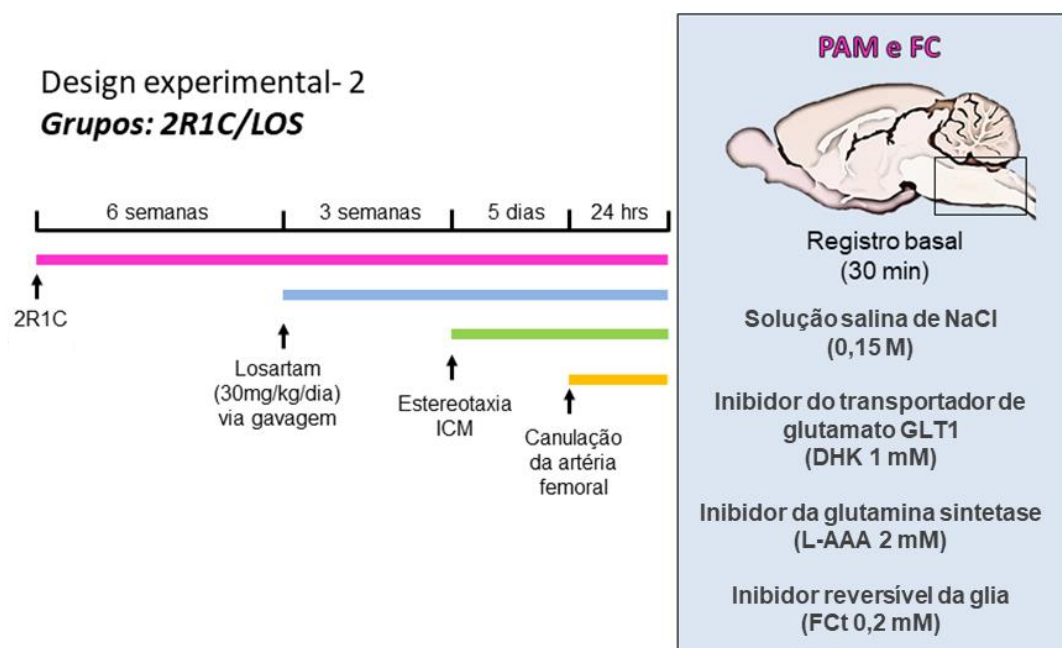


O objetivo deste protocolo foi avaliar a função de recaptação e conversão de glutamato pelos astrócitos e da atividade astrocítica sobre a modulação cardiovascular no bulbo de ratos SHAM e 2R1C não anestesiados.

3.14.2 Efeito do tratamento com losartana sobre os parâmetros cardiovasculares basais e as respostas cardiovasculares à microinjeção ICM do bloqueador dos transportadores de glutamato astrocíticos (DHK), do inibidor da glutamina sintetase (L-AAA) e do inibidor glial (FCt) em ratos 2R1C não anestesiados.

Para avaliar se, de fato, a ativação da Ang-II endógena (via receptor AT1) está envolvida nas alterações das respostas cardiovasculares à microinjeção ICM dos inibidores gliais em ratos 2R1C, no protocolo seguinte nós tratamos os animais com Losartana (30 mg/kg por dia). Nesse grupo (2R1C/LOS), realizamos o registro indireto da pressão arterial através da pletismografia de cauda antes e após a 6ª semana da cirurgia 2R1C de indução da hipertensão renovascular. Em seguida, após a confirmação da HRv por pletismografia, foi iniciado o tratamento via gavagem de Losartana [30mg/kg/mL/dia¹⁹], um inibidor específico do receptor AT1 da Ang-II, durante 4 semanas. Três semanas após o início do tratamento do Losartana, os animais foram submetidos à cirurgia de estereotaxia para o implante de uma cânula-guia na região ICM (item 3.4). Após 5 dias da cirurgia de estereotaxia e recuperação cirúrgica dos animais, esses foram anestesiados para a cirurgia de canulação da artéria femoral (item 3.6). Após 24 horas, com os animais em livre movimentação, realizamos os protocolos de registro cardiovascular (item

3.7). Após a ambientação e estabilização dos parâmetros cardiovasculares (~30 min.), realizamos as microinjeções ICM. Todos os fármacos foram microinjetados em intervalo de 5-6 minutos em um volume de 5 uL, sendo as mesmas soluções descritas no protocolo experimental anterior. Inicialmente a microinjeção controle da solução salina (0,15 M), seguida das microinjeções de DHK [1 mM ⁶⁹], de L-AAA [2 mM ¹³⁸] e de FCt [0,2 mM ¹²⁴].



O objetivo deste protocolo foi avaliar se o tratamento com Losartana promoveria alterações nas respostas cardiovasculares à microinjeção ICM de DHK, L-AAA e FCt em ratos 2R1C não anestesiados.

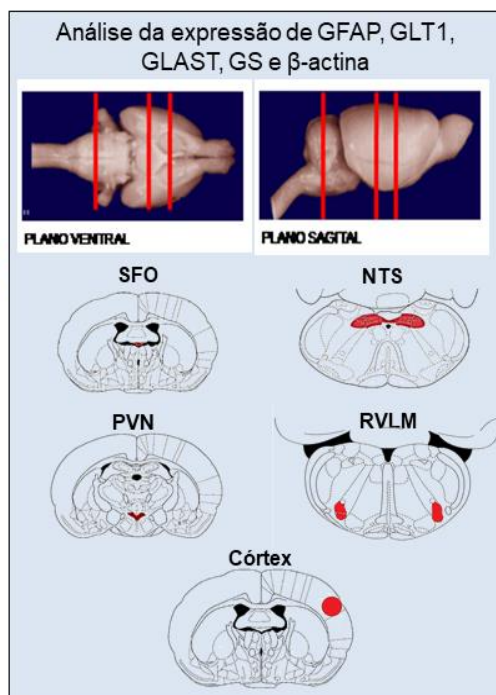
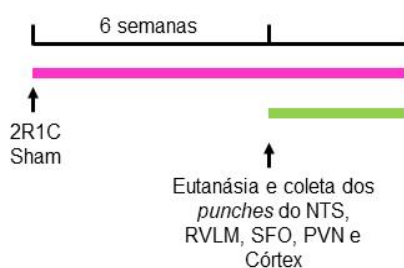
3.15 Delineamento experimental: Parte II – Análise *in vitro*

3.15.1 Análise do perfil da expressão proteica da proteína glial fibrillary acid (GFAP), dos transportadores de glutamato astrogliais

(GLAST/EAAT1, GLT1/EAAT2) e da enzima glutamina sintetase (GS) nos núcleos do NTS, RVLM, SFO e PVN de ratos SHAM e 2R1C.

Após a confirmação do quadro hipertensivo por pletismografia de cauda, os animais SHAM e com 2R1C receberam uma dose subliminar da mistura de cloridrato de cetamina e xilazina (75 e 10 mg / kg, respectivamente, i.p.) e após a ausência de reflexos, foram decaptados com o auxílio de uma guilhotina. O encéfalo e o tronco encefálico foram cuidadosamente removidos e imediatamente congelados em gelo seco. Na sequência, foi realizada a retirada de *punches* bilaterais na região do NTS, RVLM, SFO, PVN e córtex. Os *punches* coletados foram imediatamente tratados para a extração proteica e posterior análise da expressão dos marcadores dos mecanismos glutamatérgicos astrocíticos por meio da técnica de *Western Blotting*.

Design experimental- 3
Grupos: Sham e 2R1C



O objetivo desse protocolo foi avaliar a expressão proteica da proteína *glial fibrillary acid* (GFAP), dos transportadores de glutamato astrogliais (GLAST, GLT1) e da enzima glutamina sintetase (GS) nos núcleos bulbares NTS, RVLM e hipotalâmicos SFO e PVN envolvidos na modulação cardiovascular em ratos SHAM e 2R1C.

Resultados|

4 Resultados

4.1 Parte I - Estudos *in vivo*

4.1.1 Análise não invasiva da pressão arterial de cauda dos animais

SHAM e 2R1C:

A figura 1 mostra os resultados obtidos através da análise da pressão arterial por pletismografia de cauda, realizadas antes (semana zero) e na 6ª semana após a cirurgia SHAM ou 2R1C. Não observamos alteração na pressão arterial de cauda (PAC; mmHg) após a 6ª semana da cirurgia SHAM ($153 \pm 4,7$ vs. $132 \pm 2,7$ mmHg), mas observamos aumento na PAC dos animais 2R1C ($206 \pm 7,3$ vs. $131 \pm 1,4$ mmHg, $p=0,0001$) em relação a semana zero e em relação aos animais SHAM ($p=0,001$). Após esta análise não invasiva, os animais 2R1C foram subdivididos em grupo 2R1C e grupo 2R1C/LOS. Na sequência, os animais do grupo 2R1C/LOS seguiram para o tratamento com losartana por gavagem (30mg/kg diária) durante 4 semanas.

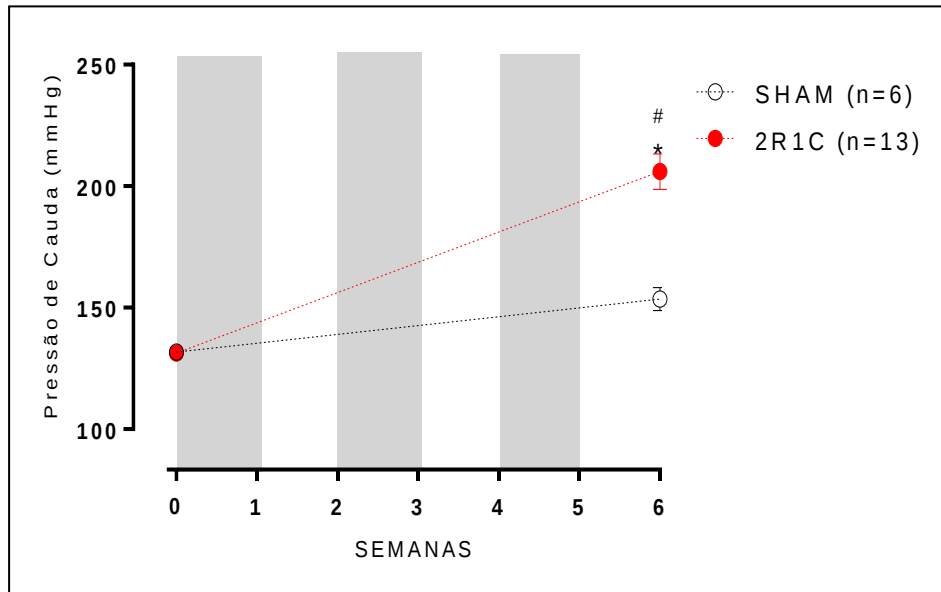


Figura 1 | Pressão de cauda (mmHg) por pletismografia antes (semana zero) e após 6 semanas da cirurgia de SHAM e 2R1C. Os dados foram analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós teste de Tukey e expressos como MÉDIAS $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. semana 0. # $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C na semana 6.

4.1.2 Análise dos pesos corporais e renais dos animais SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS:

Os pesos corporais (g) e renais (g) dos animais estão apresentados resumidos na tabela I. Não houve alteração significativa na variação do peso corporal dos animais 2R1C em relação ao grupo SHAM. Entretanto houve um aumento na variação do peso corporal nos animais 2R1C/LOS, quando comparado aos animais SHAM, mas não quando comparado aos animais 2R1C. Observamos redução no peso do rim direito clipado dos animais 2R1C e 2R1C/LOS em relação aos animais SHAM, evidenciando a isquemia renal nesses animais (tabela I).

Tabela 1| Pesos corporais e renais dos diferentes grupos submetidos a abordagem *in vivo*.

	Δ Peso corporal (g)	Peso do rim esquerdo (g)	Peso do rim direito clipado (g)
Sham (n=8)	85,4 $\pm$ 5,1	1,7 $\pm$ 0,05	1,7 $\pm$ 0,05
2R1C (n=5)	91,4 $\pm$ 17,4	1,7 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2*
2R1C/LOS (n=8)	131 $\pm$ 15*	1,9 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,17*

*p < 0.05 vs. grupo Sham.

4.1.3 Análise da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basal (método direto) dos ratos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS:

Os painéis A-B da figura 2 mostram os valores basais da PAM [(mmHg) Fig. 2A] e da FC [(bpm) Fig. 2B] pelo método invasivo, nos diferentes grupos após o tratamento com veículo ou losartana. Podemos observar que houve aumento na PAM (mmHg) basal nos animais 2R1C [(178 ± 16,3 vs. 114,2 ± 2,8mmHg, $p=0,004$) (Fig. 2A)], enquanto que o tratamento com losartana reduziu esse aumento na PAM [(116,3 ± 6,6 vs. 178 ± 16,3mmHg, $p=0,008$) (Fig. 2A)]. Não observamos alterações significativas na FC basal dos animais 2R1C [(336,6 ± 15,7 vs. 323,8 ± 6,5 bpm) (Fig. 2B)] ou dos animais 2R1C/LOS. [(341,9 ± 17,85 vs. 336,6 ± 15,7bpm) (Fig. 2B)].

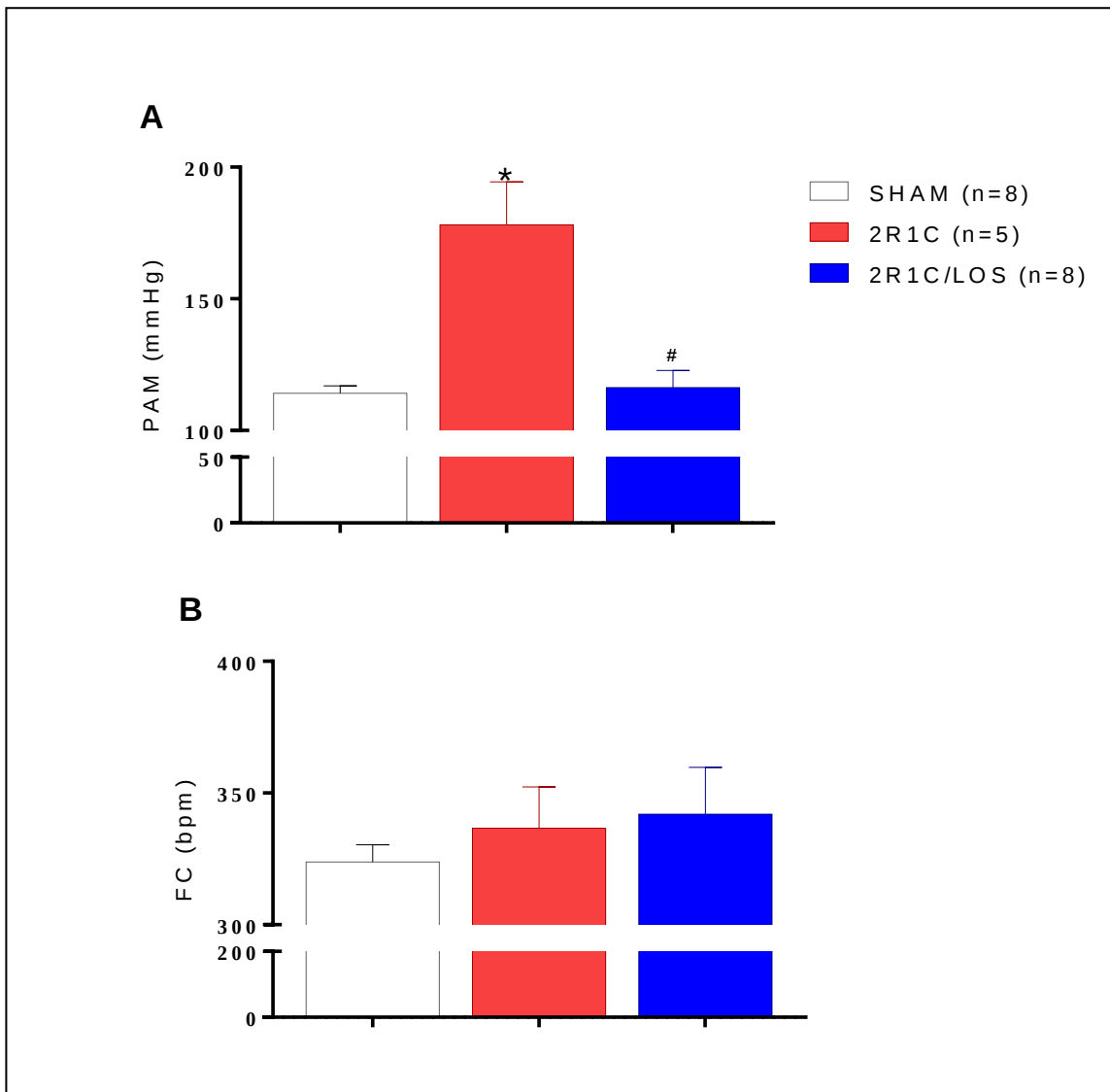


Figura 2 | Valores basais da PAM [(mmHg) *Painel A*] e FC [(bpm) *Painel B*] de ratos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS (30mg/kg/ml/dia durante 4 semanas) não anestesiados. Os dados foram analisados pelo ANOVA One-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey e expressos como MÉDIAS $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ vs. grupo SHAM; # $p < 0.05$ vs. grupo 2R1C.

4.1.4 Efeitos da microinjeção ICM do veículo solução salina (NaCl 0,15 M) sobre aos parâmetros cardiovasculares de ratos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS:

As figuras 3, 4 e 5 mostram as respostas cardiovasculares à microinjeção ICM de solução salina estéril (NaCl 0,15M) em ratos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. Os traçados dos registros da PAP (mmHg), PAM (mmHg) e FC (bpm) de um rato representativo de cada grupo encontram-se na figura 3. Observamos que a microinjeção ICM de solução salina (NaCl 0,15 M) não promoveu alterações imediatas na PAM dos animais SHAM (120 ± 4 vs. 122 ± 4 mmHg), dos animais 2R1C (174 ± 15 vs. 171 ± 15 mmHg) ou dos animais 2R1C/LOS (120 ± 6 vs. 120 ± 6 mmHg), também não promoveu alterações adicionais nos diferentes tempos (Fig. 4A). Houve um aumento na variação da resposta pressora da PAM nos animais 2R1C ($\Delta 3 \pm 2$ vs. -3 ± 1 mmHg; $p < 0,05$) que se seguiu nos segundos 2, 6, 7, 8 e 9, quando comparado aos animais SHAM (Fig. 4B). Mas não houve alteração na PAM dos animais 2R1C/LOS ($\Delta 0 \pm 2$ vs. 3 ± 2 mmHg) quando comparada aos animais 2R1C (Fig. 4B). A microinjeção ICM da solução salina (NaCl 0,15 M) também não alterou a PAM basal (no total dos 10 segundos) nos animais SHAM (122 ± 4 vs. 122 ± 4 mmHg), nos animais 2R1C (174 ± 15 vs. 171 ± 15 mmHg) e nos animais 2R1C/LOS (121 ± 7 vs. 120 ± 6 mmHg) (Fig. 4C). Adicionalmente, não observamos alteração na variação pressora (no total dos 10 segundos) nos animais 2R1C ($\Delta 3 \pm 1$ vs. $-1 \pm 0,8$ mmHg) quando comparados aos animais SHAM. Tampouco nos animais 2R1C/LOS ($\Delta 0,4 \pm 1$ vs. 3 ± 1 mmHg) quando comparados aos animais 2R1C (Fig. 4D).

Após a microinjeção de ICM de solução salina (NaCl 0,15 M) a FC se manteve inalterada nos animais SHAM (328 ± 7 vs. 318 ± 9 mmHg), nos animais 2R1C (332 ± 16 vs. 335 ± 19 mmHg) e nos animais 2R1C/LOS (348 ± 22 vs. 346 ± 21 mmHg) (Fig. 5A). Também não houve alterações na variação da resposta da FC nos animais 2R1C ($\Delta -3 \pm 4$ vs. 10 ± 6 mmHg) quando comparada aos animais SHAM (Fig. 5B). Tampouco alteração na FC dos animais 2R1C/LOS ($\Delta 2 \pm 1$ vs. -3 ± 4 mmHg) quando comparada aos animais 2R1C (Fig. 5B). A microinjeção ICM da solução salina (NaCl 0,15 M) também não alterou a FC basal (no total dos 10 segundos) nos animais SHAM (323 ± 7 vs. 318 ± 9 mmHg), nos animais 2R1C (331 ± 15 vs. 335 ± 17 mmHg) e nos animais 2R1C/LOS (347 ± 23 vs. 346 ± 21 mmHg) (Fig. 5C). Adicionalmente, não observamos alteração na variação pressora (no total dos 10 segundos) dos animais 2R1C ($\Delta -5 \pm 4$ vs. -2 ± 3 mmHg) quando comparados aos animais SHAM. Tampouco nos animais 2R1C/LOS ($\Delta 1 \pm 1$ vs. -5 ± 4 mmHg) quando comparados aos animais 2R1C (Fig. 5D).

Os dados da PAM e da FC, nos diferentes tempos, encontram-se no apêndice B, tabelas 1 e 2, respectivamente. Adicionalmente, os valores da PAS e a PAD encontram-se no apêndice B, figura A 1 e tabelas 3 e 4.

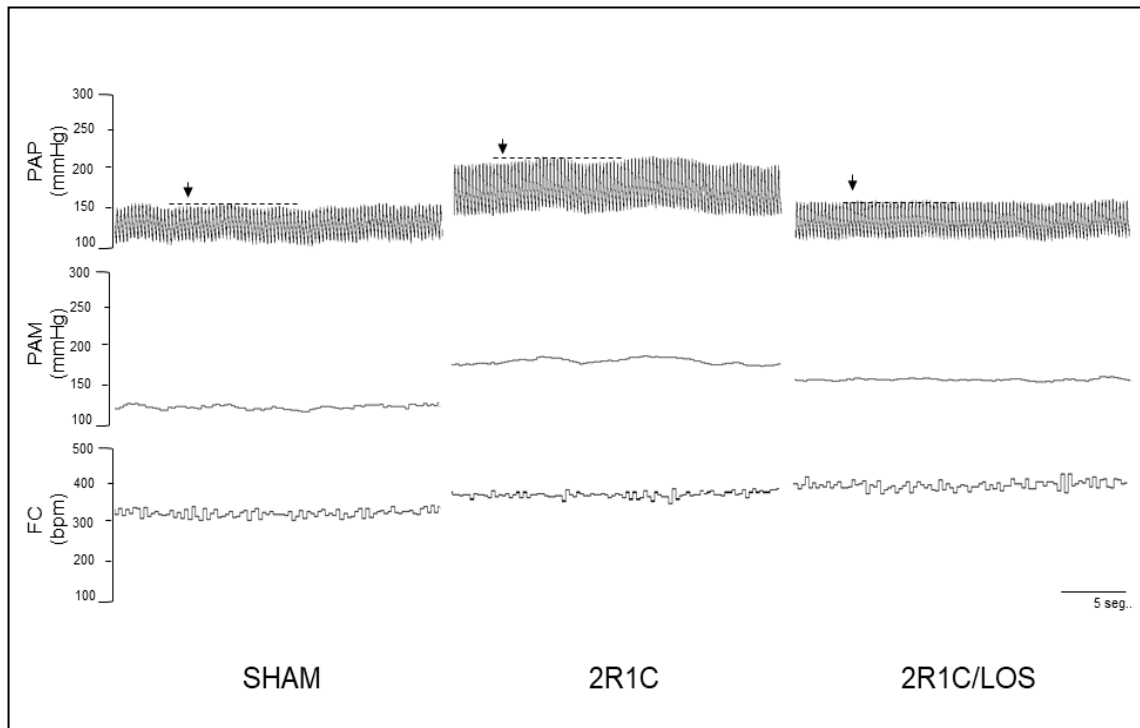


Figura 3 | Traçados cardiovasculares representativos de um rato não anestesiado dos grupos SHAM (n=8), 2R1C (n=5) e 2R1C/LOS (n=8), mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) basais após a microinjeção ICM de solução salina (NaCl 0,15 M/5 μ L). As setas indicam a microinjeção de salina nos diferentes animais.

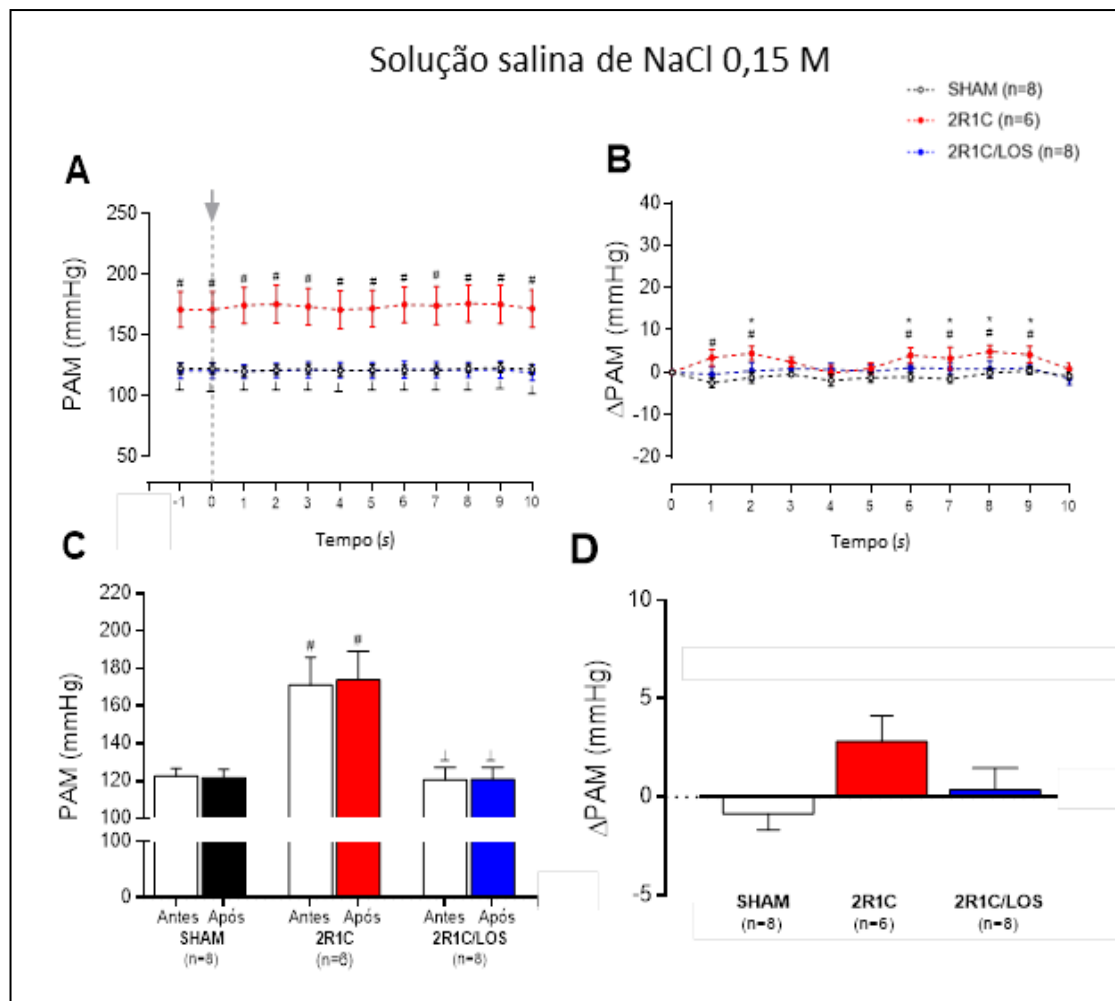


Figura 4| Alterações na pressão arterial média (PAM, mmHg) promovidas pela microinjeção ICM de solução salina (NaCl 0,15M) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da PAM basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da resposta pressora (Δ PAM, mmHg) após a microinjeção. *Painel C:* Valores da PAM basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D:* Média da variação da resposta pressora (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. $\pm p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C.

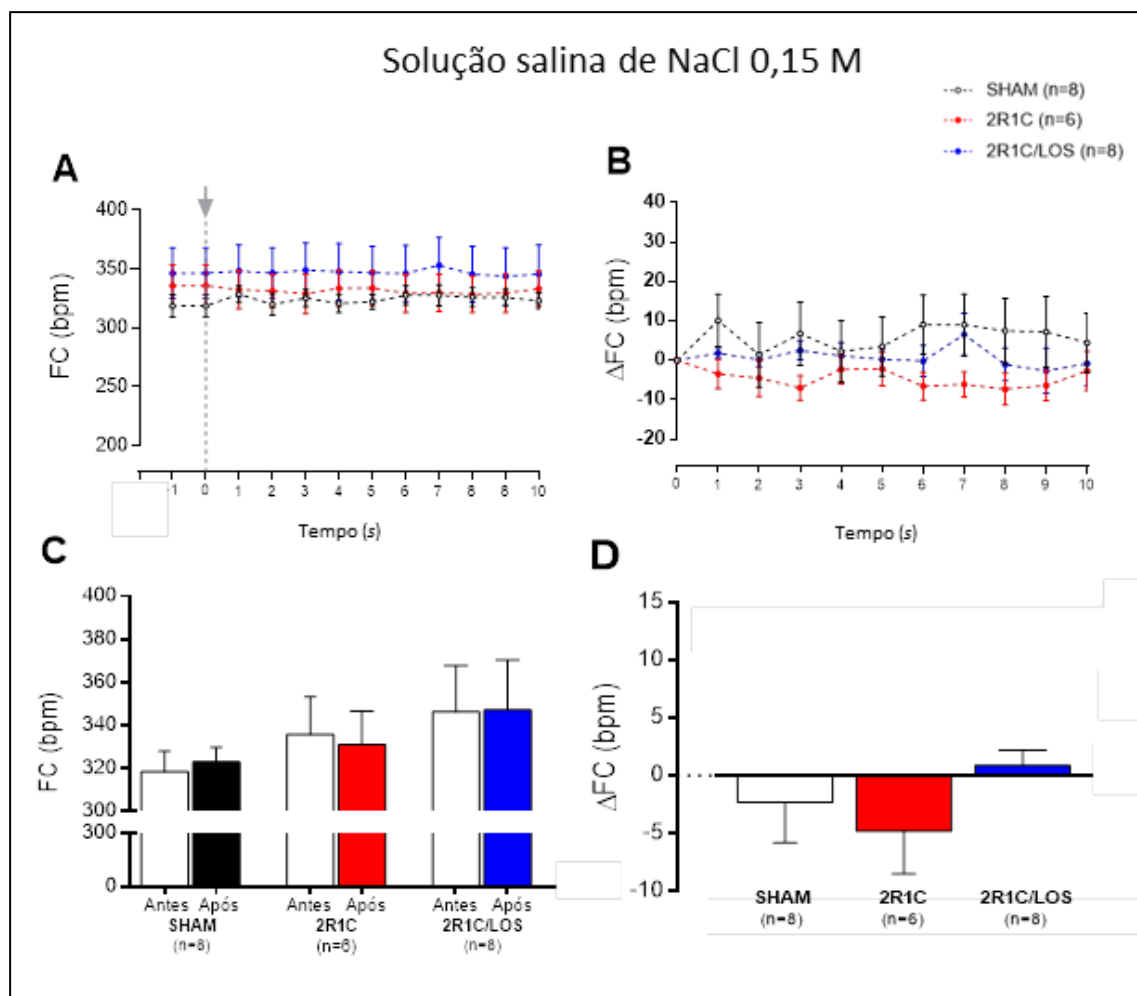


Figura 5 | Alterações na frequência cardíaca (FC, bpm) promovidas pela microinjeção ICM de solução salina (NaCl 0,15M) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da FC basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da resposta de bradicardia (Δ FC, bpm) após a microinjeção. *Painel C:* Valores da FC basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D:* Média da variação da resposta de bradicardia (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM; † $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C.

4.1.5 Efeitos da microinjeção ICM do inibidor do transportador de GLT1/EAAT2, DHK (1mM), sobre aos parâmetros cardiovasculares de ratos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS:

As figuras 6, 7 e 8 mostram as respostas cardiovasculares à microinjeção ICM de DHK (1mM) em ratos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. Os traçados dos registros da PAP (mmHg), PAM (mmHg) e FC (bpm) de um rato representativo de cada grupo encontram-se na figura 6. A microinjeção de ICM de DHK (1mM), não promoveu alterações imediatas na PAM dos animais SHAM (121 ± 4 vs. 119 ± 4 mmHg), dos animais 2R1C (172 ± 12 vs. 172 ± 12 mmHg) ou dos animais 2R1C/LOS (128 ± 8 vs. 124 ± 6 mmHg), também não promoveu alterações adicionais nos diferentes tempos (Fig. 7A). Não houve alteração imediata na variação da resposta pressora dos animais 2R1C ($\Delta 0 \pm 3$ vs. 2 ± 1 mmHg) quando comparada aos animais SHAM, tampouco nos tempos seguintes (Fig. 7B). Além disso, não houve alteração na PAM dos animais 2R1C/LOS ($\Delta 4 \pm 3$ vs. 0 ± 3 mmHg) quando comparada aos animais 2R1C (Fig. 7B). A microinjeção ICM de DHK (1mM) também não alterou a PAM basal (no total dos 10 segundos) nos animais SHAM (120 ± 3 vs. 119 ± 3 mmHg), nos animais 2R1C (166 ± 10 vs. 155 ± 6 mmHg) e nos animais 2R1C/LOS (121 ± 5 vs. 120 ± 5 mmHg) (Fig. 7C). Adicionalmente, não observamos alteração na variação pressora (no total dos 10 segundos) dos animais 2R1C ($\Delta 3 \pm 1$ vs. 2 ± 1 mmHg) quando comparados aos animais SHAM. Tampouco nos animais 2R1C/LOS ($\Delta 0,3 \pm 0,5$ vs. 3 ± 1 mmHg) quando comparados aos animais 2R1C (Fig. 7D).

Após a microinjeção de ICM de DHK (1mM) não observamos alterações imediatas na FC dos animais SHAM (317 ± 23 vs. 335 ± 11 mmHg), dos animais 2R1C (326 ± 14 vs. 337 ± 9 mmHg) ou dos animais 2R1C/LOS (347 ± 16 vs. 355 ± 16 mmHg), também não promoveu alterações adicionais nos diferentes tempos (Fig. 8A). Não houve alterações na variação da resposta da FC nos animais 2R1C ($\Delta 5 \pm 4$ vs. -5 ± 6 mmHg) quando comparada aos animais SHAM (Fig. 8B), tampouco nos animais 2R1C/LOS ($\Delta -2 \pm 3$ vs. 5 ± 4 mmHg) quando comparada aos animais 2R1C (Fig. 8B). A microinjeção ICM de DHK (1mM) também não alterou a FC basal (no total dos 10 segundos) nos animais SHAM (329 ± 16 vs. 335 ± 12 mmHg), nos animais 2R1C (327 ± 20 vs. 338 ± 10 mmHg) e nos animais 2R1C/LOS (347 ± 16 vs. 354 ± 16 mmHg) (Fig. 8C). Adicionalmente, não observamos alteração na variação da bradicardia (no total dos 10 segundos) nos animais 2R1C ($\Delta -0,5 \pm 4$ vs. $0,2 \pm 5$ mmHg) quando comparados aos animais SHAM. Tampouco nos animais 2R1C/LOS ($\Delta -0,2 \pm 5$ vs. $-0,5 \pm 4$ mmHg) quando comparados aos animais 2R1C (Fig. 8D).

Os dados da PAM e da FC, nos diferentes tempos, encontram-se no apêndice C, tabelas 5 e 6, respectivamente. Adicionalmente, os valores da PAS e a PAD encontram-se no apêndice C, figura A 2 e tabelas 7 e 8.

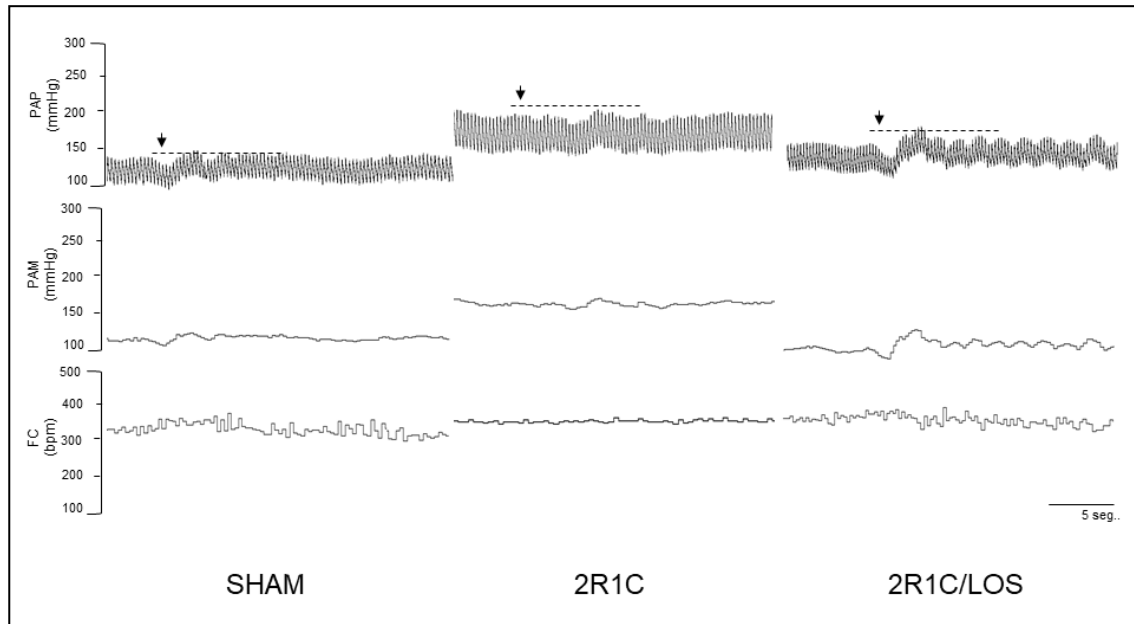


Figura 6 | Traçados cardiovasculares representativos de um rato não anestesiado dos grupos SHAM (n=8), 2R1C (n=5) e 2R1C/LOS (n=8), mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) basais após a microinjeção ICM de DHK (1mM/ 5 μ L). As setas indicam a microinjeção ICM de DHK nos diferentes animais.

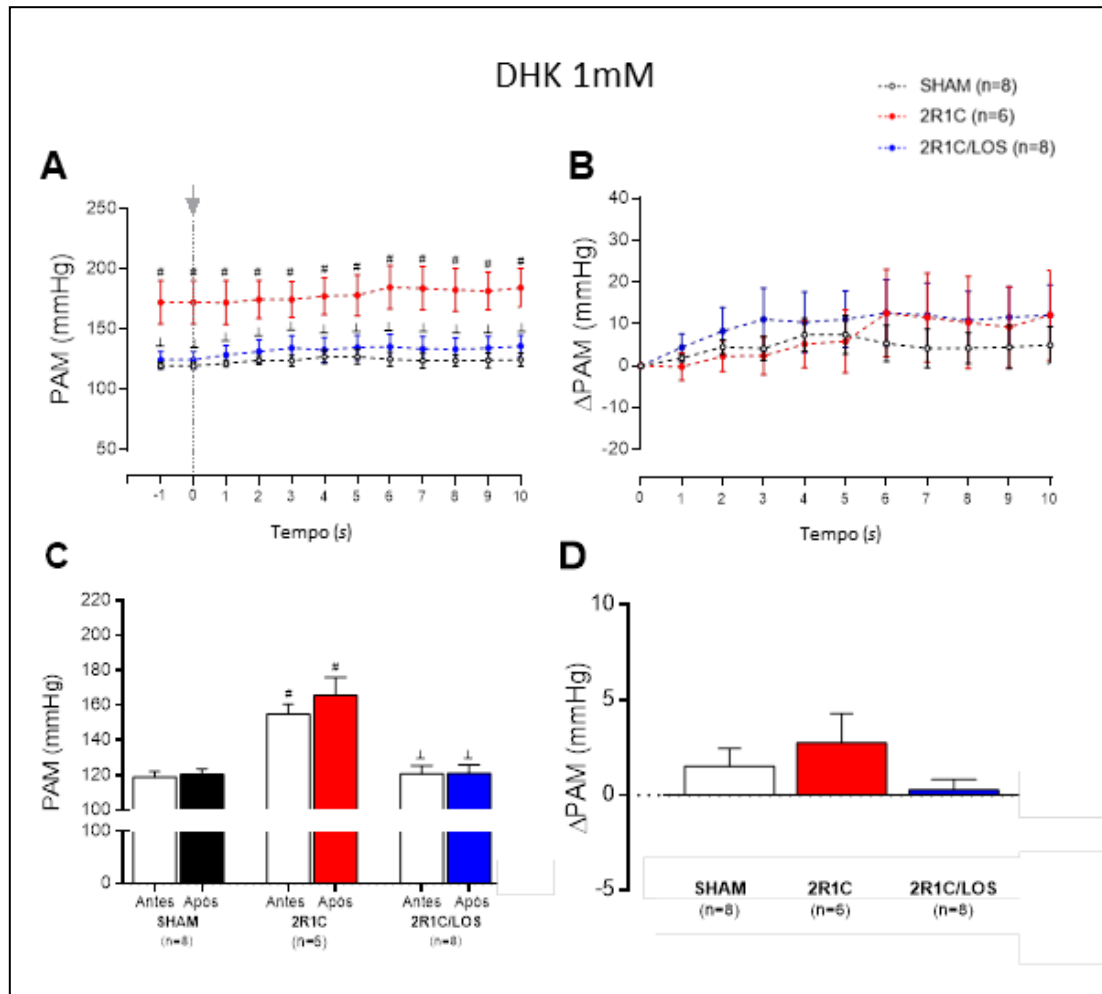


Figura 7 | Alterações na pressão arterial média (PAM, mmHg) promovidas pela microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da PAM basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da resposta pressora (Δ PAM, mmHg) após a microinjeção. *Painel C:* Valores da PAM basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D:* Média da variação da resposta pressora (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA *Two-Way* e dos painéis C e D pelo ANOVA *One-Way*. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. $^{\dagger}p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C.

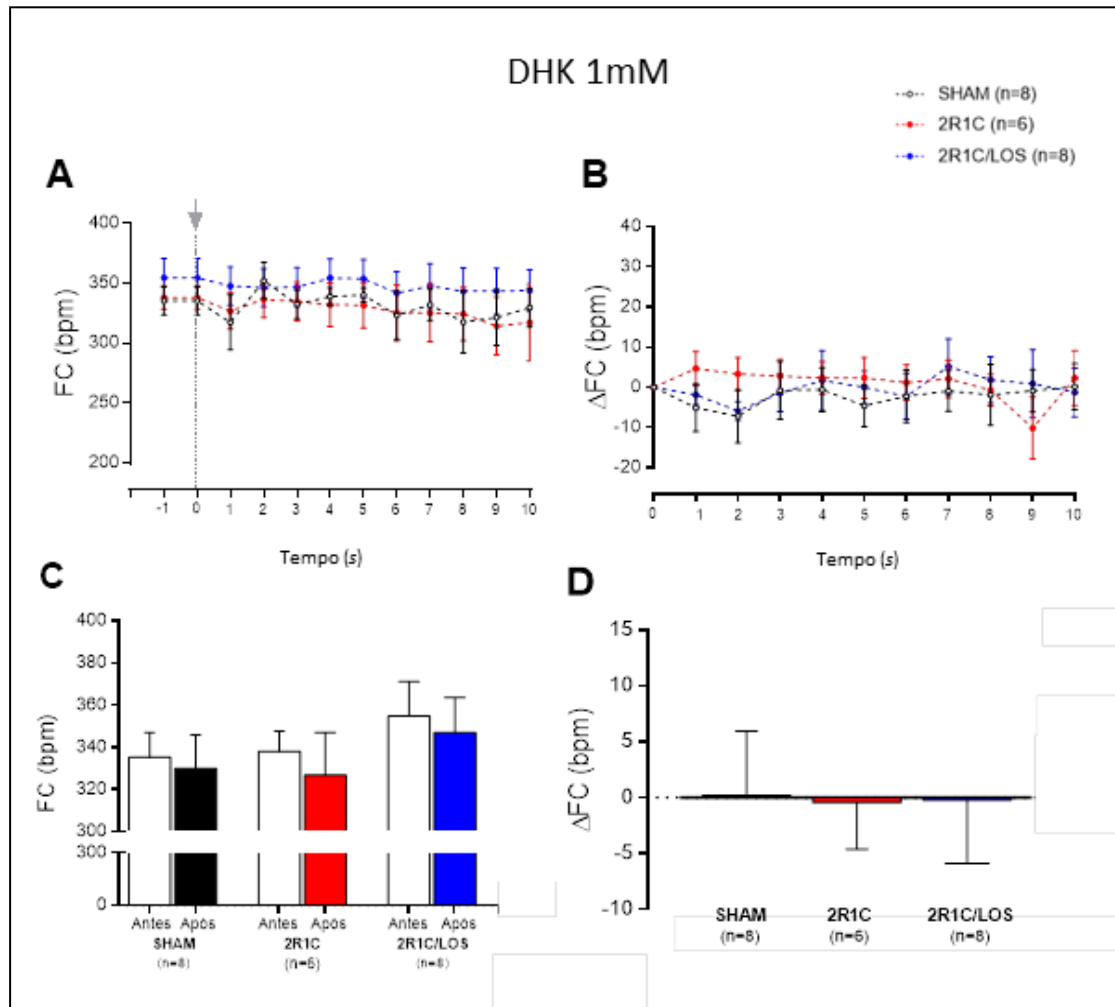


Figura 8 | Alterações na frequência cardíaca (FC, bpm) promovidas pela microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da FC basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da resposta de bradicardia (Δ FC, bpm) após a microinjeção. *Painel C:* Valores da FC basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D:* Média da variação da resposta de bradicardia (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. † $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C.

4.1.6 Efeitos da microinjeção ICM do inibidor da enzima glutamina sintetase, L-AAA (2mM), sobre aos parâmetros cardiovasculares de ratos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS:

As figuras 9, 10 e 11 mostram as respostas cardiovasculares à microinjeção ICM de L-AAA (2 mM) em ratos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. Os traçados dos registros da PAP (mmHg), PAM (mmHg) e FC (bpm) de um rato representativo de cada grupo encontram-se na figura 9. Observamos que a microinjeção ICM de L-AAA (2 mM) não promoveu alterações imediatas na PAM dos animais SHAM (115 ± 6 vs. 115 ± 5 mmHg), dos animais 2R1C (164 ± 12 vs. 165 ± 12 mmHg) ou dos animais 2R1C/LOS (121 ± 6 vs. 119 ± 6 mmHg), também não promoveu alterações adicionais nos diferentes tempos (Fig. 10 A). Não houve alteração na variação da resposta pressora da PAM nos animais 2R1C ($\Delta -1 \pm 2$ vs. 1 ± 2 mmHg) quando comparada aos animais SHAM (Fig. 10 B), tampouco nos animais 2R1C/LOS ($\Delta 2 \pm 2$ vs. -1 ± 2 mmHg) quando comparada aos animais 2R1C (Fig. 10 B). A microinjeção ICM de L-AAA (2 mM) também não alterou a PAM basal (no total dos 10 segundos) nos animais SHAM (120 ± 3 vs. 115 ± 5 mmHg), nos animais 2R1C (168 ± 18 vs. 165 ± 16 mmHg) e nos animais 2R1C/LOS (123 ± 6 vs. 120 ± 6 mmHg) (Fig. 10 C). Adicionalmente, não observamos alteração na variação pressora (no total dos 10 segundos) nos animais 2R1C ($\Delta 4 \pm 2$ vs. 2 ± 1 mmHg) quando comparados aos animais SHAM. Tampouco nos animais 2R1C/LOS ($\Delta 3 \pm 1$ vs. 4 ± 2 mmHg) quando comparados aos animais 2R1C (Fig. 10 D).

Após a microinjeção de ICM de L-AAA (2 mM) não observamos alterações imediatas na FC dos animais SHAM (308 ± 20 vs. 309 ± 19 mmHg), dos animais 2R1C (330 ± 6 vs. 332 ± 6 mmHg) ou dos animais 2R1C/LOS (367

± 21 vs. 369 ± 21 mmHg), também não promoveu alterações adicionais nos diferentes tempos (Fig. 11 A). Não houve alterações na variação da resposta de bradicardia nos animais 2R1C ($\Delta 5 \pm 4$ vs. -1 ± 7 mmHg) quando comparada aos animais SHAM (Fig. 11 B), tampouco nos animais 2R1C/LOS ($\Delta -2 \pm 3$ vs. 5 ± 4 mmHg) quando comparada aos animais 2R1C (Fig. 11 B). A microinjeção ICM de L-AAA (2 mM) também não alterou a FC basal (no total dos 10 segundos) nos animais SHAM (321 ± 12 vs. 328 ± 8 mmHg), nos animais 2R1C (333 ± 6 vs. 332 ± 6 mmHg) e nos animais 2R1C/LOS (368 ± 20 vs. 370 ± 21 mmHg) (Fig. 11 C). Adicionalmente, não observamos alteração na variação da bradicardia (no total dos 10 segundos) nos animais 2R1C ($\Delta 1 \pm 4$ vs. -1 ± 4 mmHg) quando comparados aos animais SHAM. Tampouco nos animais 2R1C/LOS ($\Delta 0,1 \pm 6$ vs. 1 ± 4 mmHg) quando comparados aos animais 2R1C (Fig. 11 D).

Os dados da PAM e da FC, nos diferentes tempos, encontram-se no apêndice D, tabelas 7 e 8, respectivamente. Adicionalmente, os valores da PAS e a PAD encontram-se no apêndice D, figura A 3 e tabelas 9 e 10.

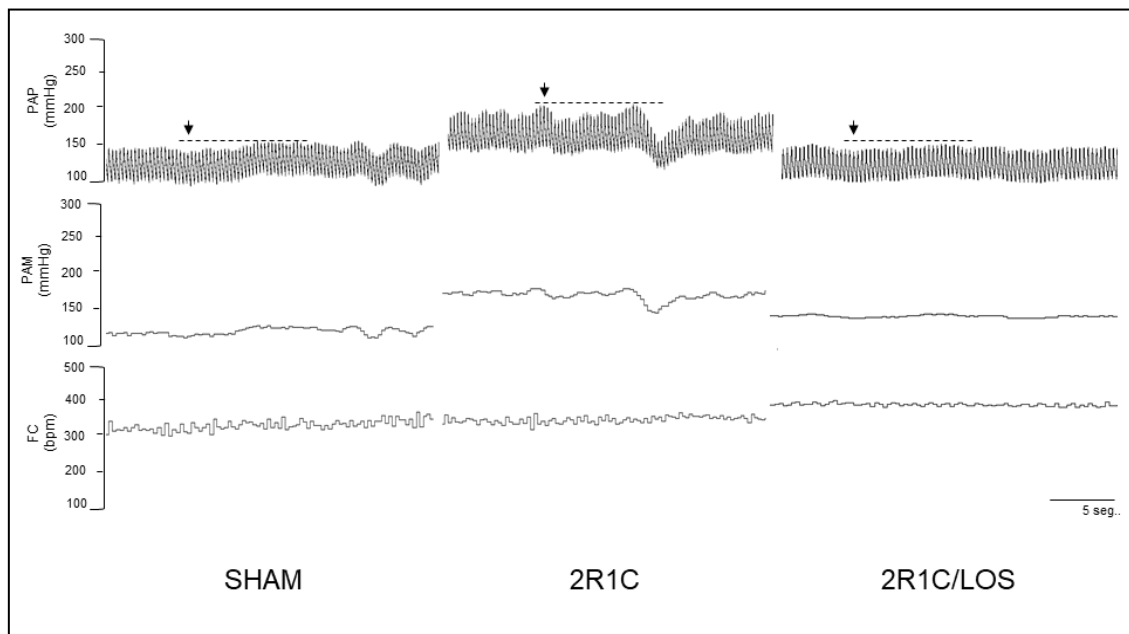


Figura 9| Traçados dos registros cardiovasculares, representativos de um rato dos grupos SHAM (n=8), 2R1C (n=5) e 2R1C/LOS (n=8), mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) basais após a microinjeção ICM de L-AAA (2mM/ 5 μ L). As setas indicam a microinjeção de L-AAA nos diferentes animais.

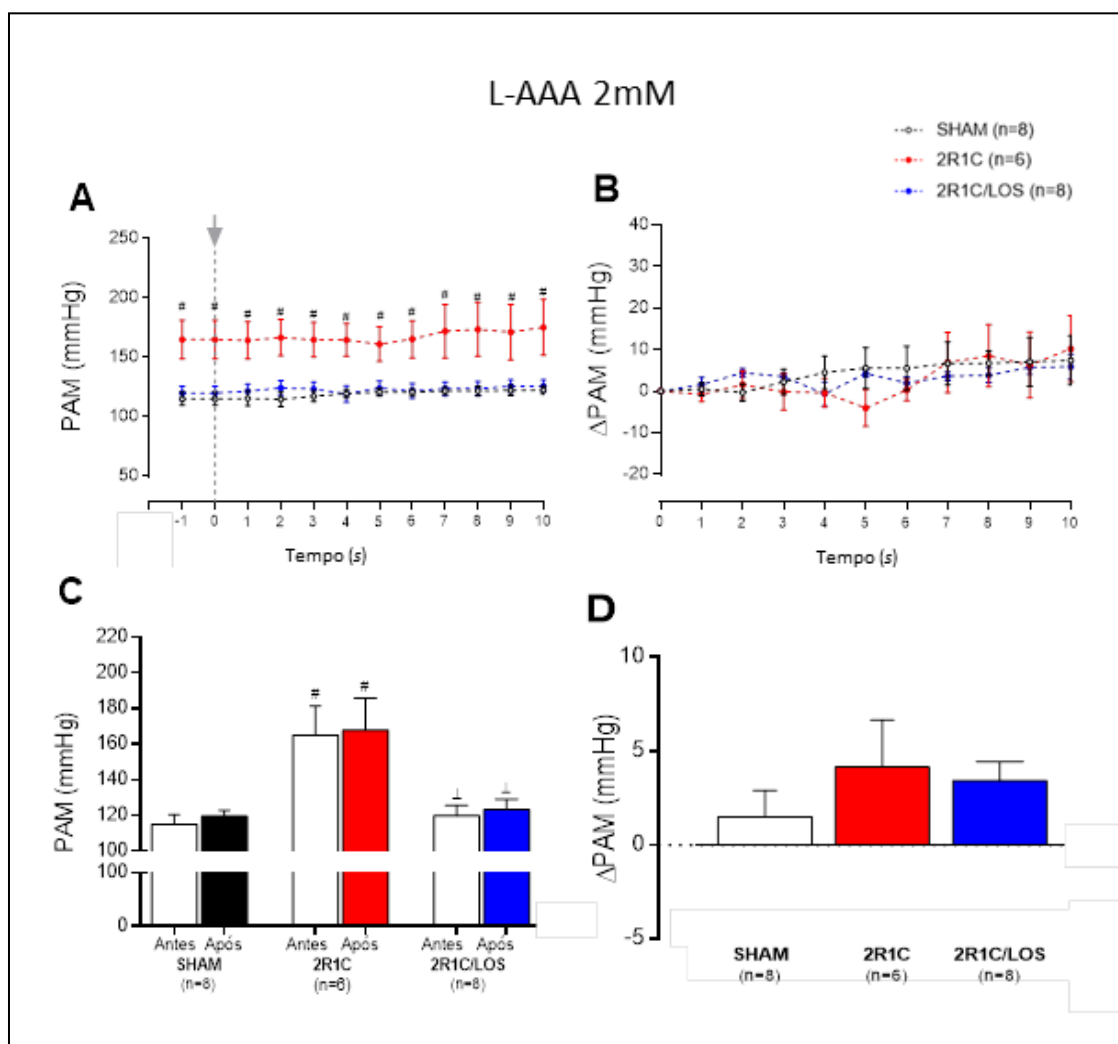


Figura 10 | Alterações na pressão arterial média (PAM, mmHg) promovidas pela microinjeção ICM de L-AAA (2 mM) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da PAM basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da resposta pressora (Δ PAM, mmHg) após a microinjeção. *Painel C:* Valores da PAM basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D:* Média da variação da resposta pressora (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. $\dagger p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C.

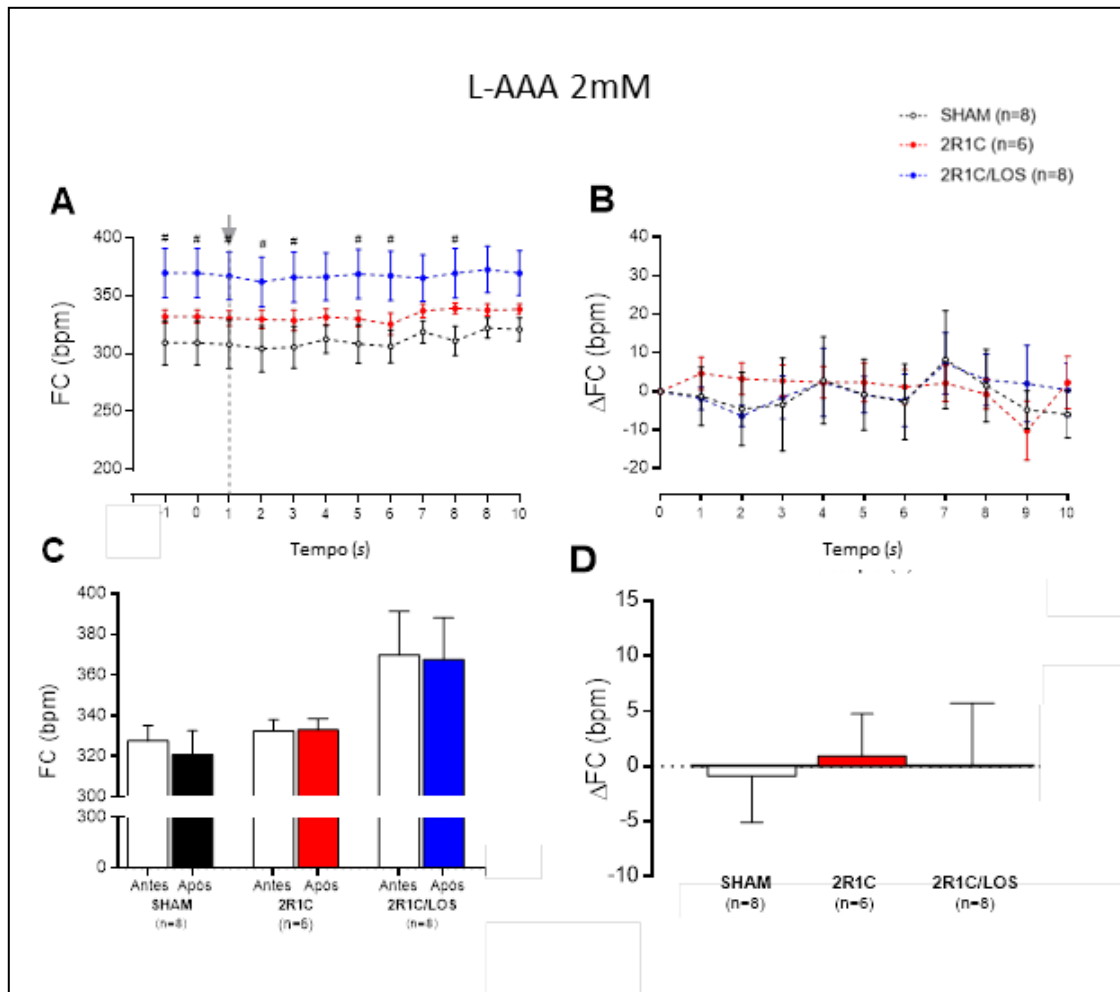


Figura 11 | Alterações na frequência cardíaca (FC, bpm) promovidas pela microinjeção ICM de L-AAA (2 mM) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da FC basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da resposta de bradicardia (ΔFC , bpm) após a microinjeção. *Painel C:* Valores da FC basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D:* Média da variação da resposta de bradicardia (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. † $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C.

4.1.7 Efeitos da microinjeção ICM do inibidor reversível da atividade da glia, FCt (0,2 mM), sobre aos parâmetros cardiovasculares de ratos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS:

As figuras 12, 13 e 14 mostram as respostas cardiovasculares à microinjeção ICM de FCt (0,2 mM) em ratos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. Os traçados dos registros da PAP (mmHg), PAM (mmHg) e FC (bpm) de um rato representativo de cada grupo encontram-se na figura 12. Observamos que a microinjeção ICM de FCt (0,2mM) não promoveu alterações imediatas na PAM absoluta dos animais SHAM (120 ± 4 vs. 120 ± 3 mmHg), dos animais 2R1C (161 ± 13 vs. 163 ± 15 mmHg) ou dos animais 2R1C/LOS (124 ± 6 vs. 122 ± 6 mmHg), também não promoveu alterações adicionais nos diferentes tempos (Fig. 13 A). No entanto, houve um pequeno aumento na variação da resposta pressora da PAM nos animais 2R1C no tempo 6 ($\Delta 16 \pm 14$ vs. -4 ± 7 mmHg) quando comparada aos animais SHAM (Fig. 13 B). Mas não houve alteração na variação pressora dos animais 2R1C/LOS ($\Delta 2 \pm 2$ vs. -2 ± 2 mmHg) quando comparada aos animais 2R1C (Fig. 13 B). A microinjeção ICM de FCt (0,2 mM) também não alterou a PAM basal (no total dos 10 segundos) nos animais SHAM (116 ± 5 vs. 120 ± 3 mmHg), nos animais 2R1C (180 ± 23 vs. 171 ± 16 mmHg) e nos animais 2R1C/LOS (133 ± 10 vs. 122 ± 6 mmHg) (Fig. 13 C). Adicionalmente, não observamos alteração na variação pressora (no total dos 10 segundos) nos animais 2R1C ($\Delta 2 \pm 1$ vs. -1 ± 2 mmHg) quando comparados aos animais SHAM. Tampouco nos animais 2R1C/LOS ($\Delta 2 \pm 2$ vs. 2 ± 1 mmHg) quando comparados aos animais 2R1C (Fig. 13 D).

Após a microinjeção de ICM de FCt (0,2mM) não observamos alterações imediatas na FC dos animais SHAM (319 ± 12 vs. 328 ± 7 mmHg), dos animais 2R1C (319 ± 11 vs. 330 ± 6 mmHg) ou dos animais 2R1C/LOS (351 ± 19 vs. 358 ± 20 mmHg), também não promoveu alterações adicionais nos diferentes tempos (Fig. 14 A). Não houve alterações na variação da resposta de bradicardia nos animais 2R1C ($\Delta -3 \pm 2$ vs. -5 ± 6 mmHg) quando comparada aos animais SHAM (Fig. 14 B), tampouco nos animais 2R1C/LOS ($\Delta 1 \pm 3$ vs. -3 ± 2 mmHg) quando comparada aos animais 2R1C (Fig. 14 B). A microinjeção ICM de FCt (0,2 mM) também não alterou a FC basal (no total dos 10 segundos) nos animais SHAM (318 ± 12 vs. 329 ± 7 mmHg), nos animais 2R1C (340 ± 6 vs. 330 ± 6 mmHg) e nos animais 2R1C/LOS (359 ± 22 vs. 359 ± 22 mmHg) (Fig. 14 C). Adicionalmente, não observamos alteração na variação da bradicardia (no total dos 10 segundos) nos animais 2R1C ($\Delta 5 \pm 4$ vs. 2 ± 3 mmHg) quando comparados aos animais SHAM. Tampouco nos animais 2R1C/LOS ($\Delta 7 \pm 4$ vs. 5 ± 4 mmHg) quando comparados aos animais 2R1C (Fig. 14 D).

Os dados da PAM e da FC, nos diferentes tempos, encontram-se no apêndice E, tabelas 9 e 10, respectivamente. Adicionalmente, os valores da PAS e a PAD encontram-se no apêndice E, figura A 4 e tabelas 11 e 12.

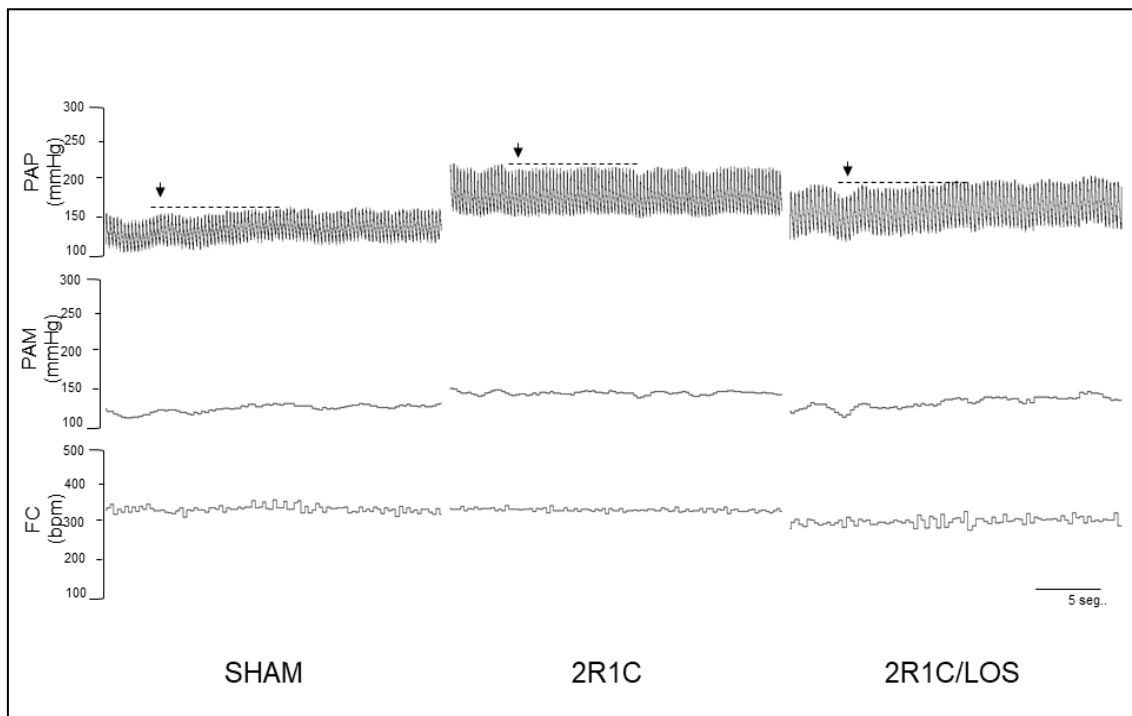


Figura 12| Traçados cardiovasculares representativos de ratos dos grupos SHAM (n=8), 2R1C (n=5) e 2R1C/LOS (n=8), mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) basais após a microinjeção ICM de FcT (0,2mM/ 5 μ L). As setas indicam a microinjeção de FcT nos diferentes animais.

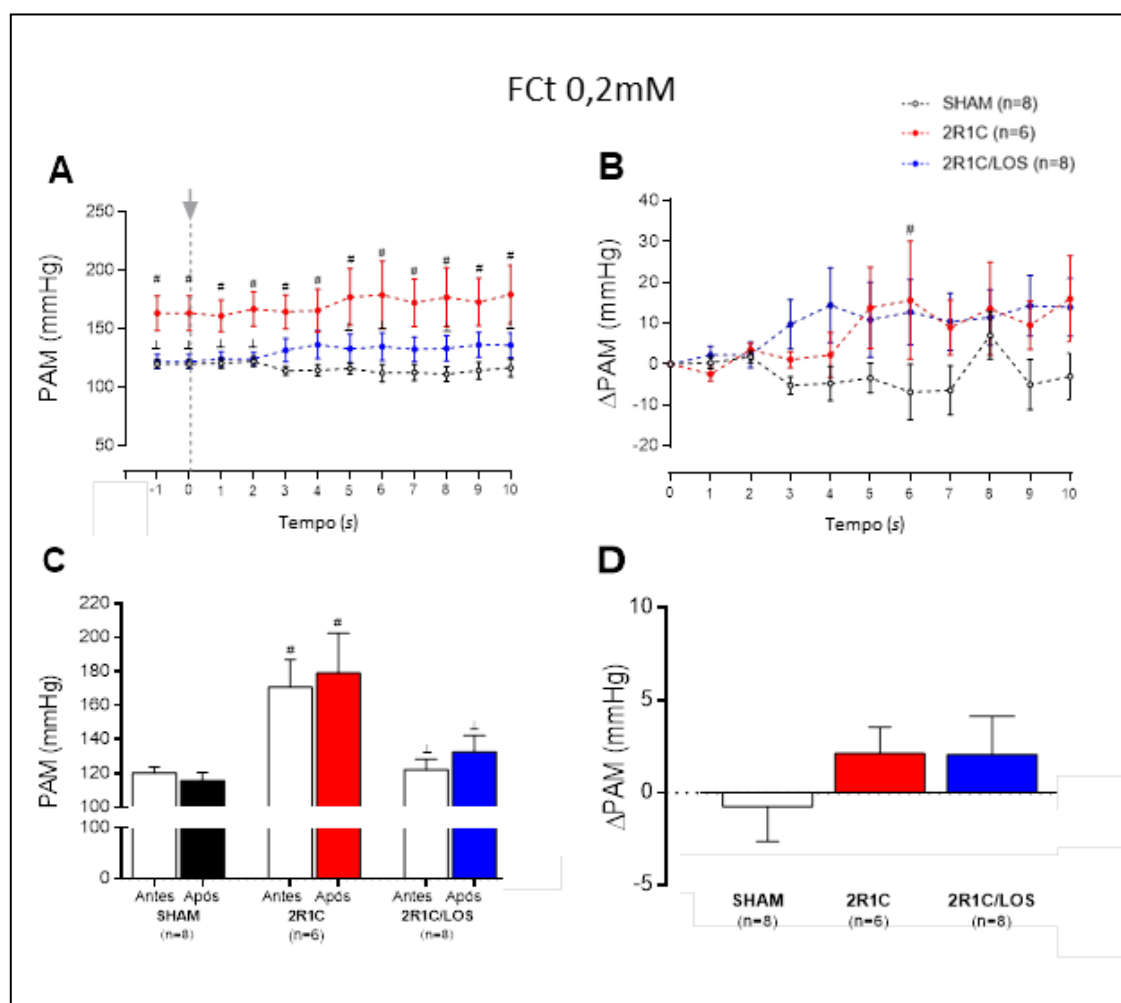


Figura 13 Alterações na pressão arterial média (PAM, mmHg) promovidas pela microinjeção ICM de Fct (0,2 mM) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da PAM basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da resposta pressora (Δ PAM, mmHg) após a microinjeção. *Painel C:* Valores da PAM basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D:* Média da variação da resposta pressora (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. † $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C.

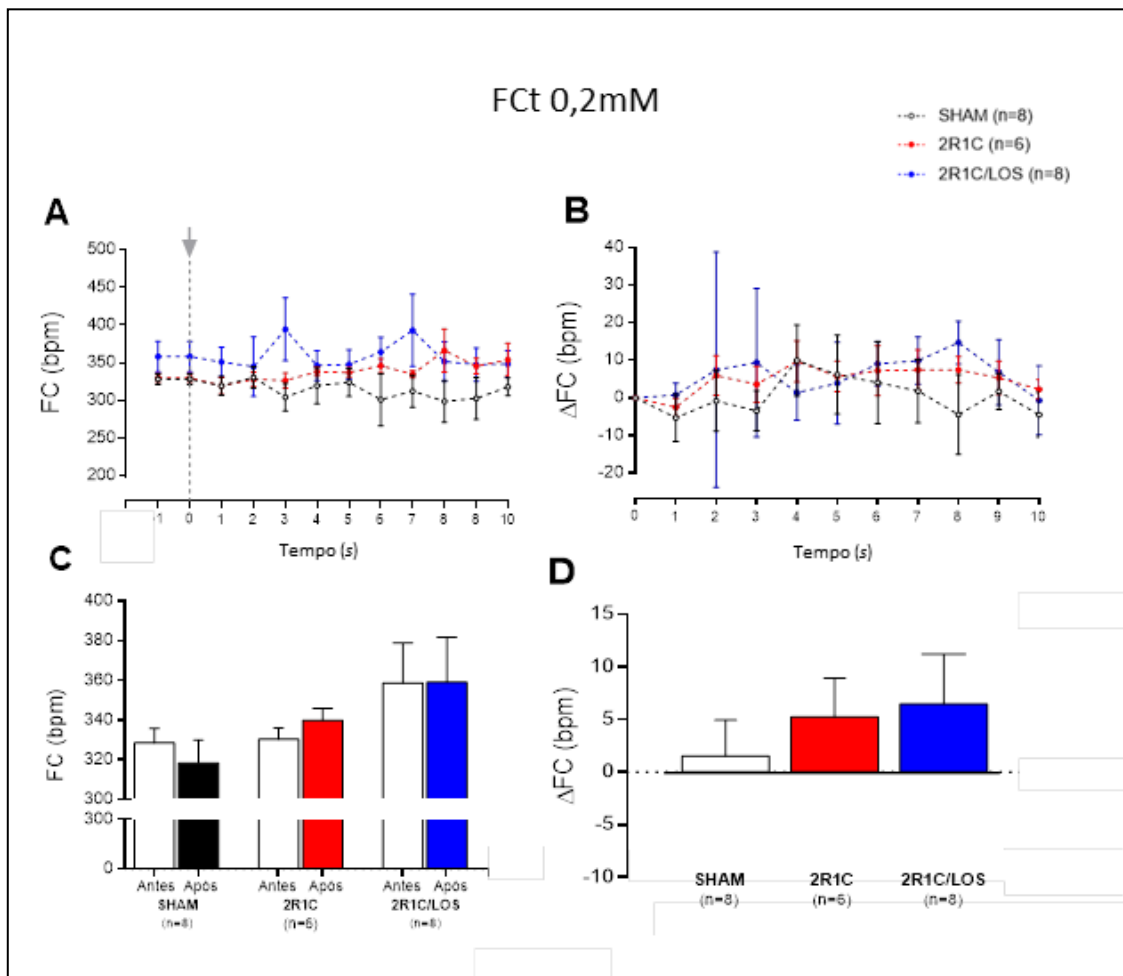


Figura 14 | Alterações na frequência cardíaca (FC, bpm) promovidas pela microinjeção ICM de Fct (0,2 mM) nos grupos SHAM, 2R1C e 2R1C/LOS. *Painel A:* Valores da FC basal antes (-1, 0 seg.) e após (1 – 10 seg.) a microinjeção. *Painel B:* Variação da resposta de bradicardia (Δ FC, bpm) após a microinjeção. *Painel C:* Valores da FC basal antes e após a microinjeção (média dos 10 seg.). *Painel D:* Média da variação da resposta de bradicardia (nos 10 seg.). Dados dos painéis A e B foram analisados pelo ANOVA Two-Way e dos painéis C e D pelo ANOVA One-Way. Comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM. † $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C.

4.1.8 Análise da marcação bulbar com o corante Azul de Evans:

As fotomicrografias representativas do bulbo de um rato representativo estão dispostas nos painéis A-C da figura 15, as quais mostram o espalhamento do corante azul de Evans na região dorsal (Fig. 15 A), ventral (Fig. 15 B) e lateral (Fig. 15 C) do bulbo, após a microinjeção na região da cisterna magna.

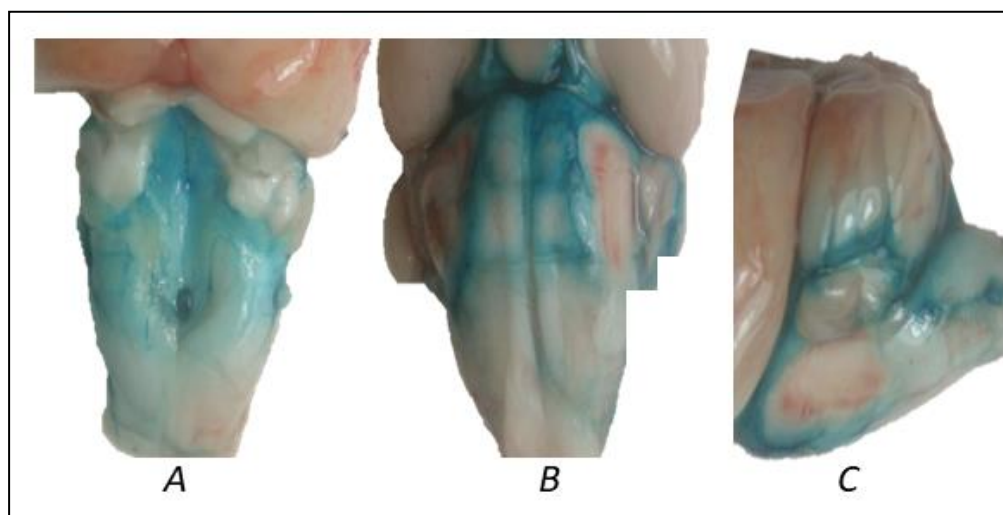


Figura 15| Fotomicrografias das porções dorsal (painel A), ventral (painel B) e lateral (painel C) mostrando o sítio anatômico da fixação do corante azul de Evans 2% na região do bulbo com um aumento de 4X, por meio da microinjeção intracisterna magna (ICM).

4.2 Parte II - Estudos *in vitro*

4.2.1 Análise da hemodinâmica e dos pesos corporais e renais dos animais SHAM e 2R1C:

A tabela II mostra a análise dos pesos e os parâmetros cardiovasculares dos animais SHAM e 2R1C submetidos à análise molecular. Podemos observar que houve aumento do peso corporal ($p=0,0001$) dos animais 2R1C. No grupo 2R1C, observamos redução do peso do rim direito clipado ($p=0,006$) em relação ao peso do rim esquerdo. Além disso, houve aumento no peso do rim esquerdo (não-clipado) do grupo 2R1C ($p=0,0004$) quando comparado ao grupo SHAM. Os dados hemodinâmicos medidos pela pletismografia de cauda mostram que o grupo 2R1C desenvolveu aumento na pressão arterial sistólica [PAS, mmHg ($p=0,04$)] e na pressão arterial média [PAM, mmHg ($p=0,04$)] e redução do fluxo [mL/min ($p=0,005$)] e do volume sanguíneo [mL ($p=0,01$)] na cauda. Adicionalmente, não houve alterações significativas na frequência cardíaca basal [FC, bpm ($p=0,3$)].

Tabela II | Análise dos pesos e parâmetros cardiovasculares dos diferentes grupos submetidos à quantificação proteica por *Western Blotting*.

	Sham (n=6)	2R1C (n=6)
ΔPC (g)	128 ± 16	$217 \pm 34^*$
PRE[(g) não-clipado]	1.7 ± 0.06	$2.2 \pm 0.07^*$
PRD [(g) clipado]	1.8 ± 0.06	$1.9 \pm 0.09^\#$
PAM (mmHg)	130 ± 5.7	$166 \pm 15^*$
PAS (mmHg)	157 ± 5	$192 \pm 14^*$
FC (bpm)	430.6 ± 12	447 ± 10
Fluxo (mL/min.)	18 ± 2	$7 \pm 2^*$
Volume (mL)	107 ± 13.6	$48 \pm 13.5^*$

Dados em média $\pm$ EPM. ΔPC : Variação do peso Corporal; PRE: Peso do rim esquerdo; PRD: Peso do rim direito; PAM; Pressão arterial média; PAS: Pressão arterial sistólica; FC: Frequência cardíaca. $*p < 0.05$ vs. o grupo Sham. $^\#p < 0,05$ vs. PRE(g).

4.2.2 Análise da expressão da proteína *glial fibrillary acid* (GFAP), dos transportadores de glutamato astrogliais (GLT1 e GLAST) e da glutamina sintetase (GS) no Núcleo do Trato Solitário (NTS):

Os painéis (A – D) da figura 16 mostram a expressão dos marcadores da atividade astrocítica na região do NTS em ratos SHAM e 2R1C. Podemos observar que no grupo 2R1C houve redução da expressão da GFAP [(44,4 ± 11,4 vs. 100 ± 12,8%, $p=0,01$) Fig. 16 A], mas não do transportador GLT1 [(120 ± 35,8 vs. 100 ± 20,3%) Fig. 16 B], quando comparado aos animais SHAM. Não foi observada alteração na expressão do transportador GLAST [(97 ± 17 vs. 100 ± 8,9%) Fig. 16 C], mas observamos redução na expressão da GS [(52 ± 10 vs. 100 ± 11,7%) Fig. 16 D] em animais 2R1C, quando comparado aos animais SHAM.

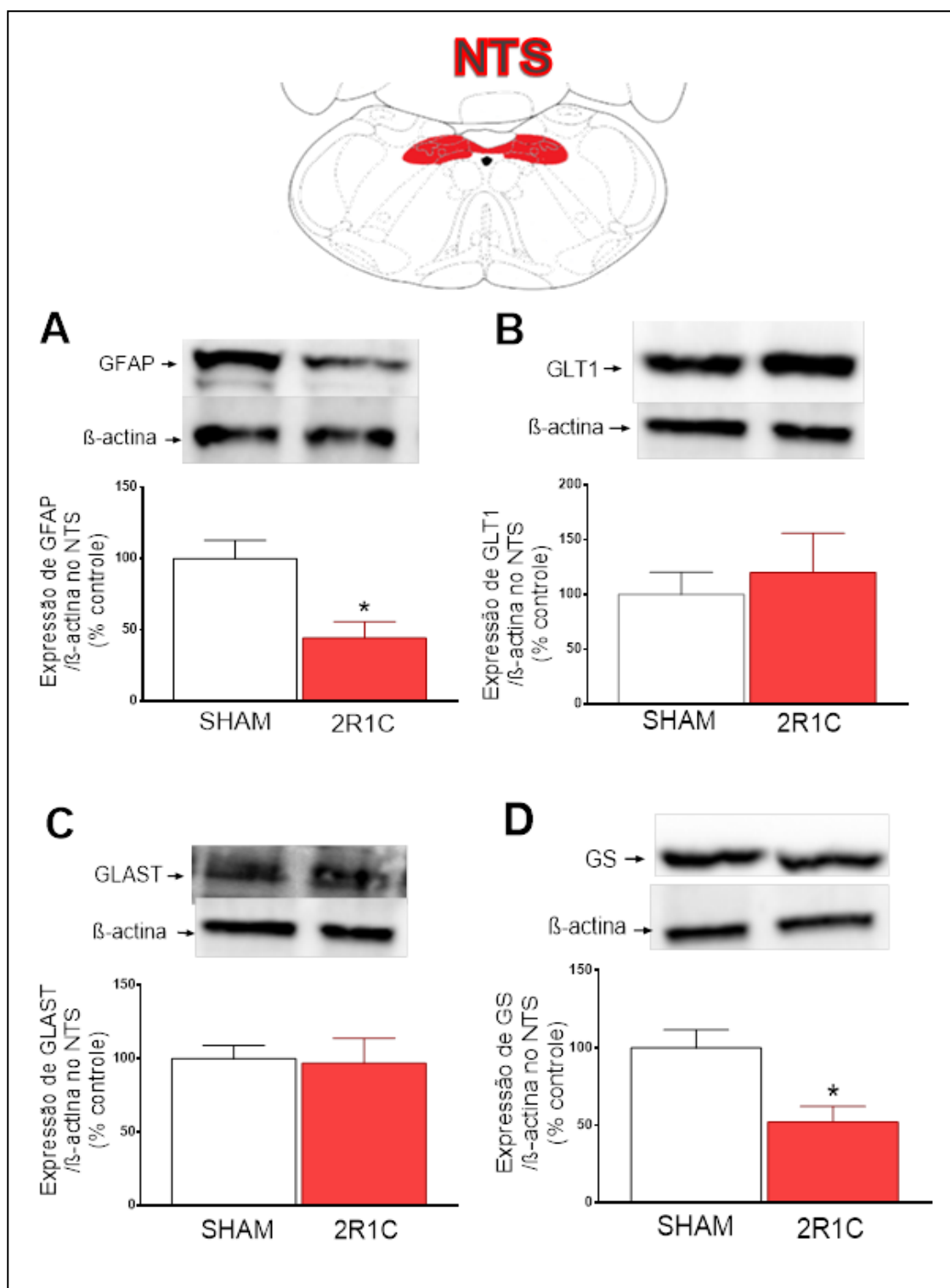


Figura 16 | Expressão proteica do citoesqueleto astrocítico [(GFAP) *Painel A*], dos transportadores de glutamato astrocíticos [GLT1/EAAT2 (*Painel B*) e GLAST/EAAT1(*Painel C*)] e da glutamina sintetase [(GS) *Painel D*] na região do NTS nos grupos SHAM e 2R1C. Os dados foram expressos como MÉDIAS ± EPM e comparados pelo teste *t-student*, não pareado. * $p < 0,05$ vs. grupo SHAM.

4.2.3 Análise da expressão da proteína glial fibrillary acid (GFAP), dos transportadores de glutamato astrogliais (GLT1 e GLAST) e da glutamina sintetase (GS) no Bulbo Ventrolateral Rostral (RVLM):

Os painéis (A – D) da figura 17 mostram a expressão dos marcadores da atividade astrocítica na região do RVLM nos ratos SHAM e 2R1C. Podemos observar que no grupo 2R1C houve redução da expressão proteica do GFAP [(47 ± 7,8 vs. 100 ± 6,4%, $p=0,004$) Fig. 17 A], do transportador GLT1 [(52 ± 5 vs. 100 ± 2,8%, $p=0,002$) Fig. 17 B], do transportador GLAST [(52 ± 16,5 vs. 112 ± 17,4%, $p=0,05$) Fig. 17 C] e da GS [(44,5 ± 5,4 vs. 100 ± 11%, $p=0,002$) Fig. 17 D], quando comparado aos animais SHAM.

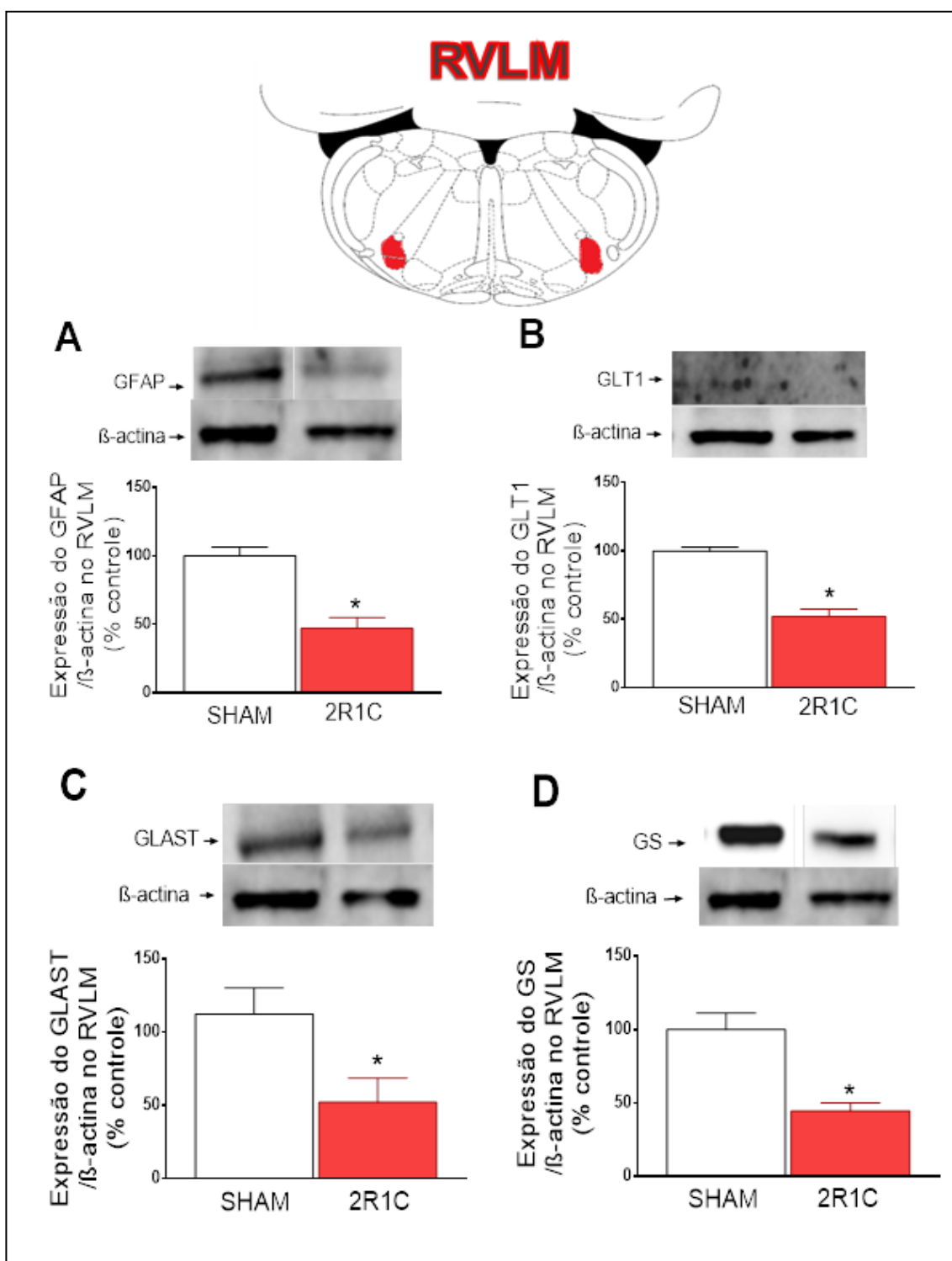


Figura 17 | Expressão proteica do citoesqueleto astrocítico [(GFAP) *Painel A*], dos transportadores de glutamato astrocíticos [GLT1/EAAT2 (*Painel B*) e GLAST/EAAT1(*Painel C*)] e da glutamina sintetase [(GS) *Painel D*] na região do RVLM nos grupos SHAM e 2R1C. Os dados foram expressos como MÉDIAS ± EPM e comparados pelo teste *t-student*, não pareado. * $p < 0,05$ vs. grupo SHAM.

4.2.4 Análise da expressão da proteína glial fibrillary acid (GFAP), dos transportadores de glutamato astrogliais (GLT1 e GLAST) e da glutamina sintetase (GS) no Órgão Subfornicial (SFO):

Os painéis (A – D) da figura 18 mostram a expressão dos marcadores da atividade astrocítica na região do SFO em ratos SHAM e 2R1C. Podemos observar que no grupo 2R1C não houve alterações significativas na expressão do GFAP [(90,8 ± 14 vs. 100 ± 13,6%) Fig. 18 A] ou do transportador GLT1 [(95,8 ± 38,7 vs. 100 ± 19,9%) Fig. 18 B] quando comparado aos animais SHAM. Observamos redução na expressão do transportador GLAST [(97 ± 17 vs. 100 ± 8,9%) Fig. 18 C], mas não da GS [(95 ± 11 vs. 100 ± 2,8%) Fig. 18 D] em animais 2R1C, quando comparado aos animais SHAM.

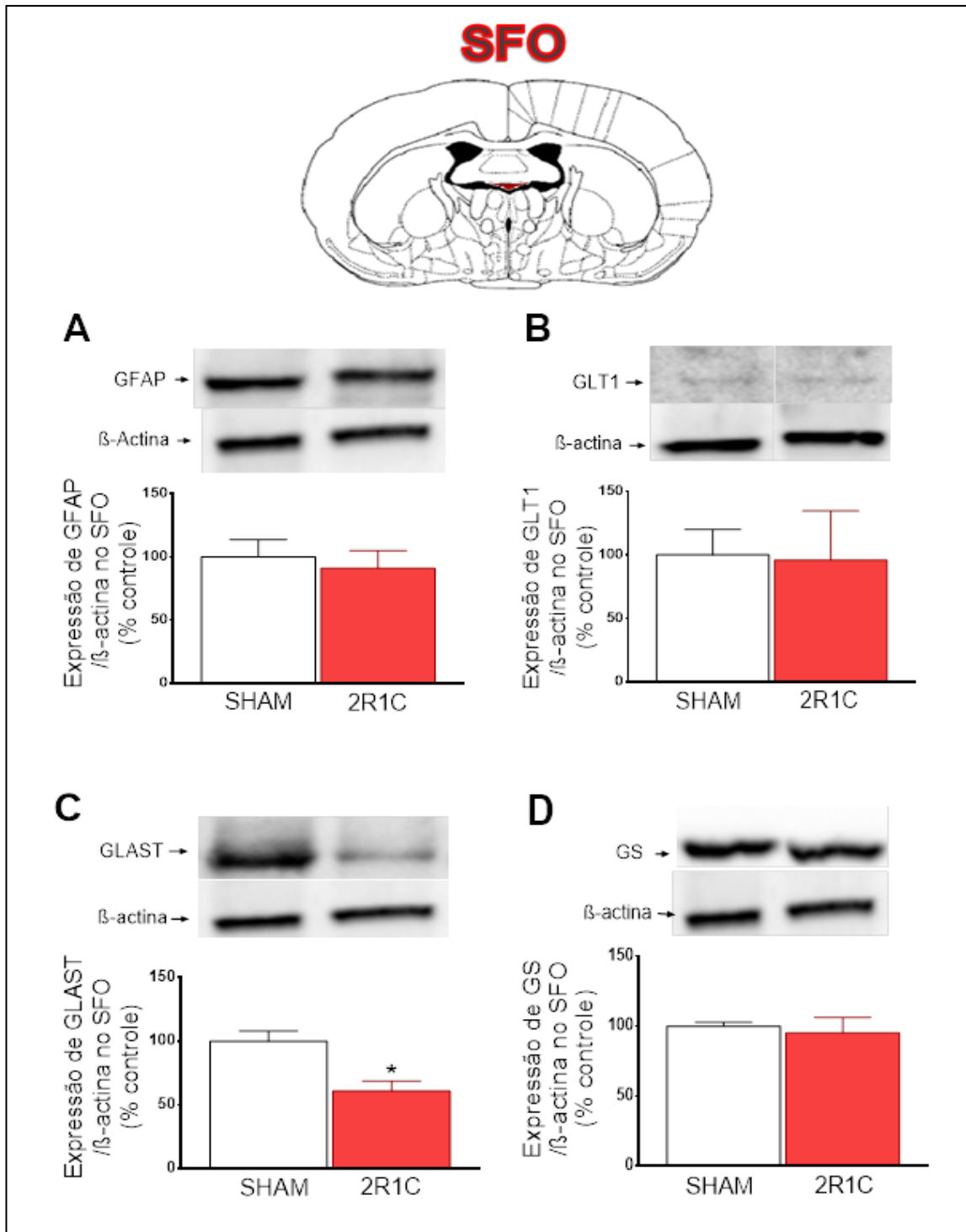


Figura 18| Expressão proteica do citoesqueleto astrocítico [(GFAP) *Painel A*], dos transportadores de glutamato astrocíticos [GLT1/EAAT2 (*Painel B*) e GLAST/EAAT1(*Painel C*)] e da glutamina sintetase [(GS) *Painel D*] na região do SFO nos grupos SHAM e 2R1C. Os dados foram expressos como MÉDIAS ± EPM e comparados pelo teste *t-student*, não pareado. * $p < 0,05$ vs. grupo SHAM.

4.2.5 Análise da expressão da proteína glial fibrillary acid (GFAP), dos transportadores de glutamato astrogliais (GLT1 e GLAST) e da glutamina sintetase (GS) no Núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN):

Os painéis (A – D) da figura 19 mostram a expressão dos marcadores da atividade astrocítica na região do PVN. Podemos observar que no grupo 2R1C houve um aumento significativo na expressão de GFAP [(288 ± 67 vs. 100 ± 18%, $p=0,01$) Fig. 19 A], mas não na expressão do transportador GLT1 [(96,7 ± 23,4 vs. 100 ± 13%) Fig. 19 B], GLAST [(99,7 ± 8 vs. 100 ± 5,4%) Fig. 19 C], ou na GS [(102,5 ± 7,7 vs. 100 ± 3,7%) Fig. 19 D].

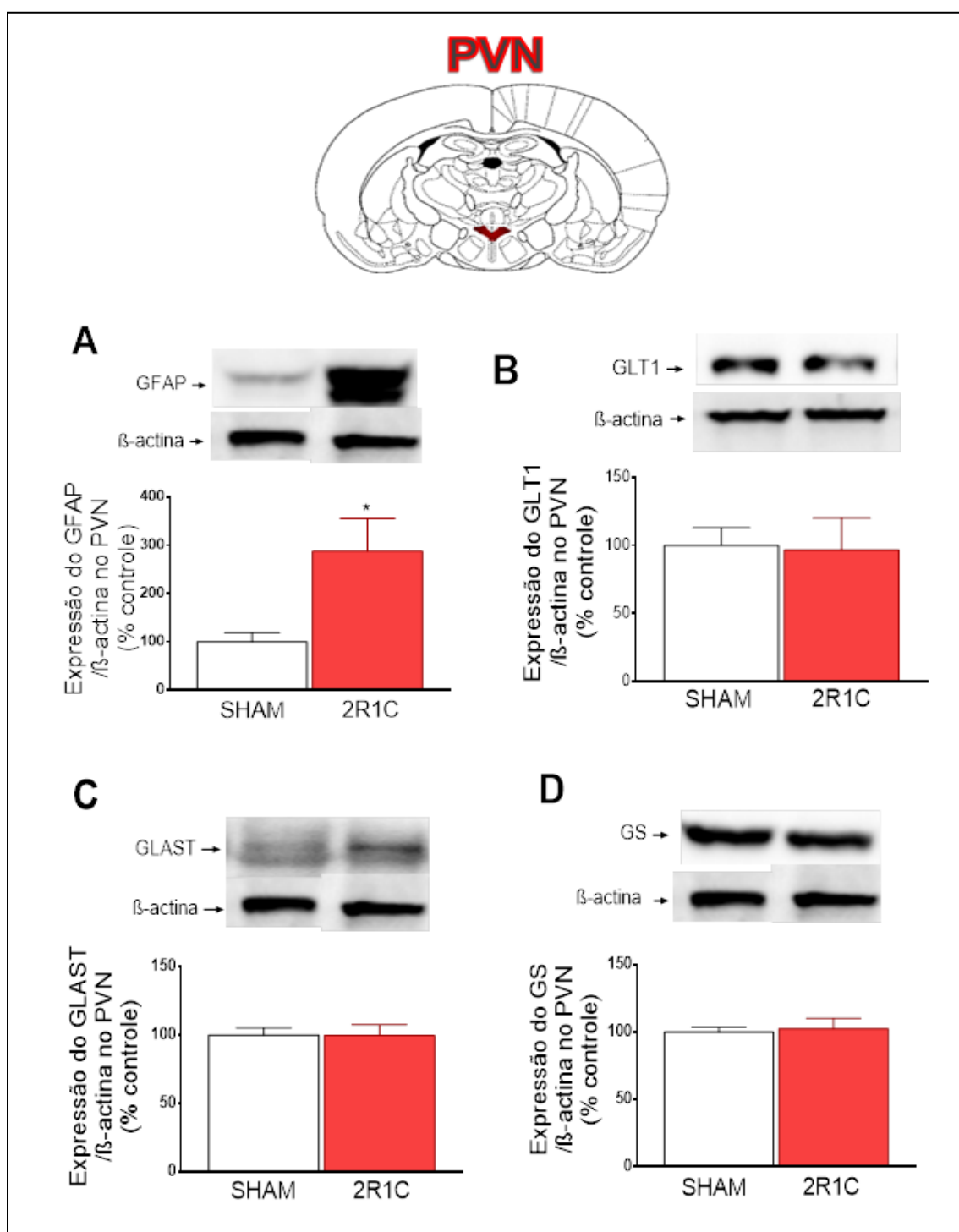


Figura 19 | Expressão proteica do citoesqueleto astrocítico [(GFAP) *Painel A*], dos transportadores de glutamato astrocíticos [GLT1/EAAT2 (*Painel B*) e GLAST/EAAT1(*Painel C*)] e da glutamina sintetase [(GS) *Painel D*] na região do PVN nos grupos SHAM e 2R1C. Os dados foram expressos como MÉDIAS ± EPM e comparados pelo teste *t-student*, não pareado. * $p < 0,05$ vs. grupo SHAM.

4.2.6 Análise da expressão da proteína glial fibrillary acid (GFAP), dos transportadores de glutamato astrogliais (GLT1 e GLAST) e da glutamina sintetase (GS) no Córtex:

Os painéis (A – D) da figura 20 mostram a expressão dos marcadores da atividade astrocítica na região do controle do Córtex nos ratos SHAM e 2R1C. Nos quais, observamos que não houve alterações na expressão de GFAP [(128,2 ± 41,7 vs. 100 ± 25,6%) Fig. 20 A], GLT1 [(134,5 ± 24,4 vs. 100 ± 11%) Fig. 20 B], GLAST [(85,3 ± 10,8 vs. 100 ± 12,7%) Fig. 20 C] e GS [(94,7 ± 14,1 vs. 100 ± 16,7%) Fig. 20 D] em animais 2R1C, quando comparado aos animais SHAM.

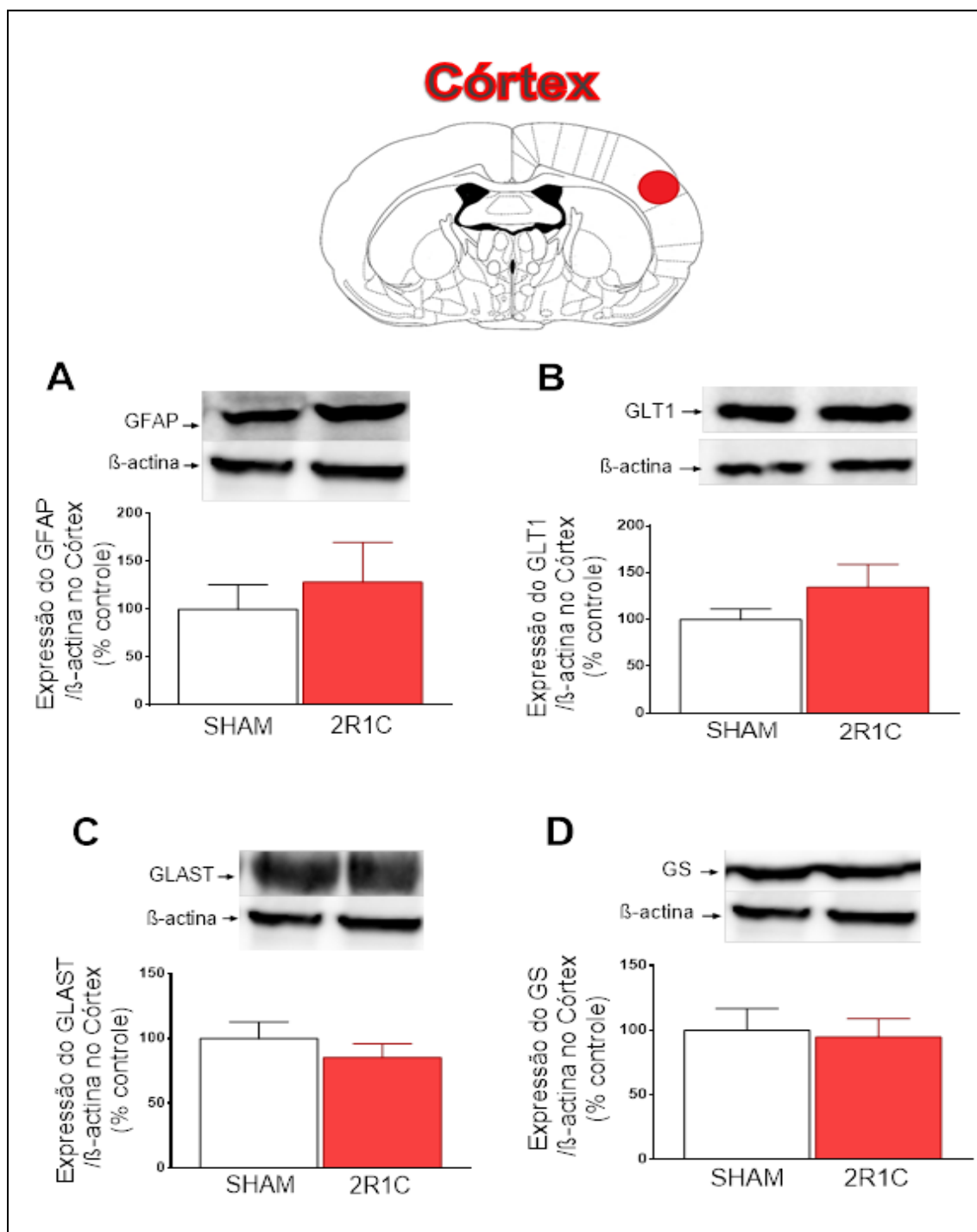


Figura 20 | Expressão proteica do citoesqueleto astrocítico [(GFAP) *Painel A*], dos transportadores de glutamato astrocíticos [GLT1/EAAT2 (*Painel B*) e GLAST/EAAT1(*Painel C*)] e da glutamina sintetase [(GS) *Painel D*] na região do Córtex nos grupos SHAM e 2R1C. Os dados foram expressos como MÉDIAS ± EPM e comparados pelo teste *t-student*, não pareado. * $p < 0,05$ vs. grupo SHAM.

4.2.7 Análise de correlação entre a expressão dos diferentes marcadores da atividade astrocítica e a PAS (mmHg) no NTS e RVLM:

A tabela III mostra os resultados relativos à análise de correlação (r) entre a expressão dos diferentes marcadores da atividade astrocítica com a PAS (mmHg) no NTS e no RVLM. Observamos uma correlação significativa entre a expressão proteica do GLT1 ($r = 0,9$; $p = 0,006$) e da GS ($r = 0,9$; $p = 0,003$) na região do RVLM com a PAS nos animais 2R1C. Enquanto não observamos correlação significativa entre a expressão proteica do GLT1 ($r = 0,15$; $p = 0,5$) ou da GS ($r = 0,2$; $p = 0,4$) na região do NTS com a PAS nos animais 2R1C. Adicionalmente, também não foi observada correlação entre os marcadores da atividade astrocítica e a PAS no NTS ou RVLM dos animais SHAM.

Tabela III Coeficientes de correlação (r) e os valores P das equações de regressão correlacionando a expressão dos diferentes marcadores da atividade astrogliar (GFAP, GLT1, GLAST e GS) no NTS e RVLM com a PAS (mmHg) dos animais SHAM e 2R1C.

	Grupos	
	SHAM (n=6)	2R1C (n=6)
NTS		
<i>Expressão do GFAP x PAS</i>	$r = 0.25$ $P = 0.27$	$r = 0.01$ $P = 0.97$
<i>Expressão do GLT1 x PAS</i>	$r = 0.01$ $P = 0.82$	$r = 0.15$ $P = 0.51$
<i>Expressão do GLAST x PAS</i>	$r = 0.07$ $P = 0.59$	$r = 0.01$ $P = 0.86$
<i>Expressão do GS x PAS</i>	$r = 0.41$ $P = 0.23$	$r = 0.20$ $P = 0.40$
RVLM		
<i>Expressão do GFAP x PAS</i>	$r = 0.06$ $P = 0.63$	$r = 0.37$ $P = 0.19$
<i>Expressão do GLT1 x PAS</i>	$r = 0.4$ $P = 0.15$	$r = 0.9$ $P = 0.006^*$
<i>Expressão do GLAST x PAS</i>	$r = 0.01$ $P = 0.90$	$r = 0.00$ $P = 0.98$
<i>Expressão do GS x PAS</i>	$r = 0.3$ $P = 0.28$	$r = 0.9$ $P = 0.003^*$

Discussão|

5 Discussão

5.1. Participação dos mecanismos glutamatérgicos astrogliais do bulbo sobre a modulação cardiovascular em ratos com hipertensão renovascular (HRv)

Neste estudo foi utilizado o modelo de hipertensão renovascular (HRv) obtido por meio da técnica 2-Rins 1-clipe em ratos, a qual se mostrou efetiva para o desenvolvimento da hipertensão, assim como descrito por Goldblatt^{23,147} e por diferentes estudos do nosso laboratório e de outros^{17,35,36,133}. A HRv foi comprovada pelo método indireto não invasivo - pletismografia de cauda - e pelo peso do rim isquêmico e do rim contralateral em ambos os grupos. No protocolo *in vivo*, não observamos alteração do peso corporal dos animais 2R1C, diferentemente do protocolo *in vitro*, em que observamos aumento do peso corporal no grupo 2R1C em relação ao grupo SHAM. . Acreditamos que isso seja devido às diferenças nos perfis de peso corporal dos animais 2R1C que frequentemente encontramos na literatura.^{35,36,148,149}

Nossos resultados mostraram que o tratamento com losartana durante 4 semanas foi eficaz em reduzir a PAM dos animais com HRv, corroborando com os estudos previamente descritos^{19,148,150-152}.

A redução da PAM induzida pelo tratamento com losartana parece estar especialmente ligada aos seus efeitos sobre o SNC, uma vez que este pode atravessar a BHE¹⁵³, inibindo a ativação da Ang-II no bulbo dos animais com HRv. Diversos estudos prévios observaram que o tratamento oral com losartana ou sua injeção direta sobre o NTS e/ou RVLM leva à redução da

produção de ROS¹⁹, da atividade simpática nervosa renal – rSNA-^{154,155} e consequentemente da pressão arterial¹⁵⁴⁻¹⁵⁹.

5.1.1. Atividade funcional astrocítica mediada pelo GLT1 não está alterada no bulbo de animais com HRv

Inicialmente nós observamos que a microinjeção ICM do veículo salina (0,15 M) resultou em uma pequena resposta oscilatória na PAM e PAS apenas no grupo 2R1C. É preciso lembrar que a microinjeção de líquidos no SNC, como a salina, impõe uma força mecânica sobre o parênquima neural, o qual pode levar a efeitos pressores ainda que não significantes¹⁶⁰, ou pouco significantes¹⁶¹, como aqui observado. Além disso, considerando que é observado um aumento da variabilidade cardiovascular em animais hipertensos, o perfil oscilatório da pressão desse grupo tende a aumentar frente às microinjeções centrais, uma vez que esses animais têm aumento na labilidade da pressão arterial^{162,163}. Logo, entendemos que o aumento da PAM e PAS induzido pela salina no grupo 2R1C reflete o aumento da sensibilidade central aos efeitos mecânicos da microinjeção aliado ao aumento da labilidade da pressão arterial inerentes à condição hipertensa.

A inibição do GLT1 bulbar, por meio da microinjeção ICM do DHK, não promoveu alterações significativas na PAM, FC, PAS e PAD dos animais normotensos. Esse resultado se contrapõe à hipótese inicial de que o GLT1 bulbar participaria da modulação da pressão arterial nos animais normotensos. Estudos de Matott et al.,⁹⁸ mostraram que a inibição do GLT1 com DHK em *slices* do NTS promove aumento da biodisponibilidade do glutamato e aumento nas correntes excitatórias pós-sinápticas. Entretanto, nas abordagens *in vivo*,

foi observado que a microinjeção de DHK no NTS promove resposta depressora, bradicárdica e simpatoinibitória, similar à ativação do barorreflexo^{98,118}. Sugerindo que a recaptação de glutamato pelo GLT1 dos astrócitos pode estar envolvida na modulação dos neurônios do NTS ligados à via simpatoinibitória barorreflexa. Contudo, cabe ressaltar que estes estudos foram desenvolvidos em animais anestesiados e é conhecido que a atividade glutamatérgica é afetada por diferentes tipos de anestésicos, tal como visto em experimentos funcionais desenvolvidos nas regiões do NTS¹⁴²⁻¹⁴⁵. Outro ponto é que a resposta depressora foi observada apenas quando o DHK foi microinjetado diretamente no NTS^{99,164} - e não em outras regiões bulbares próximas - o que também pode sugerir que a resposta cardiovascular ao DHK é núcleo dependente. Logo, embora nossos resultados sugiram que a recaptação pelo GLT1 bulbar não está envolvida na modulação cardiovascular, é possível que essa ausência de resposta se deva à falta de especificidade, da microinjeção em si, no interior dos núcleos do NTS e/ou RVLM. Uma vez que, considerando a abrangência da microinjeção ICM, a diferença entre a difusão na superfície bulbar e no parênquima nuclear (sobretudo no NTS e/ou RVLM) pode levar a efeitos resultantes diferentes sobre a pressão arterial, conforme já observado em outros estudos *in vivo*¹⁶⁵.

Além disso, as alterações cardiovasculares induzidas pela microinjeção de DHK no interior de outros núcleos cardiovasculares sugerem que a atividade do GLT1 pode ser alterada apenas por microinjeções diretas^{69,164,166}. Um outro ponto importante é a relação dose vs. área na microinjeção. A dose de DHK que escolhemos (1 mM) mostrou ser segura em estudos prévios com microinjeções diretas no PVN⁶⁹, enquanto que doses maiores na cisterna (2

mM) provocaram efeitos comportamentais adversos nos animais. Contudo, a dose de 1 mM não promoveu alterações cardiovasculares quando microinjetada na CM, talvez devido à pouca penetração do DHK no interior dos núcleos bulbares do NTS e/ou RVLM.

Ademais, a ausência de resposta pressora após o DHK também sugere que o GLT1 pode não ser o único responsável pela função recaptadora de glutamato no bulbo e que, em determinadas concentrações, o DHK pode estimular a atividade de outros transportadores de glutamato, como o GLAST/EAAT1 e EAAT3/EAAC1¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Nesse contexto, estudos de Salvatore et al.,¹⁶⁷ mostraram que a microinjeção de DHK no núcleo estriado promove aumento transitório de 43% na recaptação de glutamato mediada por outro transportador astrocítico, o EAAT1/GLAST. Adicionalmente, os autores observaram que a microinjeção de DHK não promoveu alteração na expressão dos transportadores astrocíticos (GLT1 e GLAST), sugerindo que levou apenas à alteração na organização funcional dos recaptadores EAAT's astrocíticos. Os autores propõem que o recrutamento do GLAST foi importante para fornecer um mecanismo de defesa endógeno contra o aumento transitório dos níveis de glutamato. Na sequência foi observado que a microinjeção de DHK no núcleo estriado aumenta a expressão de outro transportador de glutamato, o EAAT3/EAAC1¹⁶⁷ (subtipo presente em neurônios), os quais também estão expressos no NTS⁹⁶ de ratos. Esses estudos nos levam a considerar que a ausência de resposta pressora frente à microinjeção ICM de DHK se deve à pouca atuação do fármaco no interior dos núcleos do NTS e/ou RVLM e ao mecanismo endógeno contra o aumento transitório dos níveis de glutamato na

superfície do bulbo, o que pode contribuir para manter os níveis de pressão arterial inalterados conforme observado.

Na sequência, observamos que a microinjeção ICM de DHK nos animais com HRv também não promoveu alterações na PAM, FC, PAS e PAD em relação aos animais normotensos. Assim como os animais normotensos, os animais com HRv também estavam sem o efeito da anestesia, logo a função compensatória exercida pelo GLAST e/ou EAAC1 também estaria presente nesses animais. Outra possibilidade é que ambos os transportadores astrocíticos (GLT1 e GLAST) estejam reduzidos em núcleos bulbares, contribuindo para a ausência de resposta funcional observada frente ao DHK, mas apenas uma análise biomolecular de ambos os transportadores poderia reforçar esta possibilidade.

Outro ponto a ser considerado é que a simpatoexcitação e o aumento das vias glutamatérgicas observadas na condição hipertensa também são resultados da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas pela Ang-II nos núcleos bulbares ^{157,170}. Estudos *in vitro* mostraram que as ROS inibem a recaptação de glutamato mediada pelo GLT1 em cultura de astrócitos ^{171–173}. Esses indícios *in vitro* sugerem que microinjeções mais específicas, diretamente no NTS ou RVLM, podem ser capazes de alterar a recaptação mediada pelo GLT1, uma vez que a produção de ROS é maior no interior dos núcleos modulando a recaptação de glutamato.

O tratamento crônico com losartana, inibidor do receptor AT1, não promoveu alterações na PAM, FC, PAS e PAD frente à inibição com DHK. Como já descrito, a infusão de Ang-II no RVLM aumenta os níveis de glutamato no meio extracelular, o qual é normalizado pelo bloqueio dos receptores AT1

com Candesartan⁸². Outros estudos *in vivo* de Zhou et al.,¹⁷⁴ mostraram que o Candesartan reduziu o glutamato que estava elevado no RVLM de animais hipertensos (modelo induzido por estresse). Carvalho et al.,¹⁷ também mostraram que a função glutamatérgica no RVLM é maior em animais com HRv, sendo normalizada após o tratamento crônico com o captopril, inibidor da ECA. Estes trabalhos sugerem que a Ang-II modula as ações glutamatérgicas via AT1R aumentando os níveis de glutamato e/ou da sua função no RVLM dos animais hipertensos. Entretanto, não observamos alterações pressoras ou bradicardias que indicassem um aumento ou melhora na recaptação de glutamato pelo GLT1 induzida pelo tratamento com losartana.

Em estudos anteriores *in vitro*, Wu et al.,¹⁷⁵ mostraram que a incubação com telmisartan, um análogo do losartana, aumentou a expressão proteica e a função do GLT-1 em co-culturas de neurônios e astrócitos. Além disso, os autores observaram que a ativação do AT1R, pelo agonista L162, reduziu a expressão proteica do GLT1 induzida pelo telmisartan e reduziu a expressão do RNAm do GLT1 em culturas primárias de astrócitos corticais. Esses estudos *in vitro* sugerem que a ativação do AT1R diminui a função do GLT1 astrocítico, enquanto que a inibição do AT1R tem efeito inverso, melhorando a função e a expressão proteica do GLT1. Esses resultados corroboram com a ideia de que o tratamento com o inibidor do AT1R melhora a função de recaptação via GLT1 bulbar, uma vez que os níveis de glutamato e de pressão arterial estão normalizados nesses animais^{17,82}. Entretanto, essa melhora na recaptação pelo GLT1 não refletiu em alterações nos parâmetros cardiovasculares, uma vez que o esse transportador, como anteriormente descrito, parece ser pouco afetado por microinjeções na CM. Por outro lado, considerando que o

telmisartan melhora a função do GLT1¹⁷⁵, é possível que o tratamento crônico com losartam também implique na melhora de outros transportadores glutamatérgicos funcionais capazes de compensar os efeitos do aumento de glutamato frente ao DHK, tais como os anteriormente descritos: GLAST e EAAC1¹⁶⁷. Contudo, são necessários estudos que melhor investiguem o papel da inibição do AT1R frente à recaptação de glutamato pelo GLAST/EAAT1 e outros EAAT's neuronais, como o EAAT3/EAAC1.

5.1.2. Atividade funcional astrocítica mediada pela GS não está alterada no bulbo de animais com HRv

Na sequência, nós observamos que a inibição da GS bulbar, via microinjeção ICM de L-AAA, não promoveu alterações significativas na PAM, FC, PAS e PAD dos animais normotensos. Há indícios de que a inibição da atividade enzimática da GS reduz a captação de glutamato pelos astrócitos, contribuindo para o aumento extracelular desse neurotransmissor excitatório¹⁷⁶. Estudos eletrofisiológicos em *slices* corticais de Trabelsi et al.,¹⁷⁷ mostraram que a inibição da GS, feita pela injeção intraperitoneal de metionina sulfoximina [(MSO) inibidora da atividade da enzima GS], diminuiu as correntes mediadas pelos transportadores astrocíticos, bem como aumentou a ativação dos receptores extrasinápticos de glutamato induzida por corrente evocada. Os autores sugerem que a conversão do glutamato-glutamina pela GS é importante para garantir um transporte eficiente do glutamato pelos EAAT's astrocíticos, bem como para evitar o aumento do glutamato no espaço extrasináptico. Entretanto, em nossa abordagem *in vivo* observamos que a inibição da GS bulbar não altera os parâmetros cardiovasculares basais,

corroborando com os achados anteriores, os quais não mostraram respostas cardiovasculares frente à inibição do GLT1 bulbar. Assim, nossos estudos *in vivo* sugerem que o mecanismo de recaptação e conversão glutamato-glutamina astrocítico pelo GLT1 e GS, respectivamente, parece ser núcleo específico, visto que a inibição de ambos na superfície do bulbo não promove um efeito cardiovascular visível. Acreditamos que parte da ausência desses efeitos se deve às diferentes funções exercidas pelos astrócitos nos núcleos em que estão presentes. Logo, considerando que o bulbo tem diferentes núcleos com funções distintas no controle cardiovascular, é possível que a atividade dos astrócitos seja adaptável às funções de cada núcleo. Ou seja, a microinjeção na região do bulbo talvez não tenha resultado em efeitos cardiovasculares porque a função de um núcleo pode anular a função do outro sinergicamente, sendo essa relação sinérgica inerente ao organismo vivo. O fato dos animais não estarem anestesiados também reforça a integridade dessas funções astrocíticas ligadas ao glutamato¹⁷⁸.

Outro ponto é que o principal objetivo da GS é reduzir o potencial neurotóxico da amônia através de sua catalisação com glutamato para gerar um novo produto, a glutamina, usado como substrato pelos neurônios para formação *de novo* glutamato¹⁷⁹. Sendo essa conversão de glutamato-glutamina um dos mecanismos mais estudados dentro do contexto modulatório das sinapses glutamatérgicas, sobretudo em doenças neurológicas e neurodegenerativas^{180–184}, entretanto o metabolismo e o transporte do glutamato no SNC é bem amplo, complexo e dinâmico. Envolve, inclusive, a participação de vias metabólicas a partir da utilização da glicose pelos neurônios e astrócitos. Em outras abordagens, diversos estudos observaram

que há outras enzimas co-existent em neurônios e astrócitos que formam o glutamato a partir do α -cetoglutarato (α -KG) produzido no ciclo de Krebs, como a glutamato desidrogenase (GDH)¹⁸⁵⁻¹⁸⁷, Aspartato aminotransferase (AST)^{188,189} e Alanina aminotransferase (ALT)¹⁹⁰, enzimas próprias da via metabólica. Com particular destaque à enzima GDH que além de produzir glutamato a partir do α -KG também catalisa a reação na forma inversa, controlando as alterações nos níveis de glutamato^{191,192}. Esses estudos mostram que outras enzimas podem suprir a formação e metabolização do glutamato tanto em neurônios quanto em astrócitos, não dependendo apenas da atividade da GS astrocítica para essa conversão. Além disso, estudos de Dadsetan et al.,^{190,193} observaram que a inibição da GS seguida da exposição de seu substrato, a amônia, leva ao aumento da formação de alanina pela GDH e ALT em cultura de neurônios e astrócitos corticais. Outros estudos *in vitro* de Bauer et al.,¹⁹⁴ mostraram que a inibição da GDH, mas não da GS, inibe a recaptação de glutamato em cultura de astrócitos corticais. Esses estudos sugerem que a inibição da GS leva ao aumento transitório na atividade dessas outras enzimas como um dos mecanismos compensatórios para a desintoxicação da amônia e produção de aminoácidos nas células do SNC. Sendo essas outras enzimas metabólicas também importantes para fornecer a energia necessária à recaptação de glutamato. Logo, a ausência de respostas cardiovasculares após a microinjeção ICM de L-AAA indica que o efeito cardiovascular exercido pela GS pode ser observado apenas em núcleos específicos e que outras enzimas metabólicas presentes em astrócitos e/ou neurônios podem estar envolvidas, adicionalmente, na conversão transitória e rápida do glutamato no bulbo.

Nossos resultados mostraram que a microinjeção ICM de L-AAA também não promoveu alterações na PA ou na FC dos animais com HRv. Estudos de , Acosta et al.,¹⁹⁵ observaram que há redução da atividade da GS e da recaptação de glutamato no córtex, mas não no hipocampo de ratos com hipertensão portal [um modelo em que os animais apresentam aumento no SRA periférico e na permeabilidade da BHE^{196,197}]. Os autores sugerem que o aumento do glutamato extracelular e a redução do ciclo glutamato-glutamina estão envolvidos na patogênese dessa hipertensão, embora essas alterações tenham sido observadas apenas no córtex.

Na sequência, observamos que o tratamento crônico com losartana não promoveu alterações na PAM, FC, PAS e PAD frente à inibição da GS com L-AAA em animais com HRv. Estudos de Drews et al.,¹⁹⁸ com modelos experimentais para doenças neurodegenerativas, mostraram que o tratamento crônico com losartana ip. aumenta a atividade e a expressão da GS em cérebros inteiros de camundongos com Alzheimer, sugerindo que a inibição do AT1R melhora a conversão de glutamato-glutamina pelos astrócitos em doenças neurológicas. Em outra abordagem, estudos *in vitro* mostraram que o tratamento com anti-oxidantes, como o ácido α -Lipoico ou o resveratrol conhecidos por ter efeito anti-hipertensivo em animais com HRv^{133,199}, promovem aumento da atividade enzimática da GS e da recaptação de glutamato pelos astrócitos, sugerindo que o estresse oxidativo, um dos principais fatores elevados pela Ang-II, inibe a atividade enzimática da GS astrocítica^{200,201}. Nesse sentido, o tratamento com losartana melhora a atividade funcional da GS possivelmente através da redução do estresse oxidativo, mas são necessários outros estudos para confirmar a melhora na

GS, em núcleos específicos, está relacionada à redução da PA. Contudo, com a abordagem que fizemos, podemos sugerir que a ausência das respostas cardiovasculares frente à inibição da GS bulbar sugere que esta enzima pode ser mais recrutada em regiões específicas do bulbo e não em regiões mais superficiais. Enquanto que outras enzimas compensatórias ao aumento de glutamato e amônia podem estar mais presentes em neurônios e astrócitos da porção mais superficial do bulbo. Essas possibilidades ainda requerem estudos adicionais para a sua confirmação.

5.1.3. Atividade funcional da glia está alterada no bulbo de animais com HRv

Nós observamos que a inibição reversível da atividade glial bulbar, por meio da microinjeção ICM de FCt, não promoveu alterações significativas na PAM, FC, PAS e PAD dos animais normotensos não anestesiados. Recentemente nós observamos que a microinjeção intracerebroventricular de FCt promoveu um aumento significativo da PAM¹⁰². O que poderia sugerir que a glia exerce função distinta nos núcleos envolvidos no controle cardiovascular. Além disso, é preciso considerar que, diferentemente do DHK e L-AAA - que inibem apenas astrócitos - o FCt inibe todas as células da glia, incluindo a microglia e os oligodentrócitos²⁰². Por isso nem sempre sua inibição resulta em efeitos fisiologicamente visíveis^{124,203}, considerando a multiplicidade de mecanismos excitatórios e inibitórios que as células da glia modulam. Um exemplo dessa contradição foi observada nos estudos *ex vivo* e *in situ* de Accorsi-Mendonça et al.,²⁰⁴ e Costa et al.,¹²⁴, respectivamente. Accorsi-Mendonça et al.,²⁰⁴ observou que a aplicação de FCA, um análogo do FCt,

reduziu a frequência das correntes excitatórias pós-sinápticas dos neurônios do NTS-VLM, mas em estudos posteriores do mesmo grupo, Costa et al.,¹²⁴ não encontraram alterações na atividade simpática induzidas pela microinjeção de FCt no NTS ou no RVLM de animais *in situ* normotensos. Adicionalmente, Sobrinho et al.,²⁰⁵ observaram que a microinjeção de FCt no NTS, no núcleo da rafe (NF) ou no núcleo retrotrapezóide (RTN) não promove alterações na pressão arterial de ratos normotensos anestesiados. Estes estudos sugerem que a inibição glial pode promover mudanças específicas na atividade ou função sináptica, sem resultar em efeitos fisiológicos visíveis sobre a pressão arterial. Provavelmente isso se deva ao fato de que animais normotensos possuem um ambiente neural mais protegido, sobretudo na região bulbar. Com menor estresse oxidativo^{7,19,59,154,206}, menor função excitatória glutamatérgica^{17,59,195,207-209} e menor atividade angiotensinérgica^{39,59,70,71} quando comparados aos animais hipertensos. Logo, a inibição da glia nesses animais pode não resultar em perturbações cardiovasculares, uma vez que possuem mecanismos compensatórios mais efetivos contra as alterações causadas pela inibição glial.

A microinjeção ICM de FCt promoveu um aumento pontual na PAM, PAS e PAD dos animais com HRv. Esse aumento pressor causado pela inibição glial da região bulbar sugere que as células da glia participam, da modulação da pressão arterial na hipertensão. Como já descrito anteriormente, há uma série de estudos mostrando que animais hipertensos possuem aumento da função excitatória glutamatérgica no bulbo, sobretudo no RVLM^{17,174,209}. Adicionalmente, Biancardi et al.,²⁰⁸, combinando imuno-histoquímica com marcação retrógrada, observaram aumento na densidade

das inervações gabaérgicas e glutamatérgicas em neurônios do PVN que se projetam ao RVLM. Os autores sugerem que o remodelamento das entradas aferentes gabaérgicas e glutamatérgicas contribuem para o desequilíbrio das funções excitatórias/inibitórias em ratos hipertensos. De fato, os estudos sobre a função de células da glia em processos fisiopatológicos têm demonstrado que elas podem ser importantes somente dentro do contexto de patologias mais específicas^{122,180–184,210}. Nesse sentido, como primeira abordagem funcional no bulbo, nossos resultados indicam que as células da glia estão alteradas na HRv, no entanto ainda são necessários estudos funcionais em núcleo específicos (no RVLM e/ou NTS, por exemplo) para compreendermos melhor a implicação dessa alteração, considerando a função distinta desses núcleos para o controle cardiovascular.

Na sequência, observamos que o tratamento crônico com Losartana não promoveu alterações significativas, na PAM, FC, PAS e PAD frente à inibição da glia com FCt em animais com HRv. Esses resultados sugerem que os efeitos do tratamento com inibidor do AT1R são mais evidentes em abordagens funcionais mais diretas, em núcleos específicos, os quais apresentam maior atividade funcional para os AT1R.

5.1.4. Expressão dos marcadores da atividade astrocítica está alterada em núcleos bulbares de ratos com HRv

Os resultados *in vitro* mostraram que animais com HRv tem redução na expressão do citoesqueleto astrocítico GFAP no NTS, sugerindo que neste núcleo há retração dos processos astrocíticos, o que também implicaria na

redução da função de recaptação de glutamato pelos astrócitos, uma vez que a superfície – onde estão acoplados os transportadores - foi reduzida. Além disso, a redução da expressão do GFAP também pressupõe aumento do espaço extrasináptico possibilitando maior difusão dos neurotransmissores e, conseqüentemente, maior comunicação entre os neurônios pré e pós-sinápticos. Alteração essa que contribuiria para o aumento da ativação neuronal^{115,116}. Além disso, também foi observada redução na expressão da enzima GS no NTS de animais com HRv, corroborando com estudos prévios *in vitro* de plasticidade astrocítica desenvolvidos por Wang & Hatton¹¹⁶, os quais mostraram que as moléculas do GFAP estão associadas à GS. De forma que a glutamina pode aumentar a expressão de GFAP e GS, enquanto que a inibição da atividade da GS tem efeito contrário, reduzindo a expressão de ambos nos astrócitos¹¹⁶. Entretanto não foram observadas alterações na expressão dos transportadores de glutamato astrócíticos no NTS dos animais hipertensos, sugerindo que a redução da GS não necessariamente afeta a expressão dos EAAT's de glutamato na HRv. Nesse sentido, é importante considerarmos que a técnica de *western blotting* utilizada não nos permite distinguir a expressão proteica na fração de membrana vs. a fração citoplasmática.

Adicionalmente, trabalhos recentemente publicados encontraram alterações na expressão dos EAAT's astrocíticos no NTS de outros modelos de animais que desenvolvem hipertensão e simpatoexcitação induzidas por hipóxia sustentada ou intermitente crônica^{117,120,211–213}. Entretanto, curiosamente esses trabalhos mostraram resultados opostos. Enquanto Matott et al.,¹¹⁷ observaram aumento da expressão de GLT1 e GLAST no NTS de ratos submetidos à hipóxia sustentada (quantificada por imunofluorescência),

Martinez et al.,¹²⁰ observaram redução na expressão de GLAST, mas não no GLT1, no NTS de ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente (quantificada por *western blotting*). Estes resultados reforçam que alterações na expressão dos marcadores glutamatérgicos astrocíticos podem ocorrer em diferentes condições fisiopatológicas ligadas à simpatoexcitação.

No RVLM dos animais com HRv, nós observamos redução da expressão do GFAP, GLT1, GLAST e GS, sugerindo que neste núcleo, em especial, há aumento do espaço extrasináptico, grande redução do *clearance* de glutamato pelos EAAT's astrocíticos e redução da conversão de glutamato-glutamina pelos astrócitos. A diferença dos resultados observados nos núcleos do NTS e RVLM de animais hipertensos é mais um indício de que a atividade dos astrócitos é adaptável às funções de cada núcleo, uma vez que, como já descrito, ambos os núcleos tem funções distintas no controle cardiovascular e sofrem diferentes estímulos na hipertensão.

Estudos *in vitro* de Wu et al.,¹⁷⁵ observaram que a aplicação de um agonista do AT1R, o L162313, reduziu significativamente a expressão de GLT1 e sua recaptação de glutamato do meio extracelular em co-cultura de neurônios-astrócitos. Sugerindo que a ativação dos mecanismos angiotensinérgicos por meio dos AT1R promove redução da expressão e função do GLT1/EAAT2 pelos astrócitos. Além disso, Zou et al.,¹⁷⁶ também observaram aumento da concentração de glutamato no meio extracelular após a pré-incubação com o inibidor da atividade da GS em culturas de astrócitos corticais de ratos. Os autores sugerem que a atividade ou expressão da GS pode influenciar na captação de glutamato pelos EAAT's astrocíticos, assim como também no acúmulo e liberação de Gln pelos astrócitos. Isso implica que

a atividade da GS pode ser recrutada quando há aumento na recaptação de glutamato. Assim, é possível que frente ao aumento na recaptação de glutamato pelos EAAT's (GLT1 e GLAST) haja um aumento na atividade/expressão da GS. No entanto, é possível que esta relação entre a GS e os EAAT's seja estimulada por fatores específicos, uma vez que há uma outra linha de trabalhos mostrando que a deleção gênica de ambos os EAAT's em camundongos não altera a expressão da GS, que se mantém inalterada na região do córtex²¹⁴. Nesta outra linha, os autores sugerem que a expressão da GS não depende das expressões do GLAST ou GLT1. Em conjunto, os estudos divergentes de Zou et al.,¹⁷⁶ e Voutsinos-Porche *et al.*,²¹⁴ e os nossos com o NTS e RVLM sugerem que a relação entre os EAAT's e a GS pode ser determinada por outros fatores intrínsecos da região.

O GFAP também parece ser importante para a captação de glutamato pelos EAAT's astrocíticos e para atividade da GS^{94,215}. Estudos de Hughes et al.,²¹⁵ e Sullivan et al.,⁹⁴ mostraram que camundongos *knockout* para GFAP exibem redução na expressão de GLAST. Sugerindo que o GFAP é importante para ancoragem do transportador GLAST na membrana astrocítica, favorecendo sua função de *clearance* do glutamato extracelular. Além disso, a microinjeção ICV de ácido L-aminoadípico (L-AAA), um inibidor funcional da GS, reduz a marcação imunohistoquímica de GFAP em astrócitos hipotalâmicos¹¹⁶. Os autores sugerem que a função do GFAP está, de algum modo, relacionada à captação de glutamato pelos EAAT's e conversão de glutamato-glutamina pela GS. Não obstante, observamos que animais 2R1C possuem redução na expressão do GFAP, da GS e dos EAAT's (GLT1 e GLAST) no RVLM.

Em fisiopatologias cardiovasculares como a hipertensão e insuficiência cardíaca, de fato observa-se um aumento na atividade glutamatérgica e angiotensinérgica no SNC, as quais promovem consequentemente um aumento na atividade dos neurônios pré-simpáticos do RVLM^{17,125,216–218}. Estudos de Isegawa *et al.*,¹²⁵ observaram em camundongos com insuficiência cardíaca e *knockout* para os receptores AT1 astrocíticos, redução da mortalidade, da concentração urinária de noradrenalina e aumento na fração de ejeção e no diâmetro da câmara cardíaca. Esses resultados sugerem que os astrócitos do RVLM contribuem para o aumento da simpatoexcitação e para o remodelamento cardíaco induzidos pela Ang-II durante a insuficiência cardíaca. Embora haja estudos sugerindo uma relação entre a ação angiotensínica sobre os astrócitos bulbares e a simpatoexcitação na insuficiência cardíaca, pouco é conhecido sobre essa interação na hipertensão.

Nesse sentido, nossos resultados biomoleculares sugerem que a redução da expressão dos marcadores do ciclo glutamato-glutamina astrocítico no RVLM pode estar contribuindo para o aumento da função glutamatérgica observada neste núcleo em animais com HRv^{17,207}. Adicionalmente, a análise de correlação entre a pressão arterial e a expressão dos marcadores astrocíticos mostrou que o aumento da pressão arterial em animais com HRv pode ser correlacionado à redução da expressão do GLT1 e da enzima GS no RVLM. Corroborando mais uma vez para o entendimento de que a redução da expressão e/ou função dos marcadores do ciclo glutamato-glutamina astrocítico participa da patogênese da HRv. Estes resultados também dão suporte aos estudos que sugerem que o bulbo, é de fato, o maior alvo da Ang-II circulante⁴⁴. De maneira que a redução da expressão desses marcadores astrocíticos

pode ajudar a entender o porquê da Ang-II promover aumento significativo na concentração de glutamato, especialmente no RVLM⁸².

Considerando os nossos estudos *in vivo*, é possível que as respostas cardiovasculares ao DHK, ao L-AAA e ao FCt sejam núcleo dependentes e embora não tenhamos observado maiores efeitos funcionais sobre a CM, nossos estudos prévios *in vitro*¹⁰² e outros com microinjeções em núcleos cardiovasculares específicos⁶⁹ observaram que de fato a Ang-II reduz a recaptação de glutamato. Assim como os nossos estudos *in vitro* também sugerem que a atividade astrocítica está reduzida em outros núcleos cardiovasculares específicos, o NTS e RVLM - embora com perfis de expressão diferentes, dos animais hipertensos. Esses achados também corroboram com os diversos estudos que mostram que os EAAT's e a GS se encontram alterados apenas em condições fisiopatológicas^{181,198,219,220}. Adicionalmente, outros estudos seriam importantes para confirmar o perfil funcional desses marcadores astrocíticos em animais hipertensos, especialmente nestes núcleos bulbares.

5.1.5. Expressão dos marcadores da atividade astrocítica está alterada em núcleos hipotalâmicos de ratos com HRv

Nossos resultados mostraram que há na HRv redução na expressão do GLAST, mas não de GLT1 no SFO. Provavelmente isso se deva ao fato de que no SFO há uma predominância intrínseca de GLAST sobre o GLT1²²¹. Além disso, diferentes estudos *in vitro* sugerem que a Ang-II promove redução na atividade/expressão dos transportadores de glutamato astrocíticos no hipotálamo^{69,102}. Contudo, essa redução na expressão proteica de GLAST no

SFO não foi acompanhada de alterações na expressão proteica da GS. Mais uma vez corroborando com o entendimento de que a relação entre os EAAT's e a GS pode ser determinada por outros mecanismos astrocíticos coexistentes na região ^{176,214}. Outro ponto que reforça essa hipótese é que o perfil da expressão desses marcadores, EAAT's e GS, difere entre os núcleos do NTS, RVLM e SFO, provavelmente devido às funções distintas desses núcleos no controle cardiovascular. Além disso, não foi observada alterações na expressão do GFAP no SFO de animais com HRv, sugerindo que embora haja redução da recaptação de glutamato neste núcleo, não parece haver diferenças na modulação física do citoesqueleto astrocítico nos espaços extrasinápticos entre os animais normotensos e com HRv.

Na região do PVN não encontramos alterações significativas na expressão dos EAAT's em ratos com HRv, mas isso não indica que a função de recaptação não esteja alterada, uma vez que os estudos eletrofisiológicos e *in vivo* de Stern et al., ⁶⁹ previamente demonstraram a Ang-II atua nos astrócitos do PVN reduzindo sua recaptação de glutamato, o que resulta em um aumento da atividade neuronal nesta região e em um aumento da pressão arterial e da atividade simpática. Outros estudos mostraram que em animais com insuficiência cardíaca só foi possível observar redução na expressão do GLT1 quando separada as frações de membrana e do citosol¹²². Logo, ainda é possível que os EAAT's estejam presentes, em sua maior parte, translocados a vesículas no citosol e não ancorados sobre a superfície da membrana plasmática, o que, de fato, determinaria sua real função de recaptação ¹²². Além disso, observamos um aumento da expressão proteica de GFAP na região do PVN de ratos HRv, similar ao observado no PVN de animais com

insuficiência cardíaca¹³⁰. Embora o aumento do GFAP possa sugerir superativação dos astrócitos, também sugere aumento dos prolongamentos astrocíticos com consequente redução do espaço extracelular e do contato neuronal ¹¹⁶. Nesse sentido, é necessário considerar que embora a quantificação do GFAP em tecido – por *western blotting*, imunohistoquímica ou imunofluorescência - seja utilizada para avaliar a plasticidade dos processos astrocíticos sobre o espaço sináptico ^{116,156,222,223}, apenas os trabalhos multidisciplinares que avaliaram o GFAP por pelo menos duas técnicas diferentes – *western blotting* e imunofluorescência de marcação múltipla principalmente – foram capazes de efetivamente estabelecer se houve alterações nos processos astrocíticos em contato com os terminais neuronais. Logo, pela técnica que utilizamos, podemos sugerir que o aumento da expressão de GFAP observado no PVN de animais com HRv indica proliferação de astrócitos e/ou hipertrofia do corpo celular e processos astrocíticos nesta região, fenômeno conhecido com astrogliose (*para revisão ver ENG; GHIRNIKAR, 1994*), mas ainda não nos permite sugerir se houve, ou não, alterações nos processos astrocíticos que limitam o espaço físico da sinapse.

5.2. Considerações metodológicas sobre a difusão dos fármacos na cisterna magna & a escolha das doses utilizadas

O cérebro é um sistema multi-compartimental dinâmico, no qual todos os processos de entrada, difusão, metabolismo, ligação e eliminação determinam as concentrações locais das moléculas no SNC. A região da cisterna magna (CM), disposta entre a face inferior do cerebelo e a face

posterior do bulbo, é um compartimento aberto por onde passa o líquido cefalorraquidiano (LCR) que vem do aqueduto, sendo este fluxo direcionado aos espaços subaracnóides e/ou de volta ao aqueduto e 3ºVentrículo^{225,226}.

Estudos com modelagem farmacocinética sugerem que a cisterna magna de ratos (250g) possui aproximadamente 17 µl de LCR circulante em um fluxo de 2 µL/min^{227,228}. Por isto, foi estabelecido um volume fixo de 5µL para as microinjeções ICM, correspondendo a 22% do volume total em movimento neste compartimento, o qual foi inicialmente diluído no LCR que circunda toda a extensão da superfície bulbar preservando, sobretudo, os efeitos sob os mecanismos funcionais cardiovasculares^{136,137}.

Estudos com traçadores fluorescentes e radiomarcados microinjetados na CM mostraram que estas substâncias entram no parênquima cerebral através de espaços para- e perivasculares, onde se difundem para o interstício em diferentes profundidades^{226,229}. No interstício o fluxo reduz significativamente para cerca de 0,1 µL/min²³⁰, fazendo com que a concentração dos fármacos seja maior em regiões mais próximas às superfícies, em 1-2mm de distância, que em regiões mais profundas do cérebro^{231–233}. Isto sugere que os fármacos microinjetados na CM podem atingir os núcleos cardiovasculares do NTS e RVLM, uma vez que estão localizados na região dorsal e ventral do bulbo em aproximadamente 1mm de distância da superfície^{135–137,165,234}, entretanto, possivelmente, em menor grau de concentração que a dose microinjetada.

Logo, no presente estudo consideramos que o efeito cardiovascular observado após as microinjeções ICM foi resultado da ação dos inibidores em

si sobre as células dispostas na região do bulbo, especialmente no parênquima mais próximo à superfície bulbar. Dentro desse contexto, convém ressaltar que embora o NTS esteja na porção dorsal, logo abaixo da região da CM, nem sempre o efeito pressor da microinjeção ICM reflete a ação dos fármacos diretamente sobre este núcleo¹³⁶, por outras vezes reflete efeito semelhante à microinjeção na região direta no RVLM^{165,234}.

Além da difusão dos inibidores na CM, também consideramos a escolha das doses para os inibidores gliais: DHK, L-AAA e FCt. Estudos anteriores mostram que a microinjeção de DHK em doses e núcleos diferentes (1mM no PVN vs. 5mM no NTS) promovem respostas cardiovasculares que divergem em ratos anestesiados^{69,98,164}. Estudos de Matott et al.,⁹⁸ observaram que respostas depressoras basais só foram observadas quando o DHK foi microinjetado em doses elevadas no NTS (de 2, 3 e 5 mM), as quais promoveram uma redução drástica de -20 a -40 mmHg na PAM e de -50 a aproximadamente -100% na atividade simpática renal dos ratos anestesiados, enquanto que na dose menor de 0,5 mM - mais próxima à dose que usamos de 1 mM - não promoveu tais efeitos.

Além disso, uma maior dose de DHK e/ou seu acúmulo gradual no tecido são importantes fatores a serem considerados quando se busca avaliar o papel funcional da recaptação pelo GLT1 preservando a integridade neuronal. Doses elevadas de DHK parecem não ser indicadas em protocolos *in vivo*, uma vez que provocam um acúmulo nos níveis de glutamato que transcendem seus níveis fisiológicos e, ao invés demonstrar apenas o efeito funcional do mecanismo de recaptação de glutamato pelos astrócitos, acabam levando à neurotoxicidade e até à morte neuronal, como já observado em

experimentos anteriores com microdiálise no corpo estriado e hipocampo de ratos²³⁵⁻²³⁷. Dessa forma, nós optamos por utilizar em nosso estudo, a dose de 1 mM de DHK, previamente usada nas microinjeções no PVN por Stern et al.,⁶⁹, a qual mostrou ser mais segura para a seletividade da resposta cardiovascular *in vivo*, minimizando os riscos neurotóxicos aos neurônios glutamatérgicos que continuaram funcionais após a microinjeção de DHK.

Para a escolha da dose do L-AAA, consideramos que o tempo e/ou constância da exposição à droga, mesmo em baixas doses (1mM), parecem ser os principais fatores relacionados à toxicidade celular *in vitro*^{238,239}. Grande parte dos estudos *in vivo* utiliza o L-AAA, em diferentes doses (2 – 10mM), para avaliar seu efeito sobre a inibição astrocítica, a qual é mensurada pela retração dos processos astrocíticos mediada pelo GFAP no SON e Córtex de ratos^{116,138,240,241}. Entretanto, estudos anteriores de Garthwaite et al.,²³⁹ mostraram que doses maiores de L-AAA (5mM) também promovem a morte celular de neurônios cerebelares, entretanto estudos posteriores sugeriram que as mudanças neuronais induzidas pelo L-AAA podem não ser manifestadas em abordagens *in vivo*²⁴². Por isso a importância da escolha de uma dose menor capaz de promover efeitos cardiovasculares mensuráveis. Estudos anteriores de Xu et al.,^{240,243} mostraram que a injeção intracranial de L-AAA (2mM) sob a superfície do córtex reduz a expressão de GFAP na área afetada, mas não promove alterações na PAM nos ratos anestesiados. Em um desses trabalhos, os autores também observaram que o L-AAA na dose de 2mM não produziu mudanças mensuráveis na amplitude da resposta evocada pelos neurônios corticais *in vivo*²⁴⁰. Sugerindo que esta dose não afeta a função neuronal. Cabe ressaltar que estas análises *in vivo* foram feitas apenas 24hrs após a

injeção de L-AAA, o que poderia justificar a ausência de resposta pressora observada. Mas considerando que a atividade neural é preservada após a dose de 2mM, nós realizamos testes pilotos na CM e optamos pela escolha desta dose, a qual promoveu resposta pressora (aprox. 6,3 mmHg) imediatamente após a microinjeção sem produzir o comportamento rotor, característico de doses neurotóxicas microinjetadas próximas ao cerebelo.

A escolha da dose do FCt foi feita com base nos estudos pioneiros de Paulsen et al.,¹³⁹, os quais mostraram que a microinjeção de 1nMol de FCt no corpo estriado de ratos promoveu a inibição seletiva e reversível da atividade da glia na região. Os autores ainda observaram que em massas maiores ($\geq$ 2mMol), o FCt afetou as estruturas gliais e neuronais de maneira irreversível. Logo, os diversos estudos posteriores cardiovasculares conservaram a massa de 1mMol e adaptaram apenas ao volume desejado, tal como fizemos ao optar pela concentração de 1nMol/5 μ L (ou 0,2mM)^{124,203,244}.

Sumário dos Resultados |

6 Sumário dos Resultados

Nossos resultados *in vivo* com a microinjeção ICM mostraram que:

- ✓ não houve alterações na PAM, FC, PAS e PAD induzidas pelo DHK em ratos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS;
- ✓ não houve alterações na PAM, FC, PAS e PAD induzidas pelo L-AAA em ratos SHAM, 2R1C ou R1C/LOS;
- ✓ não houve alterações na PAM, FC, PAS e PAD induzidas pelo FCt em ratos SHAM e 2R1C/LOS, mas houve um aumento pressor pontual (aos 6 segundos na PAM; aos 5, 6, 8 e 10 segundos na PAS e aos 8 segundos na PAD de ratos 2R1C;

Enquanto os nossos resultados *in vitro* mostraram que animais 2R1C apresentam:

- ✓ redução na expressão de GFAP no NTS e no RVLM e um aumento na expressão no PVN;
- ✓ redução da expressão de GLT1 no RVLM;
- ✓ redução na expressão do GLAST no RVLM e SFO;
- ✓ redução da expressão da GS no NTS e no RVLM.

Conclusões |

7 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que as respostas cardiovasculares ao DHK, ao L-AAA e ao FCt parecem ser núcleo dependentes. A redução pontual da PA após a inibição glial na cisterna magna apenas em animais hipertensos sugere que a glia bulbar está alterada nessa fisiopatologia, no entanto ainda são necessários outros estudos que investiguem a natureza dessa alteração considerando a multiplicidade funcional dessas células e a individualidade dos núcleos. Em relação aos astrócitos, nossos resultados *in vitro* mostraram há um prejuízo na expressão dos marcadores da atividade astrocítica nos núcleos bulbares, do NTS e RVLM, e nos núcleos hipotalâmicos, do SFO e PVN, de animais com HRv. Dessa forma, sugerimos que há alteração da atividade astrocítica em núcleos específicos envolvidos na modulação cardiovascular em ratos hipertensos. Nossos resultados nos estimulam à realização de estudos adicionais, sobretudo *in vivo*, para melhor compreendermos a participação dos astrócitos bulbares na modulação cardiovascular de ratos hipertensos.

Perspectivas|

8 Perspectivas

Devido às dificuldades de se realizar estudos abordando o sistema nervoso central *in vivo* e a dificuldade que se tem de estudar as células da glia nessas condições, ainda há carência de estudos funcionais na literatura que avaliem a real função dos astrócitos sobre a modulação cardiovascular em animais não anestesiados. Isto porque a maioria das abordagens experimentais dos estudos que investigam os mecanismos de recaptação e conversão de glutamato pelos astrócitos utilizam técnicas *in vitro* ou eletrofisiológicas para avaliar apenas a dinâmica e/ou o papel desses mecanismos ao nível celular e molecular^{69,98,99,102,117,119,120,122,245–264}. Poucos estudos avaliaram os mecanismos de captação e conversão de glutamato pelos EAAT's astrocíticos em regiões hipotalâmicas e bulbares contextualizando aos efeitos cardiovasculares^{69,98,99,102,117–120,122,255,257}, e destes, menos ainda em modelos de animais inteiros^{69,98,99,117–120}. Dentro dos nossos conhecimentos, nosso trabalho foi o primeiro a investigar as alterações cardiovasculares e moleculares associadas aos mecanismos astrocíticos de captação e conversão de glutamato na região do bulbo de animais hipertensos e sem o efeito anestésico. O fato é que estudos que investigam as diferentes funções da glia ainda são desafiadores. Há uma série de debates no meio científico que questionam a escassez de métodos específicos o suficiente para avaliar as diferentes funções astrocíticas dentro de um ambiente próximo ao fisiológico²⁶⁵. Os estudos *in vivo* citados no decorrer deste trabalho, os quais avaliaram a função dos EAAT's no NTS^{98,118} e no PVN⁶⁹, observaram efeitos cardiovasculares, mas nesses experimentos o ambiente neural também

estava alterado pela condição anestésica^{146,178,266}. O que reforça a necessidade de confirmar esses experimentos prévios com outras abordagens *in vivo* sem a influência de anestésicos e utilizando doses de fármacos mais refinadas ao mecanismo de interesse, que não implique em resultados exacerbados que não correspondem a real função da glia naquele processo. Por isso, nesse longo debate ao entorno da glia há um consenso de que avaliar a função dos astrócitos exige que sejam feitas abordagens experimentais mais sutis, mas com métodos mais sensíveis. Uma vez que a maioria das respostas dos astrócitos aos estímulos se apresentam em uma curva estreita em que quando não se produz uma resposta exacerbada, não produz nada²⁶⁵. O grande desafio está em "*falar*" com os astrócitos usando um baixo nível de estimulação fisiologicamente relevante e vê-los responder integrando uma resposta final no organismo vivo. Ainda estamos em busca disto, mas estudos como os nossos, que observaram alterações nos marcadores astrocíticos cuja inibição funcional não resultou em mudanças fisiológicas visíveis, são muito importantes porque demonstram que existem especificidades inerentes aos núcleos que torna mais complexa a relação sinérgica dos astrócitos e neurônios nos núcleos cardiovasculares, sobretudo na fisiopatologia da HRV.

Dentro do que avaliamos, o estudo dos mecanismos glutamatérgicos astrocíticos fornece uma base para melhor compreendermos os mecanismos centrais ligados à gênese da hipertensão nos núcleos cardiovasculares. Devemos agora nos questionar se a alteração astrocítica é um déficit primário ou uma consequência das mudanças neuronais em cada núcleo cardiovascular. Podendo essas mudanças astrocíticas causadas, entre outros fatores, pela mudança na plasticidade

sináptica^{7,17,39,59,70,71,154,157,195,206,208,209,267}, pelas alterações nas funções glutamatérgicas^{17,59,195,208,209,268}, angiotensinérgicas^{39,59,70} e oxidativas^{7,59,157,206,267} na hipertensão. Portanto, ainda é necessário utilizar abordagens mais específicas e sensíveis, inclusive em outros modelos de hipertensão, para melhor compreendermos a natureza dessa interação entre os astrócitos e neurônios no controle da pressão arterial.

Referências|

9 Referências

1. Faber JE, Brody MJ. Neural Contribution to Renal Hypertension Following Acute Renal Artery Stenosis in Conscious Rats. *Hypertension*. 1983;5(2):I-155-I-164. doi:10.1161/01.HYP.5.2_Pt_2.I155
2. Michelini LC, Bonagamba LG. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. *Hypertension*. 1988;11:I75-I79. doi:10.1161/01.HYP.11.2
3. Cutsforth-Gregory JK, Benarroch EE. Nucleus of the solitary tract, medullary reflexes, and clinical implications. *Neurology*. 2017;88(12):1187-1196. doi:10.1212/WNL.0000000000003751
4. Reid IA. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 1992;262(6 25-6). doi:10.1152/ajpendo.1992.262.6.e763
5. Cowley AW, DeClue JW. Quantification of baroreceptor influence on arterial pressure changes seen in primary angiotensin induced hypertension in dogs. *Circ Res*. 1976;39(6):779-787. doi:10.1161/01.RES.39.6.779
6. Brooks VL. Interactions between angiotensin II and the sympathetic nervous system in the long-term control of arterial pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24(1):83-90. doi:10.1111/j.1440-1681.1997.tb01788.x
7. Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Carillo BA, et al. Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. 2009;22(5):484-492. doi:10.1038/ajh.2009.17
8. Aronow WS. Treatment of systemic hypertension. *Am J Cardiovasc Dis*. 2012;2(3):160-170. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22937486>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3427981>
9. Parati G, Esler M. The human sympathetic nervous system: Its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J*. Published online 2012.

- doi:10.1093/eurheartj/ehs041
10. Brunström M, Carlberg B. Association of blood pressure lowering with mortality and cardiovascular disease across blood pressure levels a systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med.* 2018;178(1):28-36. doi:10.1001/jamainternmed.2017.6015
 11. Takeda K, Buñag RD. Augmented sympathetic nerve activity and pressor responsiveness in DOCA hypertensive rats. *Hypertension.* 1980;2(1):97-101. doi:10.1161/01.HYP.2.1.97
 12. Arribas SM, Alonso MJ, Marín J, et al. Noradrenergic transmission in the tail artery of hypertensive rats transgenic for the mouse renin gene Ren-2. *J Auton Pharmacol.* 1996;16(2):69-77. doi:10.1111/j.1474-8673.1996.tb00414.x
 13. Cabassi A, Vinci S, Cantoni AM, et al. Sympathetic activation in adipose tissue and skeletal muscle of hypertensive rats. *Hypertension.* 2002;39(2 II):656-661. doi:10.1161/hy0202.103471
 14. Leenen FHH, Ruzicka M, Huang BS. The brain and saltsensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2002;4(2):129-135. doi:10.1007/s11906-002-0037-y
 15. Guimarães DD, Cruz JC, Carvalho-Galvão A, et al. Dietary nitrate reduces blood pressure in rats with angiotensin II-induced hypertension via mechanisms that involve reduction of sympathetic hyperactivity. *Hypertension.* 2019;73(4):839-848. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12425
 16. Fink GD. Long-term sympatho-excitatory effect of angiotensin II: A mechanism of spontaneous and renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997;24(1):91-95. doi:10.1111/j.1440-1681.1997.tb01789.x
 17. Carvalho THF, Bergamaschi CT, Lopes OU, Campos RR. Role of Endogenous Angiotensin II on Glutamatergic Actions in the Rostral Ventrolateral Medulla in Goldblatt Hypertensive Rats. *Hypertension.* 2003;42(4):707-712. doi:10.1161/01.HYP.0000086524.35251.2D
 18. Braga VA, Medeiros IA, Ribeiro TP, França-Silva MS, Botelho-Ono MS, Guimarães DD. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the

- SFO-PVN-RVLM pathway: Implications in neurogenic hypertension. *Brazilian J Med Biol Res.* 2011;44(9):871-876. doi:10.1590/S0100-879X2011007500088
19. Nishi EE, Bergamaschi CT, Oliveira-Sales EB, Simon KA, Campos RR. Losartana reduces oxidative stress within the rostral ventrolateral medulla of rats with renovascular hypertension. *Am J Hypertens.* 2013;26(7):858-865. doi:10.1093/ajh/hpt037
 20. Rossi NF, Zenner Z, Rishi AK, Levi E, Maliszewska-Scislo M. AT 1 receptors in the subfornical organ modulate arterial pressure and the baroreflex in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2019;316(2):R172-R185. doi:10.1152/ajpregu.00289.2018
 21. Tigerstedt R, Bergman. PG. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol.* 1898;8(1):223–271.
 22. Goldblatt H. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION: I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA. *J Exp Med.* Published online 1934. doi:10.1084/jem.59.3.347
 23. Goldblatt H. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION : III. THE PRODUCTION OF PERSISTENT HYPERTENSION IN MONKEYS (MACAQUE) BY RENAL ISCHEMIA. *J Exp Med.* 1937;65(5):671-675.
 24. BRAUN-MENENDEZ E, FASCIOLO JC, LELOIR FL, MUNOZ JM. THE SUBSTANCE CAUSING RENAL HYPERTENSION. *J Physiol.* 1940;98:283-298.
 25. Skrbic R, Igic R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). *Peptides.* 2009;30(10):1945-1950. doi:10.1016/j.peptides.2009.07.003
 26. Page I, Helmer O. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J Exp Med.* 1940;71(1):29-42. doi:10.1084/jem.71.1.29
 27. Page I, Helmer O, Plentl A, Kohlstaedt K, Corcoran A. Suggested Change in Designation of `` Renin-Activator ’ ’ (Hypertensinogen) to Renin-Substrate (alpha 2 Globulin). *Science (80-).* 1943;98(2537):153-154.
 28. Skeggs L, Kahn J, Shumway N. THE PREPARATION AND FUNCTION

- OF THE HYPERTENSIN-CONVERTING ENZYME. *J Exp Med*. 1956;103(3):295–299.
29. BRAUN-MENENDEZ E, PAGE I. Suggested Revision of Nomenclature-- Angiotensin. *Science* (80-). 1958;127(3292):242–242.
 30. Faarup P. RENIN LOCATION IN THE DIFFERENT PARTS OF THE JUXTAGLOMERULAR APPARATUS IN THE CAT KIDNEY: 2. Fractions of the Afferent Arteriole, The Cell Group of Goormaghtigh, the Efferent Arteriole and the Glomerulus. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1968;71(4):509-521. doi:10.1111/j.1699-0463.1967.tb05173.x
 31. Frederiksen O, Leyssac PP, Skinner SL. Sensitive osmometer function of juxtaglomerular cells in vitro. *J Physiol*. 1975;252(3):669-679. doi:10.1113/jphysiol.1975.sp011164
 32. Baumbach L, Leyssac P, Skinner S. Studies on renin release from isolated superfused glomeruli: effects of temperature, urea, ouabain and ethacrynic acid. . *J Physiol*. 1976;258(1):243-256.
 33. Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension*. 1991;17(5):707-719. doi:10.1161/01.HYP.17.5.707
 34. Jr RF, José V, Cesar H. Modelos de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2001;8(1):19-29.
 35. Cavalcanti C de O, Alves RR, de Oliveira AL, et al. Inhibition of PDE5 restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. *Front Physiol*. 2016;7(JAN):1-9. doi:10.3389/fphys.2016.00015
 36. Carvalho-Galvão A, Guimarães DD, De Brito Alves JL, Braga VA. Central inhibition of tumor necrosis factor alpha reduces hypertension by attenuating oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla in renovascular hypertensive rats. *Front Physiol*. 2019;10(APR):1-10. doi:10.3389/fphys.2019.00491
 37. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*. 2013;19(12):1584-1596. doi:10.1038/nm.3407
 38. Volicer L, Loew CG. Penetration of angiotensin II into the brain. *Neuropharmacology*. 1971;10(5):631-634. doi:10.1016/0028-3908(71)90029-3

39. Biancardi VC, Son SJ, Ahmadi S, Filosa JA, Stern JE. Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. *Hypertension*. 2014;63(3):572-579. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01743
40. Gross PM, Blasberg RG, Fenstermacher JD, Patlak CS. The microcirculation of rat circumventricular organs and pituitary gland. *Brain Res Bull*. 1987;18(1):73-85. doi:10.1016/0361-9230(87)90035-9
41. Li Z, Ferguson A V. Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilize angiotensin as a neurotransmitter. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 1993;265(2 34-2):302-309. doi:10.1152/ajpregu.1993.265.2.r302
42. Gebke E, Muller AR, Jurzak M, Gerstberger R. Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience*. 1998;85(2):509-520. doi:10.1016/S0306-4522(97)00601-5
43. Phillips M, Felix D. SPECIFIC ANGIOTENSIN II RECEPTIVE NEURONS IN THE CAT SUBFORNICAL ORGAN. *Brain Res*. 1976;109(4):531-540.
44. Zubcevic J, Santisteban MM, Perez PD, et al. A single angiotensin II hypertensive stimulus is associated with prolonged neuronal and immune system activation in Wistar-Kyoto rats. *Front Physiol*. 2017;8(AUG):592. doi:10.3389/fphys.2017.00592
45. Cato MJ, Toney GM. Angiotensin II excites paraventricular nucleus neurons that innervate the rostral ventrolateral medulla: an in vitro patch-clamp study in brain slices. *J Neurophysiol*. 2005;93(1):403-413. doi:10.1152/jn.01055.2003
46. van der Kooy D, Koda LY. Organization of the projections of a circumventricular organ: The area postrema in the rat. *J Comp Neurol*. 1983;219(3):328-338. doi:10.1002/cne.902190307
47. Tan PSP, Killinger S, Horiuchi J, Dampney RAL. Baroreceptor reflex modulation by circulating angiotensin II is mediated by AT1 receptors in the nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(6):2267-2279. doi:10.1152/ajpregu.00267.2007
48. SUN M-K, SPYER K M. Gaba-mediated inhibition of medullary vasomotor

- neurones by area postrema stimulation in rats. *J Physiol* (1991),. 1991;(436):669-684.
49. Wilson CG, Bonham AC. Area postrema excites and inhibits sympathetic-related neurons in rostral ventrolateral medulla in rabbit. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 1994;266(3 35-3). doi:10.1152/ajpheart.1994.266.3.h1075
 50. Contreras RJ, Beckstead RM, Norgren R. The central projections of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves: an autoradiographic study in the rat. *J Auton Nerv Syst*. 1982;6(3):303-322. doi:10.1016/0165-1838(82)90003-0
 51. Kumada M, Terui N, Kuwaki T. Arterial baroreceptor reflex: Its central and peripheral neural mechanisms. *Prog Neurobiol*. 1990;35(5):331-361. doi:10.1016/0301-0082(90)90036-G
 52. Affleck VS, Coote JH, Pyner S. The projection and synaptic organisation of NTS afferent connections with presympathetic neurons, GABA and nNOS neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience*. 2012;219:48-61. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.070
 53. Mendelowitz D, Yang M, Andresen MC, Kunze DL. Localization and retention in vitro of fluorescently labeled aortic baroreceptor terminals on neurons from the nucleus tractus solitarius. *Brain Res*. 1992;581(2):339-343. doi:10.1016/0006-8993(92)90729-S
 54. Amendt K, Czachurski J, Dembowski K, Seller H. Bulbospinal projections to the intermediolateral cell column; a neuroanatomical study. *J Auton Nerv Syst*. 1979;1(1):103-117. doi:10.1016/0165-1838(79)90009-2
 55. Bains JS, Potyok a, Ferguson a V. Angiotensin II actions in paraventricular nucleus: functional evidence for neurotransmitter role in efferents originating in subfornical organ. *Brain Res*. 1992;599(2):223-229.
 56. Bains JS, Ferguson A V. Paraventricular nucleus neurons projecting to the spinal cord receive excitatory input from the subfornical organ. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 1995;268(3):R625-R633.
 57. Papas S, Smith P, Ferguson A V. Electrophysiological evidence that systemic angiotensin influences rat area postrema neurons. *Am J Physiol*

- *Regul Integr Comp Physiol*. 1990;258(1 27-1).
doi:10.1152/ajpregu.1990.258.1.r70
58. Nunes FC, Braga VA. Chronic angiotensin II infusion modulates angiotensin II type I receptor expression in the subfornical organ and the rostral ventrolateral medulla in hypertensive rats. *JRAAS - J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst*. 2011;12(4):440-445.
doi:10.1177/1470320310394891
 59. Zhang Y, Yu XJ, Chen WS, et al. Exercise training attenuates renovascular hypertension partly via RAS-ROS-glutamate pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Sci Rep*. 2016;6(May):1-10.
doi:10.1038/srep37467
 60. Stornetta RL, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG, Lynch KR. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science*. 1988;242(4884):1444-1446. doi:10.1126/science.3201232
 61. Inagami T, Celio MR, Clemens DL, et al. Renin in rat and mouse brain: immunohistochemical identification and localization. *Clin Sci*. 1980;59 Suppl 6:49-51. doi:10.1042/cs059049s
 62. Li W, Peng H, Mehaffey EP, et al. Neuron-specific (Pro)renin receptor knockout prevents the development of salt-sensitive hypertension. *Hypertension*. 2014;63(2):316-323.
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02041
 63. Shi P, Diez-Freire C, Jun JY, et al. Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension. *Hypertension*. 2010;56(2):297-303.
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150409
 64. Saavedra JM, Chevillard C. ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME IS PRESENT IN THE SUBFORNICAL ORGAN AND OTHER CIRCUMVENTRICULAR ORGANS OF THE RAT. *Neurosci Lett*. 1982;29:123-127.
 65. Arregui A, Iversen LL. Angiotensin-converting enzyme: Presence of high activity in choroid plexus of mammalian brain. *Eur J Pharmacol*. 1978;52(1):147-150. doi:10.1016/0014-2999(78)90035-3
 66. Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortès C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult

- rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol.* 1997;18(18):383-439. doi:10.1006/frne.1997.0155
67. Chen Q, Pan HL. Signaling mechanisms of angiotensin II-induced attenuation of GABAergic input to hypothalamic presympathetic neurons. *J Neurophysiol.* 2007;97(5):3279-3287. doi:10.1152/jn.01329.2006
 68. Latchford KJ, Ferguson A V. ANG II-induced excitation of paraventricular nucleus magnocellular neurons: A role for glutamate interneurons. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(5 55-5). doi:10.1152/ajpregu.00603.2003
 69. Stern JE, Son S, Biancardi VC, Zheng H, Sharma N, Patel KP. Astrocytes Contribute to Angiotensin II Stimulation of Hypothalamic Neuronal Activity and Sympathetic Outflow. *Hypertension.* 2016;68(6):1483-1493. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07747
 70. Qi J, Zhang DM, Suo YP, et al. Renin-angiotensin system modulates neurotransmitters in the paraventricular nucleus and contributes to angiotensin ii-induced hypertensive response. *Cardiovasc Toxicol.* 2013;13(1):48-54. doi:10.1007/s12012-012-9184-9
 71. Kagiya S, Varela A, Phillips MI, Galli SM. Antisense inhibition of brain renin-angiotensin system decreased blood pressure in chronic 2-kidney, 1 clip hypertensive rats. *Hypertension.* 2001;37(2 II):371-375. doi:10.1161/01.HYP.37.2.371
 72. Chen AD, Zhang SJ, Yuan N, et al. Angiotensin AT1 receptors in paraventricular nucleus contribute to sympathetic activation and enhanced cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. *Exp Physiol.* 2011;96(2):94-103. doi:10.1113/expphysiol.2010.054353
 73. Fleegal-Demotta MA, Doghu S, Banks WA. Angiotensin II modulates BBB permeability via activation of the AT 1 receptor in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(3):640-647. doi:10.1038/jcbfm.2008.158
 74. Biancardi V, Son S, Ahmadi S, Filosa J, Javier E. Circulating Angiotensin II Gains Access To the Hypothalamus and Brainstem During Hypertension. *Hypertension.* 2014;63(3):572–579.

- doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01743.
75. Fan Y, Yang X, Tao Y, Lan L, Zheng L, Sun J. Tight junction disruption of blood brain barrier in white matter lesions in chronic hypertensive rats. *Neuroreport*. 2015;26(17):1039-1043.
doi:10.1097/WNR.0000000000000464
 76. Biancardi VC, Stern JE. Compromised blood-brain barrier permeability: Novel mechanism by which circulating angiotensin II signals to sympathoexcitatory centres during hypertension. *J Physiol*. 2016;594(6):1591-1600. doi:10.1113/JP271584
 77. Yao ST, May CN. Intra-carotid angiotensin II activates tyrosine hydroxylase-expressing rostral ventrolateral medulla neurons following blood-brain barrier disruption in rats. *Neuroscience*. 2013;245:148-156.
doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.023
 78. Gabor A, Leenen FHH. Central mineralocorticoid receptors and the role of angiotensin ii and glutamate in the paraventricular nucleus of rats with angiotensin ii-induced hypertension. *Hypertension*. 2013;61(5):1083-1090. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00797
 79. Sun A, Li D. Cardiovascular responses to intracerebroventricular injection of GABA in renovascular hypertensive rats. *Acta Pharmaeologia Sinica*. 1994;15(2):136-138.
 80. Martin DS, Haywood JR. Reduced GABA inhibition of sympathetic function in renal-wrapped hypertensive rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 1998;275(5 44-5):1523-1529.
doi:10.1152/ajpregu.1998.275.5.r1523
 81. LaGrange LP, Toney GM, Bishop VS. Effect of Intravenous Angiotensin II Infusion on Responses to Hypothalamic PVN Injection of Bicuculline. *Hypertension*. 2003;42(6):1124-1129.
doi:10.1161/01.HYP.0000102181.83892.04
 82. Légat L, Smolders I, Dupont AG. Angiotensin-II-mediated AT1 receptor stimulation increases glutamate release within the rostral ventrolateral medulla of normotensive rats. *Hypertens Res*. 2020;43(8):848-850.
doi:10.1038/s41440-020-0419-z
 83. Tasker JG, Oliet SHR, Bains JS, Brown CH, Stern JE. Glial Regulation of

- Neuronal Function: From Synapse to Systems Physiology. *J Neuroendocrinol.* 2012;24(4):566-576. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02259.x
84. Pfrieger FW. Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Res Rev.* 2010;63(1-2):39-46. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.11.002
 85. Allen NJ, Lyons DA. System Formation and Function. *Science (80-).* 2018;185(October):181-185.
 86. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(1):41-53. doi:10.1038/nrn1824
 87. Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1369-1376. doi:10.1038/nn2003
 88. Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 2011;14(6):724-738. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.016
 89. Bellot-Saez A, Kékesi O, Morley JW, Buskila Y. Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017;77:87-97. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.03.002
 90. Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells.* 2019;8(2):184. doi:10.3390/cells8020184
 91. Kanai Y, Cléménçon B, Simonin A, et al. The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):108-120. doi:10.1016/j.mam.2013.01.001
 92. Roberts RC, Roche JK, McCullumsmith RE. Localization of excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 in human postmortem cortex: A light and electron microscopic study. *Neuroscience.* 2014;277:522-540. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.07.019
 93. Lehre KP, Danbolt NC. The number of glutamate transport subtype molecules at glutamatergic synapses: Chemical and stereological

- quantification in young adult rat brain. *J Neurosci.* 1998;18(21):8751-8757. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-21-08751.1998
94. Sullivan SM, Lee A, Björkman ST, et al. Cytoskeletal anchoring of GLAST determines susceptibility to brain damage: An identified role for GFAP. *J Biol Chem.* 2007;282(40):29414-29423. doi:10.1074/jbc.M704152200
 95. Filyakova NA, Patrusheva VE, Patrushev MV, Shusharina NN, Silina EV. Expression of transporter genes in astrocytes for different neuromediators in different brain departments in rats. *J Pharm Sci Res.* 2018;10(5):1297-1305.
 96. Chounlamountry K, Kessler JP. The ultrastructure of perisynaptic glia in the nucleus tractus solitarii of the adult rat: Comparison between single synapses and multisynaptic arrangements. *Glia.* Published online 2011. doi:10.1002/glia.21135
 97. Guo W, Imai S, Zou S, et al. Altered glial glutamate transporter expression in descending circuitry and the emergence of pain chronicity. *Mol Pain.* 2019;15. doi:10.1177/1744806918825044
 98. Matott MP, Kline DD, Hasser EM. *Glial EAAT2 Regulation of Extracellular NTS Glutamate Critically Controls Neuronal Activity and Cardiorespiratory Reflexes.* Vol 595.; 2017. doi:10.1113/JP274620
 99. Matott MP, Ruyle BC, Hasser EM, Kline DD. Excitatory amino acid transporters tonically restrain nTS synaptic and neuronal activity to modulate cardiorespiratory function. *J Neurophysiol.* 2016;115(3):1691-1702. doi:10.1152/jn.01054.2015
 100. Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: Glial localization in brain. *Science (80-).* Published online 1977. doi:10.1126/science.14400
 101. Albrecht J, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. Glutamine in the central nervous system: Function and dysfunction. *Front Biosci.* 2007;12(1):332-343. doi:10.2741/2067
 102. Flôr AFL, de Brito Alves JL, França-Silva MS, et al. Glial cells are involved in ANG-II-induced vasopressin release and sodium intake in awake rats. *Front Physiol.* 2018;9(MAY). doi:10.3389/fphys.2018.00430
 103. Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial

- intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol.* 1985;8(C):203-214. doi:10.1016/S0165-5728(85)80063-1
104. Inagaki M, Imakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N. Glial Fibrillary Acidic Protein: Dynamic Property and Regulation by Phosphorylation. *Brain Pathol.* 1994;4(3):239-243. doi:10.1111/j.1750-3639.1994.tb00839.x
 105. Tanaka J, Tada K, Takeda M, Hariguchi S, Nishimura T. Effect of metallic cations and pH on reassembly of glial fibrillary acidic protein. *Neurochem Int.* 1989;15(4):421-428. doi:10.1016/0197-0186(89)90159-9
 106. Stromer MH, Ritter MA, Pang YY, Robson RM. Effect of cations and temperature on kinetics of desmin assembly. *Biochem J.* 1987;246(1):75-81. doi:10.1042/bj2460075
 107. Inagaki M, Gonda Y, Nishizawa K, et al. Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a non- α -helical head domain. *J Biol Chem.* 1990;265(8):4722-4729.
 108. Yang ZW, Babitch JA. Factors Modulating Filament Formation by Bovine Glial Fibrillary Acidic Protein, the Intermediate Filament Component of Astroglial Cells. *Biochemistry.* 1988;27(18):7038-7045. doi:10.1021/bi00418a055
 109. Gould E, Frankfurt M, Westlind-Danielsson A, McEwen BS. Developing forebrain astrocytes are sensitive to thyroid hormone. *Glia.* 1990;3(4):283-292. doi:10.1002/glia.440030408
 110. O'Callaghan JP, Brinton RE, McEwen BS. Glucocorticoids Regulate the Synthesis of Glial Fibrillary Acidic Protein in Intact and Adrenalectomized Rats but Do Not Affect Its Expression Following Brain Injury. *J Neurochem.* 1991;57(3):860-869. doi:10.1111/j.1471-4159.1991.tb08230.x
 111. Balasingam V, Tejada-Berges T, Wright E, Bouckova R, Yong VW. Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J Neurosci.* 1994;14(2):846-856. doi:10.1523/jneurosci.14-02-00846.1994
 112. Giulian D, Young G, Krebs F, Lachman B. Interleukin-1 Injected into Mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J*

- Neurosci.* 1988;8(7):2485-2490.
113. Duan L, Yuan H, Su CJ, Liu YY, Rao ZR. Ultrastructure of junction areas between neurons and astrocytes in rat supraoptic nuclei. *World J Gastroenterol.* 2004;10(1):117-121. doi:10.3748/wjg.v10.i1.117
 114. Gordon GRJ, Bains JS. Noradrenaline triggers multivesicular release at glutamatergic synapses in the hypothalamus. *J Neurosci.* 2005;25(49):11385-11395. doi:10.1523/JNEUROSCI.2378-05.2005
 115. Theodosis DT, Trailin A, Poulain DA. Remodeling of astrocytes, a prerequisite for synapse turnover in the adult brain? Insights from the oxytocin system of the hypothalamus. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290(5). doi:10.1152/ajpregu.00755.2005
 116. Wang Y-F, Hatton GI. Astrocytic Plasticity and Patterned Oxytocin Neuronal Activity: Dynamic Interactions. *J Neurosci.* 2009;29(6):1743-1754. doi:10.1523/JNEUROSCI.4669-08.2009
 117. Matott MP, Hasser EM, Kline DD. Sustained Hypoxia Alters nTS Glutamatergic Signaling and Expression and Function of Excitatory Amino Acid Transporters. *Neuroscience.* 2020;430:131-140. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.01.034
 118. Yamamoto K, Mifflin S. Inhibition of glial glutamate transporter GLT1 in the nucleus of the solitary tract attenuates baroreflex control of sympathetic nerve activity and heart rate. *Physiol Rep.* 2018;6(18):1-9. doi:10.14814/phy2.13877
 119. Martinez D, Rogers R, Hermann G, Hasser E, Kline D. Astrocytic glutamate transporters reduce the neuronal and physiological influence of metabotropic glutamate receptors in nucleus tractus solitarii. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* Published online 2020. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1120700020921110><https://doi.org/10.1016/j.reuma.2018.06.001><https://doi.org/10.1016/j.arth.2018.03.044><https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1063458420300078?token=C039B8B13922A2079230DC9AF11A333E295FCD8>
 120. Martinez D, Rogers R, Hasser E, Hermann G, Kline D. Loss of excitatory amino acid transporter restraint following chronic intermittent hypoxia contributes to synaptic alterations in nucleus tractus solitarii. *J*

- Neurophysiol.* Published online 2020.
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1120700020921110>
<https://doi.org/10.1016/j.reuma.2018.06.001>
<https://doi.org/10.1016/j.arth.2018.03.044>
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1063458420300078?token=C039B8B13922A2079230DC9AF11A333E295FCD8>
121. Gourine A V., Kasymov V, Marina N, et al. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* (80-). 2010;329(5991):571-575. doi:10.1126/science.1190721
 122. Potapenko ES, Biancardi VC, Zhou Y, Stern JE. Altered astrocyte glutamate transporter regulation of hypothalamic neurosecretory neurons in heart failure rats. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 2012;303(3):R291-R300. doi:10.1152/ajpregu.00056.2012
 123. Marina N, Tang F, Figueiredo M, et al. Purinergic signalling in the rostral ventro-lateral medulla controls sympathetic drive and contributes to the progression of heart failure following myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol.* 2013;108(1):1-10. doi:10.1007/s00395-012-0317-x
 124. Costa KM, Moraes DJA, MacHado BH. Acute inhibition of glial cells in the NTS does not affect respiratory and sympathetic activities in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Brain Res.* 2013;1496:36-48. doi:10.1016/j.brainres.2012.12.003
 125. Isegawa K, Hirooka Y, Katsuki M, Kishi T, Sunagawa K. Angiotensin II type 1 receptor expression in astrocytes is upregulated leading to increased mortality in mice with myocardial infarction-induced heart failure. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2014;307(10):H1448-H1455. doi:10.1152/ajpheart.00462.2014
 126. Marina N, Teschemacher AG, Kasparov S, Gourine A V. Glia, sympathetic activity and cardiovascular disease. *Exp Physiol.* 2016;101(5):565-576. doi:10.1113/EP085713
 127. Pandit S, Jo JY, Lee SU, et al. Enhanced astroglial GABA uptake attenuates tonic GABAA inhibition of the presympathetic hypothalamic paraventricular nucleus neurons in heart failure. *J Neurophysiol.* 2015;114(2):914-926. doi:10.1152/jn.00080.2015
 128. Chaar LJ, Alves TP, Junior AMB, Michelini LC. Early training-induced

- reduction of Angiotensinogen in autonomic areas-the main effect of exercise on brain Renin-Angiotensin system in hypertensive rats. *PLoS One*. 2015;10(9):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0137395
129. Haspula D, Clark MA. Heterologous regulation of the cannabinoid type 1 receptor by angiotensin II in astrocytes of spontaneously hypertensive rats. *J Neurochem*. 2016;139(4):523-536. doi:10.1111/jnc.13776
 130. Chen J, Yin D, He X, et al. Modulation of activated astrocytes in the hypothalamus paraventricular nucleus to prevent ventricular arrhythmia complicating acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2020;308:33-41. doi:10.1016/j.ijcard.2020.01.035
 131. Diaz JR, Kim KJ, Brands MW, Filosa JA. Augmented astrocyte microdomain Ca²⁺ dynamics and parenchymal arteriole tone in angiotensin II-infused hypertensive mice. *Glia*. 2019;67(3):551-565. doi:10.1002/glia.23564
 132. Negussie S, Lymperopoulos A, Clark MA. Role of β arrestin1 in AT₁ R-mediated mitogen-activated protein kinase activation in Wistar and SHR brainstem astrocytes. *J Neurochem*. 2019;148(1):46-62. doi:10.1111/jnc.14620
 133. Queiroz TM, Guimarães DD, Mendes-Junior LG, Braga VA. A-Lipoic Acid Reduces Hypertension and Increases Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. *Molecules*. 2012;17(11):13357-13367. doi:10.3390/molecules171113357
 134. Michelini LC, Bonagamba LGH. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. *Hypertension*. 1988;11(2):I-75-I-79. doi:10.1161/01.hyp.11.2_pt_2.i75
 135. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Acad Press San Diego*. 1997;3rd.
 136. Oliva WM, Granjeiro ÉM, Bongamba LGH, Mendes RA, Machado BH. Dopamine microinjected into brainstem of awake rats affects baseline arterial pressure but not chemoreflex responses. *Auton Neurosci Basic Clin*. Published online 2010. doi:10.1016/j.autneu.2010.01.013
 137. Granjeiro ÉM, Gomes F V., Guimarães FS, Corrêa FMA, Resstel LBM.

- Effects of intracisternal administration of cannabidiol on the cardiovascular and behavioral responses to acute restraint stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011;99(4):743-748. doi:10.1016/j.pbb.2011.06.027
138. Liu X-Y, Cui D, Li D, et al. Oxytocin Removes Estrous Female vs. Male Preference of Virgin Male Rats: Mediation of the Supraoptic Nucleus Via Olfactory Bulbs. *Front Cell Neurosci.* 2017;11(October):1-11. doi:10.3389/fncel.2017.00327
 139. Fonnum F, Johnsen A, Hassel B. Use of Fluorocitrate and Fluoroacetate in the Study of Brain Metabolism. *Glia.* 1997;21:106-113. doi:10.1111/j.1471-4159.1987.tb05674.x
 140. Almeida-Pereira G, Coletti R, Mecawi AS, Reis LC, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J. Estradiol and angiotensin II crosstalk in hydromineral balance: Role of the ERK1/2 and JNK signaling pathways. *Neuroscience.* 2016;322:525-538. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.02.067
 141. Buttler L, Jordão MT, Fragas MG, Ruggeri A, Ceroni A, Michelini LC. Maintenance of blood-brain barrier integrity in hypertension: A novel benefit of exercise training for autonomic control. *Front Physiol.* 2017;8(DEC):1-14. doi:10.3389/fphys.2017.01048
 142. Talman WT. Kynurenic acid microinjected into the nucleus tractus solitarius of rat blocks the arterial baroreflex but not responses to glutamate. *Neurosci Lett.* 1989;102(2-3):247-252. doi:10.1016/0304-3940(89)90086-4
 143. Pawloski-Dahm C, Gordon FJ. Evidence for a kynurenate-insensitive glutamate receptor in nucleus tractus solitarii. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 1992;262(5 31-5):1611-1615. doi:10.1152/ajpheart.1992.262.5.h1611
 144. Machado BH, Bonagamba LGH. Microinjection of l-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res.* 1992;576(1):131-138. doi:10.1016/0006-8993(92)90618-J
 145. Colombari E, Bonagamba LGH, Machado BH. Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 1994;266(3

- 35-3). doi:10.1152/ajpregu.1994.266.3.r730
146. Albrecht M, Henke J, Tacke S, Markert M, Guth B. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. *BMC Vet Res*. 2014;10(1):1-14. doi:10.1186/s12917-014-0198-3
 147. Goldblatt BYH, Lynch J, Ramon F, Ph D, 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;59(3):347-79.
 148. Martins-Oliveira A, Castro MM, Oliveira DMM, et al. Contrasting effects of aliskiren versus losartana on hypertensive vascular remodeling. *Int J Cardiol*. 2013;167(4):1199-1205. doi:10.1016/j.ijcard.2012.03.137
 149. Neto-Neves EM, Pinheiro LC, Nogueira RC, Portella RL, Batista RI, Tanus-Santos JE. Sodium nitrite improves hypertension-induced myocardial dysfunction by mechanisms involving cardiac S-nitrosylation. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;134(June):40-50. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.06.012
 150. Pereira TMC, Balarini CM, Silva I V., Cabral AM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Endogenous angiotensin II modulates nNOS expression in renovascular hypertension. *Brazilian J Med Biol Res*. 2009;42(7):685-691. doi:10.1590/S0100-879X2009000700014
 151. Nekooeian AA, Rasti A. Effects of Captopril and Losartana on Cardiac Stereology in Rats with Renovascular Hypertension. Published online 2020;2-12. doi:10.30476/ijms.2020.81948.0.Abstract
 152. de Sousa Lima EB, de Oliveira LCS, da Silva Cardoso G, et al. Moderate-intensity exercise and renin angiotensin system blockade improve the renovascular hypertension (2K1C)-induced gastric dysmotility in rats. *Life Sci*. 2018;210:55-64. doi:10.1016/j.lfs.2018.08.053
 153. Li Z, Bains JS, Ferguson A V. Functional evidence that the angiotensin antagonist losartana crosses the blood-brain barrier in the rat. *Brain Res Bull*. 1993;30(1-2):33-39. doi:10.1016/0361-9230(93)90036-B
 154. De Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR. Upregulation of α_1 R and iNOS in the rostral

- ventrolateral medulla (RVLM) is essential for the sympathetic hyperactivity and hypertension in the 2K-1C wistar rat model. *Am J Hypertens*. 2010;23(7):708-715. doi:10.1038/ajh.2010.64
155. Li P, Zhang F, Sun HJ, Han Y. Angiotensin-(1-7) enhances the effects of angiotensin II on the cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activity in rostral ventrolateral medulla in renovascular hypertensive rats. *J Am Soc Hypertens*. 2015;9(11):865-877. doi:10.1016/j.jash.2015.08.005
 156. Melo MR, Gasparini S, Speretta GF, et al. Importance of the commissural nucleus of the solitary tract in renovascular hypertension. *Hypertens Res*. 2019;42(5):587-597. doi:10.1038/s41440-018-0190-6
 157. Nishi EE, Oliveira-Sales EB, Bergamaschi CT, Oliveira TGC, Boim MA, Campos RR. Chronic antioxidant treatment improves arterial renovascular hypertension and oxidative stress markers in the kidney in wistar rats. *Am J Hypertens*. 2010;23(5):473-480. doi:10.1038/ajh.2010.11
 158. Abdi A, Johns EJ. The effect of angiotensin II receptor antagonists on kidney function in two-kidney, two-clip Goldblatt hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 1997;331(2-3):185-192. doi:10.1016/S0014-2999(97)01038-8
 159. Welch J, Wilcox S, Cardozo J, Cardozo J, Ati JW, Ghz T. ATI and TxA # GHZ throughout receptors maintain hypertension Goldblatt hypertension in the rat. Published online 2019.
 160. Lacerda JEC, Campos RR, Araujo GC, Andreatta-Van Leyen S, Lopes OU, Guertzenstein PG. Cardiovascular responses to microinjections of GABA or anesthetics into the rostral ventrolateral medulla of conscious and anesthetized rats. *Brazilian J Med Biol Res*. 2003;36(9):1269-1277. doi:10.1590/S0100-879X2003000900019
 161. Jackson KL, Marques FZ, Lim K, Davern PJ, Head GA. Circadian differences in the contribution of the brain renin-angiotensin system in genetically hypertensive mice. *Front Physiol*. 2018;9(MAR). doi:10.3389/fphys.2018.00231
 162. Nobre F, da Silva CAA, Coelho EB, Salgado HC, Fazan R. Antihypertensive Agents Have Different Ability to Modulate Arterial Pressure and Heart Rate Variability in 2K1C Rats. *Am J Hypertens*. 2006;19(10):1079-1083. doi:10.1016/j.amjhyper.2006.02.011

163. Xie HH, Shen FM, Xu LP, Han P, Miao CY, Su DF. Reduction of blood pressure variability by combination therapy in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2007;25(11):2334-2344.
doi:10.1097/HJH.0b013e3282ef547f
164. Yamamoto K, Mifflin S. Inhibition of glial glutamate transporter GLT1 in the nucleus of the solitary tract attenuates baroreflex control of sympathetic nerve activity and heart rate. *Physiol Rep*. 2018;6(18):1-9.
doi:10.14814/phy2.13877
165. Chen CT, Hwang LL, Chang JK, Dun NJ. Pressor effects of orexins injected intracisternally and to rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2000;278(3 47-3):692-697. doi:10.1152/ajpregu.2000.278.3.r692
166. Matott MP, Kline DD, Hassler EM. Glial EAAT2 regulation of extracellular nTS glutamate critically controls neuronal activity and cardiorespiratory reflexes. *J Physiol*. 2017;595(17):6045-6063. doi:10.1113/JP274620
167. Salvatore MF, Davis RW, Arnold JC, Chotibut T. Transient striatal GLT-1 blockade increases EAAC1 expression, glutamate reuptake, and decreases tyrosine hydroxylase phosphorylation at ser 19. *Exp Neurol*. 2012;234(2):428-436. doi:10.1016/j.expneurol.2012.01.012
168. Chounlamountry K, Castets F, Tell F, Kessler JP. The excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1) in the rat nucleus of the solitary tract: subcellular localization suggests no major role in glutamate clearance. *Brain Struct Funct*. 2016;221(2):1113-1124. doi:10.1007/s00429-014-0958-7
169. Hu QX, Klatt GM, Gudmundsrud R, et al. Semi-quantitative distribution of excitatory amino acid (glutamate) transporters 1–3 (EAAT1-3) and the cystine-glutamate exchanger (xCT) in the adult murine spinal cord. *Neurochem Int*. 2020;140(April):104811.
doi:10.1016/j.neuint.2020.104811
170. Chan SHH, Hsu K Sen, Huang CC, Wang LL, Ou CC, Chan JYH. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. *Circ Res*. 2005;97(8):772-780.
doi:10.1161/01.RES.0000185804.79157.CO

171. Piani D, Frei K, Pfister HW, Fontana A. Glutamate uptake by astrocytes is inhibited by reactive oxygen intermediates but not by other macrophage-derived molecules including cytokines, leukotrienes or platelet-activating factor. *J Neuroimmunol.* 1993;48(1):99-104. doi:10.1016/0165-5728(93)90063-5
172. Volterra A, Trotti D, Tromba C, Floridi S, Racagni G. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci.* 1994;14(5 I):2924-2932. doi:10.1523/jneurosci.14-05-02924.1994
173. Sorg O, Horn TF, Yu N, Gruol DL, Bloom FE. Inhibition of astrocyte glutamate uptake by reactive oxygen species: role of antioxidant enzymes. *Mol Med.* 1997;3(7):431-440.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2230215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
174. Zhou X, Yang H, Song X, Wang J, Shen L, Wang J. Central blockade of the AT1 receptor attenuates pressor effects via reduction of glutamate release and downregulation of NMDA/AMPA receptors in the rostral ventrolateral medulla of rats with stress-induced hypertension. *Hypertens Res.* 2019;42(8):1142-1151. doi:10.1038/s41440-019-0242-6
175. Wu X, Kihara T, Hongo H, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H. Angiotensin receptor type 1 antagonists protect against neuronal injury induced by oxygen-glucose depletion. *Br J Pharmacol.* 2010;161(1):33-50. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00840.x
176. Zou J, Wang YX, Dou FF, et al. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochem Int.* 2010;56(4):577-584. doi:10.1016/j.neuint.2009.12.021
177. Trabelsi Y, Amri M, Becq H, Molinari F, Aniksztejn L. The conversion of glutamate by glutamine synthase in neocortical astrocytes from juvenile rat is important to limit glutamate spillover and peri/extrasynaptic activation of NMDA receptors. *Glia.* 2017;65(2):401-415. doi:10.1002/glia.23099
178. Zhu X, Ye G, Wang Z, Luo J, Hao X. Sub-anesthetic doses of ketamine exert antidepressant-like effects and upregulate the expression of glutamate transporters in the hippocampus of rats. *Neurosci Lett.*

- 2017;639:132-137. doi:10.1016/j.neulet.2016.12.070
179. Rose CF, Verkhratsky A, Parpura V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(6):1518-1524. doi:10.1042/BST20130237
 180. Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1995;38(1):73-84. doi:10.1002/ana.410380114
 181. Bos IWM, Hoogland G, Meine Jansen CF, et al. Increased glutamine synthetase but normal EAAT2 expression in platelets of ALS patients. *Neurochem Int.* 2006;48(4):306-311. doi:10.1016/j.neuint.2005.09.009
 182. Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S, Weindl A. Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease—an in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56:440–454.
 183. Robelet S, Melon C, Guillet B, Salin P, Kerkerian-Le Goff L. Chronic L-DOPA treatment increases extracellular glutamate levels and GLT1 expression in the basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 2004;20(5):1255-1266. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03591.x
 184. Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E. Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(8):901-911.
 185. Voss CM, Arildsen L, Nissen JD, et al. Glutamate Dehydrogenase Is Important for Ammonia Fixation and Amino Acid Homeostasis in Brain During Hyperammonemia. *Front Neurosci.* 2021;15(June):1-13. doi:10.3389/fnins.2021.646291
 186. Schmitt A, Kugler P. Cellular and regional expression of glutamate dehydrogenase in the rat nervous system: Non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience.* 1999;92(1):293-308. doi:10.1016/S0306-4522(98)00740-4
 187. Rothe F, Brosz M, STORM-MATHISEN J. QUANTITATIVE ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE IN THE RAT CEREBELLAR CORTEX. 1994.

- 62:1133–1146.
188. Pardo B, Contreras L, Satrústegui J. De novo Synthesis of Glial Glutamate and Glutamine in Young Mice Requires Aspartate Provided by the Neuronal Mitochondrial Aspartate-Glutamate Carrier Aralar/AGC1. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4(October 2013). doi:10.3389/fendo.2013.00149
 189. Pardo B, Rodrigues TB, Contreras L, et al. Brain glutamine synthesis requires neuronal-born aspartate as amino donor for glial glutamate formation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(1):90-101. doi:10.1038/jcbfm.2010.146
 190. Dadsetan S, Kukolj E, Bak LK, et al. Brain alanine formation as an ammonia-scavenging pathway during hyperammonemia: Effects of glutamine synthetase inhibition in rats and astrocyte-neuron co-cultures. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(8):1235-1241. doi:10.1038/jcbfm.2013.73
 191. McKenna MC, Stridh MH, McNair LF, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. Glutamate oxidation in astrocytes: Roles of glutamate dehydrogenase and aminotransferases. *J Neurosci Res*. 2016;94(12):1561-1571. doi:10.1002/jnr.23908
 192. Zaganas I, Waagepetersen HS, Georgopoulos P, Sonnewald U, Plaitakis A, Schousboe A. Differential expression of glutamate dehydrogenase in cultured neurons and astrocytes from mouse cerebellum and cerebral cortex. *J Neurosci Res*. 2001;66(5):909-913. doi:10.1002/jnr.10058
 193. Dadsetan S, Bak LK, Sørensen M, et al. Inhibition of glutamine synthesis induces glutamate dehydrogenase-dependent ammonia fixation into alanine in co-cultures of astrocytes and neurons. *Neurochem Int*. 2011;59(4):482-488. doi:10.1016/j.neuint.2011.03.008
 194. Bauer DE, Jackson JG, Genda EN, Montoya MM, Yudkoff M, Robinson MB. The glutamate transporter, GLAST, participates in a macromolecular complex that supports glutamate metabolism. *Neurochem Int*. 2012;61(4):566-574. doi:10.1016/j.neuint.2012.01.013
 195. Acosta GB, Fernández MA, Roselló DM, Tomaro ML, Balestrasse K, Lemberg A. Glutamine synthetase activity and glutamate uptake in

- hippocampus and frontal cortex in portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol*. 2009;15(23):2893-2899. doi:10.3748/wjg.15.2893
196. Eizayaga F, Scorticati C, Prestifilippo JP, et al. Altered blood-brain barrier permeability in rats with prehepatic portal hypertension turns to normal when portal pressure is lowered. *World J Gastroenterol*. 2006;12(9):1367-1372. doi:10.3748/wjg.v12.i9.1367
 197. Shim KY, Eom YW, Kim MY, Kang SH, Baik SK. Role of the renin-angiotensin system in hepatic fibrosis and portal hypertension. *Korean J Intern Med*. 2018;33(3):453-461. doi:10.3904/kjim.2017.317
 198. Drews HJ, Klein R, Lourhmati A, et al. Losartana improves memory, neurogenesis and cell motility in transgenic alzheimer's mice. *Pharmaceuticals*. 2021;14(2):1-17. doi:10.3390/ph14020166
 199. Oliveira JC de, Antonietto CRK, Scalabrini AC, et al. Antioxidant Protective Effects of the Resveratrol on the Cardiac and Vascular Tissues from Renal Hypertensive Rats. *Open J Med Chem*. 2012;02(03):61-71. doi:10.4236/ojmc.2012.23008
 200. dos Santos AQ, Nardin P, Funchal C, et al. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Arch Biochem Biophys*. 2006;453(2):161-167. doi:10.1016/j.abb.2006.06.025
 201. Kleinkauf-Rocha J, Bobermin LD, Machado P de M, Gonçalves CA, Gottfried C, Quincozes-Santos A. Lipoic acid increases glutamate uptake, glutamine synthetase activity and glutathione content in C6 astrocyte cell line. *Int J Dev Neurosci*. 2013;31(3):165-170. doi:10.1016/j.ijdevneu.2012.12.006
 202. Shibata K, Sugawara T, Fujishita K, et al. The astrocyte-targeted therapy by Bushi for the neuropathic pain in mice. *PLoS One*. 2011;6(8). doi:10.1371/journal.pone.0023510
 203. Sobrinho CR, Gonçalves CM, Takakura AC, Mulkey DK, Moreira TS. Fluorocitrate-mediated depolarization of astrocytes in the retrotrapezoid nucleus stimulates breathing. *J Neurophysiol*. 2017;118(3):1690-1697. doi:10.1152/jn.00032.2017
 204. Accorsi-Mendonça D, Zoccal DB, Bonagamba LGH, Machado BH. Glial

- cells modulate the synaptic transmission of NTS neurons sending projections to ventral medulla of Wistar rats. *Physiol Rep*. Published online 2013. doi:10.1002/phy2.80
205. Sobrinho C, CM G, AC T, DK M, TS M. Fluorocitrate-mediated depolarization of astrocytes in the retrotrapezoid nucleus stimulates breathing. *J Neurophysiol*. 2017;118:1690-1697.
 206. Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, et al. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. 2008;21(1):98-104. doi:10.1038/ajh.2007.12
 207. Bergamaschi C, Campos RR, Schor N, Lopes OU. Role of the rostral ventrolateral medulla in maintenance of blood pressure in rats with Goldblatt hypertension. *Hypertension*. 1995;26(6 II):1117-1120. doi:10.1161/01.hyp.26.6.1117
 208. Biancardi VC, Campos RR, Stern JE. Altered balance of γ -aminobutyric acidergic and glutamatergic afferent inputs in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of renovascular hypertensive rats. *J Comp Neurol*. 2009;518(5):567-585. doi:10.1002/cne.22256
 209. Zha YP, Wang YK, Deng Y, et al. Exercise training lowers the enhanced tonically active glutamatergic input to the rostral ventrolateral medulla in hypertensive rats. *CNS Neurosci Ther*. 2013;19(4):244-251. doi:10.1111/cns.12065
 210. Isegawa K, Hirooka Y, Katsuki M, Kishi T, Sunagawa K. Angiotensin II type 1 receptor expression in astrocytes is upregulated leading to increased mortality in mice with myocardial infarction-induced heart failure. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. Published online 2014. doi:10.1152/ajpheart.00462.2014
 211. Perim RR, Bonagamba LGH, Machado BH. Cardiovascular and respiratory outcome of preconditioned rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol*. 2015;100(9):1008-1017. doi:10.1113/EP085237
 212. Oyarce MP, Iturriaga R. Contribution of oxidative stress and inflammation to the neurogenic hypertension induced by intermittent hypoxia. *Front*

- Physiol.* 2018;9(JUL):1-7. doi:10.3389/fphys.2018.00893
213. Olea E, Docio I, Quintero M, et al. Peripheral dopamine 2-receptor antagonist reverses hypertension in a chronic intermittent hypoxia rat model. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):1-13. doi:10.3390/ijms21144893
 214. Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, et al. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron.* 2003;37(2):275-286. doi:10.1016/S0896-6273(02)01170-4
 215. Hughes EG, Maguire JL, McMinn MT, Scholz RE, Sutherland ML. Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking. *Mol Brain Res.* 2004;124(2):114-123. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.02.021
 216. Ito S, Komatsu K, Tsukamoto K, Kanmatsuse K, Sved AF. Ventrolateral medulla AT1 receptors support blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension.* 2002;40(4):552-559. doi:10.1161/01.HYP.0000033812.99089.92
 217. Wang L, Li CC, Wang GW, Cai JX. The effects of centrally administered fluorocitrate via inhibiting glial cells on working memory in rats. *Sci China, Ser C Life Sci.* 2009;52(8):701-709. doi:10.1007/s11427-009-0101-9
 218. Matsuura T, Kumagai H, Kawai A, et al. Rostral ventrolateral medulla neurons of neonatal Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2002;40(4):560-565. doi:10.1161/01.HYP.0000032043.64223.87
 219. Meeker KD, Meabon JS, Cook DG. Partial Loss of the Glutamate Transporter GLT-1 Alters Brain Akt and Insulin Signaling in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 2015;45(2):509-520. doi:10.3233/JAD-142304
 220. Peterson AR, Binder DK. Regulation of Synaptosomal GLT-1 and GLAST during Epileptogenesis. *Neuroscience.* 2019;411:185-201. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.05.048
 221. Berger U V., Hediger MA. Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol.* 2000;421(3):385-399.

- doi:10.1002/(SICI)1096-9861(20000605)421:3<385::AID-CNE7>3.0.CO;2-S
222. Gamrani H, Elgot A, El Hiba O, Fèvre-Montange M. Cellular plasticity in the supraoptic and paraventricular nuclei after prolonged dehydration in the desert rodent *Meriones shawi*: Vasopressin and GFAP immunohistochemical study. *Brain Res.* 2011;1375:85-92. doi:10.1016/j.brainres.2010.10.049
 223. Lavalie M, Aumann G, Anlauf E, Pröls F, Arpin M, Derouiche A. Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(31):12915-12919. doi:10.1073/pnas.1100957108
 224. Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathol.* 1994;4(3):229-237. doi:10.1111/j.1750-3639.1994.tb00838.x
 225. Kurtcuoglu V, Soellinger M, Summers P, Poulikakos D, Boesiger P. Mixing and modes of mass transfer in the third cerebral ventricle: A computational analysis. *J Biomech Eng.* 2007;129(5):695-702. doi:10.1115/1.2768376
 226. Proescholdt MG, Hutto B, Brady LS, Herkenham M. Studies of cerebrospinal fluid flow and penetration into brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of the tracer [¹⁴C]inulin in rat. *Neuroscience.* 1999;95(2):577-592. doi:10.1016/S0306-4522(99)00417-0
 227. Westerhout J, Ploeger B, Smeets J, Danhof M, De Lange ECM. Physiologically based pharmacokinetic modeling to investigate regional brain distribution kinetics in rats. *AAPS J.* 2012;14(3):543-553. doi:10.1208/s12248-012-9366-1
 228. Davson H. The Cerebro-Spinal Fluid. *Handb Neurochem.* 1969;2:23-48. doi:10.1136/bmj.2.3679.76-c
 229. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med.* 2012;4(147). doi:10.1126/scitranslmed.3003748
 230. Szentistvanyi I, Patlak CS, Ellis RA, Cserr HF. Drainage of interstitial fluid from different regions of rat brain. *Am J Physiol Physiol.*

- 1984;246(6):835–844. doi:doi:10.1152/ajprenal.1984.246.6.f835
231. Blasberg RG, Patlak C, Fenstermacher JD. Intrathecal chemotherapy: brain tissue profiles after ventriculocisternal perfusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1975;195(1):73-83.
 232. Pardridge WM. Drug transport in brain via the cerebrospinal fluid. *Fluids Barriers CNS.* 2011;8(1):7. doi:10.1186/2045-8118-8-7
 233. Mak M, Fung L, Strasser JF, Saltzman WM. Distribution of drugs following controlled delivery to the brain interstitium. *J Neurooncol.* 1995;26(2):91-102. doi:10.1007/BF01060215
 234. Abbott SBG, Pilowsky PM. Galanin microinjection into rostral ventrolateral medulla of the rat is hypotensive and attenuates sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(4):1019-1027. doi:10.1152/ajpregu.90885.2008
 235. Massieu L, Morales-Villagrán A, Tapia R. Accumulation of Extracellular Glutamate by Inhibition of Its Uptake Is Not Sufficient for Inducing Neuronal Damage: An In Vivo Microdialysis Study. *J Neurochem.* 1995;64(5):2262-2272. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64052262.x
 236. Massieu L, Tapia R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J Neurochem.* 1997;69(3):1151-1160. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.69031151.x
 237. Arias C, Arrieta I, Massieu L, Tapia R. Neuronal damage and MAP2 changes induced by the glutamate transport inhibitor dihydrokainate and by kainate in rat hippocampus in vivo. *Exp Brain Res.* 1997;116(3):467-476. doi:10.1007/PL00005774
 238. Nishimura RN, Santos D, Fu ST, Dwyer BE. Induction of cell death by L-alpha-aminoadipic acid exposure in cultured rat astrocytes: relationship to protein synthesis. *Neurotoxicology.* 2000;21(3):313-320.
 239. Garthwaite J, Regan CM. Toxic effects of α -aminoadipate on cultured cerebellar cells. *Brain Res.* 1980;194(2):603-607. doi:10.1016/0006-8993(80)91250-0
 240. Xu HL, Koenig HM, Ye S, Feinstein DL, Pelligrino DA. Influence of the glia limitans on pial arteriolar relaxation in the rat. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2004;287(1 56-1):331-339. doi:10.1152/ajpheart.00831.2003

241. O'Neill E, Chiara Goisis R, Haverty R, Harkin A. L-alpha-aminoadipic acid restricts dopaminergic neurodegeneration and motor deficits in an inflammatory model of Parkinson's disease in male rats. *J Neurosci Res.* 2019;97(7):804-816. doi:10.1002/jnr.24420
242. Olney JW, Ho OL, Rhee V. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res.* 1971;14(1):61-76. doi:10.1007/BF00234911
243. Xu HL, Mao L, Ye S, Paisansathan C, Vetri F, Pelligrino DA. Astrocytes are a key conduit for upstream signaling of vasodilation during cerebral cortical neuronal activation in vivo. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2008;294(2):622-632. doi:10.1152/ajpheart.00530.2007
244. Liu X, Zheng H. Leptin-Mediated Sympathoexcitation in Obese Rats: Role for Neuron–Astrocyte Crosstalk in the Arcuate Nucleus. *Front Neurosci.* 2019;13(November):1-12. doi:10.3389/fnins.2019.01217
245. Perego C, Vanoni C, Bossi M, et al. The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. *J Neurochem.* 2000;75(3):1076-1084. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0751076.x
246. Susarla BTS, Robinson MB. Internalization and degradation of the glutamate transporter GLT-1 in response to phorbol ester. *Neurochem Int.* 2008;52(4-5):709-722. doi:10.1016/j.neuint.2007.08.020
247. Susarla BTS, Seal RP, Zeleniaia O, et al. Differential regulation of GLAST immunoreactivity and activity by protein kinase C: Evidence for modification of amino and carboxyl termini. *J Neurochem.* 2004;91(5):1151-1163. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02791.x
248. Vermeiren C, Najimi M, Maloteaux JM, Hermans E. Molecular and functional characterisation of glutamate transporters in rat cortical astrocytes exposed to a defined combination of growth factors during in vitro differentiation. *Neurochem Int.* 2005;46(2):137-147. doi:10.1016/j.neuint.2004.08.004
249. Poulsen CF, Schousboe I, Sarup A, White HS, Schousboe A. Effect of topiramate and dBcAMP on expression of the glutamate transporters

- GLAST and GLT-1 in astrocytes cultured separately, or together with neurons. *Neurochem Int.* 2006;48(6-7):657-661.
doi:10.1016/j.neuint.2006.01.006
250. Lipski J, Wan CK, Bai JZ, Pi R, Li D, Donnelly D. Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience.* 2007;146(2):617-629. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.02.003
 251. Beller JA, Gurkoff GG, Berman RF, Lyeth BG. Pharmacological enhancement of glutamate transport reduces excitotoxicity in vitro. *Restor Neurol Neurosci.* 2011;29(5):331-346. doi:10.3233/RNN-2011-603
 252. Qian Y, Guan T, Tang X, et al. Astrocytic glutamate transporter-dependent neuroprotection against glutamate toxicity: An in vitro study of maslinic acid. *Eur J Pharmacol.* 2011;651(1-3):59-65.
doi:10.1016/j.ejphar.2010.10.095
 253. Benediktsson AM, Marrs GS, Tu JC, et al. Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia.* 2012;60(2):175-188. doi:10.1002/glia.21249
 254. Ahlemeyer B, Kehr K, Richter E, Hirz M, Baumgart-Vogt E, Herden C. Phenotype, differentiation, and function differ in rat and mouse neocortical astrocytes cultured under the same conditions. *J Neurosci Methods.* 2013;212(1):156-164. doi:10.1016/j.jneumeth.2012.09.016
 255. Cruz JC, LOPES MM, Elias L, Antunes-Rodrigues J. Angiotensin II change glutamate uptake and GFAP expression in astrocyte culture from hypothalamus. *Faseb J.* 2013;27:694.
 256. Piao C, Ranaivo HR, Rusie A, Wadhwani N, Koh S, Wainwright MS. Thrombin decreases expression of the glutamate transporter GLAST and inhibits glutamate uptake in primary cortical astrocytes via the Rho kinase pathway. *Exp Neurol.* 2015;273:288-300.
doi:10.1016/j.expneurol.2015.09.009
 257. Ruginsk S, Vechiato F, Elias L, Antunes-Rodrigues J, Cruz JC. Angiotensin II Reduces mRNA Expression for Glutamate Transporters and Glutamine Synthetase in Cultured Hypothalamic Astrocytes. *Faseb Journal* RUGINSK, S al Angiotensin II Reduces mRNA Expr Glutamate Transp Glutamine Synth Cult Hypothal Astrocytes *Faseb Journal*, v 29, n

- Suppl 96819, 2015. 2015;29(Supplement 968.19).*
258. Al Awabdh S, Gupta-Agarwal S, Sheehan DF, et al. Neuronal activity mediated regulation of glutamate transporter GLT-1 surface diffusion in rat astrocytes in dissociated and slice cultures. *Glia*. 2016;64(7):1252-1264. doi:10.1002/glia.22997
 259. Armbruster M, Hanson E, Dulla CG. Glutamate clearance is locally modulated by presynaptic neuronal activity in the cerebral cortex. *J Neurosci*. 2016;36(40):10404-10415. doi:10.1523/JNEUROSCI.2066-16.2016
 260. Shu Q, Zhang J, Ma W, Lei Y, Zhou D. Orexin-A promotes Glu uptake by OX1R/PKC α /ERK1/2/GLT-1 pathway in astrocytes and protects co-cultured astrocytes and neurons against apoptosis in anoxia/hypoglycemic injury in vitro. *Mol Cell Biochem*. 2017;425(1-2):103-112. doi:10.1007/s11010-016-2866-z
 261. Kurita M, Matsuoka Y, Nakatsuka K, et al. Norepinephrine-induced downregulation of GLT-1 mRNA in rat astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;504(1):103-108. doi:10.1016/j.bbrc.2018.08.137
 262. Yao L, Grand T, Hanson J, Paoletti P, Zhou Q. Higher ambient synaptic glutamate at inhibitory versus excitatory neurons differentially impacts NMDA receptor activity. *Nat Commun*. 2018;9(1):1-13. doi:10.1038/s41467-018-06512-7
 263. Stanimirovic DB, Ball R, Small DL, Muruganandam A. Developmental regulation of glutamate transporters and glutamine synthetase activity in astrocyte cultures differentiated in vitro. *Int J Dev Neurosci*. 1999;17(3):173-184. doi:10.1016/S0736-5748(99)00028-3
 264. Gegelashvili G, Danbolt NC, Schousboe A. Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *J Neurochem*. 1997;69(6):2612-2615. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.69062612.x
 265. Smith K. Settling the great glia debate. *Nature*. 2010;468(7321):160-162.
 266. Thrane AS, Thrane VR, Zeppenfeld D, et al. General anesthesia selectively disrupts astrocyte calcium signaling in the awake mouse cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(46):18974-18979.

- doi:10.1073/pnas.1209448109
267. Oliveira-Sales EB, Colombari D, Davisson RL, et al. Kidney-induced hypertension depends on superoxide signaling in the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension*. 2010;56(2):290-296.
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150425
 268. Bergamaschi C, Campos J, Schor N, Lopes OU. Importance of rostral ventrolateral medulla in rats with Goldblatt hypertension. *Fundam Clin Pharmacol*. 1997;11(SUPPL. 1):92-93. doi:10.1111/j.1472-8206.1997.tb00885.x
 269. Leimbach WN, Wallin BG, Victor RG, Aylward PE, Sundlöf G, Mark AL. Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patients with heart failure. *Circulation*. 1986;73(5):913-919. doi:10.1161/01.CIR.73.5.913
 270. Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Johns JA, Korner PI. Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: Evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation*. 1986;73(4):615-621.
doi:10.1161/01.CIR.73.4.615
 271. Kaye AH, Laws ER. Historical Perspective. *Brain Tumors*. Published online 2012:1-5. doi:10.1016/B978-0-443-06967-3.00001-6
 272. Almeida OP, Garrido GJ, Beer C, Lautenschlager NT, Arnolda L, Flicker L. Cognitive and brain changes associated with ischaemic heart disease and heart failure. *Eur Heart J*. 2012;33(14):1769-1776.
doi:10.1093/eurheartj/ehr467
 273. Woo MA, Ogren JA, Abouzeid CM, et al. Regional hippocampal damage in heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2015;17(5):494-500.
doi:10.1002/ehf.241
 274. Suzuki H, Matsumoto Y, Ota H, et al. Hippocampal blood flow abnormality associated with depressive symptoms and cognitive impairment in patients with chronic heart failure. *Circ J*. 2016;80(8):1773-1780.
doi:10.1253/circj.CJ-16-0367
 275. Woo MA, Macey PM, Fonarow GC, Hamilton MA, Harper RM. Regional brain gray matter loss in heart failure. *J Appl Physiol*. 2003;95(2):677-684.

- doi:10.1152/japplphysiol.00101.2003
276. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 5th Edition.*; 2004. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 277. Wang WZ, Gao L, Wang HJ, Zucker IH, Wang W. Tonic glutamatergic input in the rostral ventrolateral medulla is increased in rats with chronic heart failure. *Hypertension*. 2009;53(2):370-374.
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.122598
 278. Xu B, Li H. Brain mechanisms of sympathetic activation in heart failure: Roles of the renin-angiotensin system, nitric oxide and pro-inflammatory cytokines (Review). *Mol Med Rep*. Published online 2015.
doi:10.3892/mmr.2015.4434
 279. Uwechue NM, Marx MC, Chevy Q, Billups B. Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. *J Physiol*. Published online 2012. doi:10.1113/jphysiol.2011.226605
 280. Lehmann C, Bette S, Engele J. High extracellular glutamate modulates expression of glutamate transporters and glutamine synthetase in cultured astrocytes. *Brain Res*. 2009;1297:1-8.
doi:10.1016/j.brainres.2009.08.070

Apêndice A |

Certificações do CEUA/UFPB



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "PARTICIPAÇÃO DA ASTROGLIA HIPOTALÂMICA (SFO E PVN) E BULBAR (RVLM) NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E MECANISMOS GLUTAMATÉRGICOS ENVOLVIDOS COM AS RESPOSTAS CARDIO-RESPIRATÓRIAS EM RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR", protocolada sob o CEUA nº 8025180618 (ID 000301), sob a responsabilidade de **Josiane de Campos Cruz e equipe; Atalia Ferreira de Lima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 17/07/2018.

We certify that the proposal "PARTICIPATION OF HYPOTHALAMIC (SFO AND PVN) AND BULBAR ASTROGLIA (RVLM) IN THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) AND GLUTAMATERGIC MECHANISMS INVOLVED WITH CARDIO-RESPIRATORY RESPONSES IN RENOVASCULAR HYPERTENSION RATS", utilizing 112 Heterogenics rats (112 males), protocol number CEUA 8025180618 (ID 000301), under the responsibility of **Josiane de Campos Cruz and team; Atalia Ferreira de Lima** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 07/17/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **07/2018** a **12/2020** Área: **Biotecnologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade: **8 a 10 semanas**

N: **112**

Linagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **200 a 250 g**

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados nas dependências do laboratório LACONCHA.

João Pessoa, 23 de abril de 2020

Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
GABINETE DA VICE-REITORIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS CELULAS GLIAIS NA MODULAÇÃO DAS RESPOSTAS CARDIO-RESPIRATÓRIAS ENA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) AO LONGO DA VIA SFO-PVN-RVLM EM RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR" protocolo nº 139/2017 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Josiane de Campos Cruz – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 16/11/2017.

Vigência do Projeto	2017 - 2021
Espécie/linhagem	Ratos Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)
Número de animais	64 animais
Idade/peso	1 mês / 180 - 200 g
Sexo	Machos
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarm - UFPB

Prof. Dra. Islania Gisélia Albuquerque Gonçalves
 Coordenadora da CEUA-UFPB

Apêndice B|

**Valores expressos da solução de
salina NaCl 0,15 M**

Tabela A 1 | Valores expressos da pressão arterial média (PAM, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de solução salina (NaCl 0,15M) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
PAM (mmHg)			
-1 s	122 ± 4	171 ± 15#	120 ± 7↓
0 s	122 ± 4	171 ± 15#	120 ± 6↓
1 s	120 ± 4	174 ± 15#	120 ± 6↓
2 s	121 ± 4	175 ± 15#	121 ± 6↓
3 s	122 ± 4	173 ± 15#	121 ± 6↓
4 s	120 ± 4	170 ± 15#	121 ± 6↓
5 s	121 ± 4	172 ± 15#	120 ± 7↓
6 s	121 ± 4	175 ± 15#	121 ± 7↓
7 s	121 ± 4	174 ± 16#	121 ± 6↓
8 s	122 ± 3	176 ± 15#	121 ± 6↓
9 s	123 ± 4	175 ± 16#	121 ± 7↓
10 s	121 ± 4	171 ± 15#	119 ± 6↓
Δ PAM (mmHg)			
0 s	0	0	0
1 s	-2 ± 1	3 ± 2#	0 ± 2
2 s	-1 ± 1	5 ± 2#*	0 ± 2
3 s	0 ± 0	2 ± 1	1 ± 1
4 s	-2 ± 1	0 ± 2	1 ± 1
5 s	-1 ± 1	1 ± 1	0 ± 2
6 s	-1 ± 1	4 ± 2#*	1 ± 1
7 s	-2 ± 1	3 ± 3#*	1 ± 1
8 s	0 ± 1	5 ± 2#*	1 ± 2
9 s	0 ± 1	4 ± 2#*	1 ± 1
10 s	-1 ± 1	1 ± 1	-2 ± 1

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de salina. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. ↓p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

Tabela A 2 | Valores expressos da frequência cardíaca (FC, bpm) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de solução salina (NaCl 0,15M) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
FC (bpm)			
-1 s	318 ± 9	335 ± 17	346 ± 21
0 s	318 ± 9	335 ± 17	346 ± 21
1 s	328 ± 7	332 ± 16	348 ± 22
2 s	319 ± 9	331 ± 14	346 ± 21
3 s	325 ± 7	328 ± 17	348 ± 22
4 s	320 ± 8	333 ± 15	347 ± 23
5 s	322 ± 6	333 ± 15	346 ± 22
6 s	327 ± 8	329 ± 16	346 ± 23
7 s	327 ± 9	329 ± 16	352 ± 23
8 s	326 ± 8	328 ± 15	345 ± 23
9 s	325 ± 7	329 ± 16	343 ± 24
10 s	323 ± 7	333 ± 15	345 ± 24
Δ FC (bpm)			
0 s	0	0	0
1 s	10 ± 6	-3 ± 4	2 ± 1
2 s	14 ± 8	-5 ± 5	0 ± 2
3 s	7 ± 8	-7 ± 3	3 ± 2
4 s	2 ± 7	-2 ± 4	1 ± 3
5 s	3 ± 7	-2 ± 4	0 ± 2
6 s	9 ± 7	-7 ± 4	0 ± 4
7 s	9 ± 7	-6 ± 3	7 ± 5
8 s	7 ± 8	-7 ± 4	-1 ± 4
9 s	7 ± 8	-6 ± 4	-3 ± 6
10 s	4 ± 7	-3 ± 5	-1 ± 6

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de salina. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. †p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

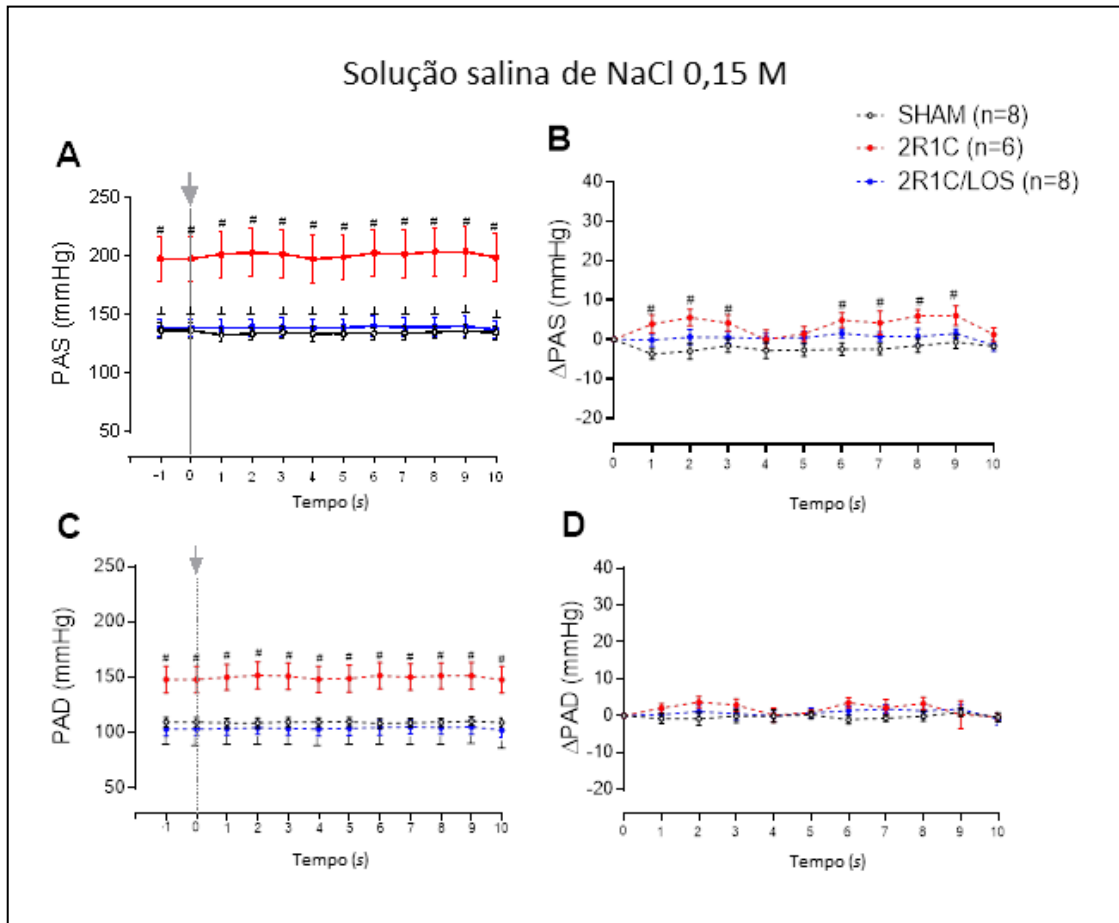


Figura A 1| Alterações na pressão arterial sistólica [PAS, mmHg (*Painéis A e B*)] e diastólica [PAD, mmHg (*Painéis C e D*)] após a microinjeção ICM de solução de salina (NaCl 0,15 M) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. Dados analisados pelo ANOVA *Two-Way*; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM; † $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C.

Tabela A 3| Valores expressos da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de salina (0,15M) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
PAS (mmHg)			
-1 s	136 ± 6	197 ± 19 [#]	138 ± 7 [↓]
0 s	136 ± 6	197 ± 19 [#]	138 ± 7 [↓]
1 s	132 ± 5	201 ± 19 [#]	138 ± 6 [↓]
2 s	133 ± 5	202 ± 20 [#]	138 ± 7 [↓]
3 s	134 ± 5	201 ± 20 [#]	138 ± 7 [↓]
4 s	133 ± 6	197 ± 20 [#]	138 ± 7 [↓]
5 s	133 ± 5	198 ± 19 [#]	138 ± 7 [↓]
6 s	133 ± 5	202 ± 19 [#]	139 ± 8 [↓]
7 s	133 ± 5	201 ± 20 [#]	139 ± 7 [↓]
8 s	134 ± 4	203 ± 20 [#]	139 ± 7 [↓]
9 s	135 ± 5	203 ± 21 [#]	139 ± 8 [↓]
10 s	134 ± 6	198 ± 20 [#]	136 ± 7 [↓]
Δ PAS (mmHg)			
0 s	0	0	0
1 s	-4 ± 1	4 ± 2 [#]	0 ± 2
2 s	-3 ± 2	6 ± 2 [#]	1 ± 2
3 s	-2 ± 2	4 ± 2 [#]	1 ± 2
4 s	-3 ± 2	0 ± 2	0 ± 1
5 s	-3 ± 2	1 ± 2	0 ± 2
6 s	-2 ± 2	5 ± 2 [#]	2 ± 1
7 s	-2 ± 1	4 ± 3 [#]	1 ± 1
8 s	-2 ± 2	6 ± 2 [#]	1 ± 2
9 s	-1 ± 2	6 ± 2 [#]	2 ± 1
10 s	-2 ± 1	1 ± 2	-2 ± 1

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de salina. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; [#]p<0,05 vs. grupo Sham. [↓]p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

Tabela A 4 | Valores expressos da pressão arterial diastólica (PAD, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de salina (0,15 M) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
PAD (mmHg)			
-1 s	109 ± 4	148 ± 12#	103 ± 6↓
0 s	109 ± 4	148 ± 12#	103 ± 6↓
1 s	108 ± 4	150 ± 12#	103 ± 6↓
2 s	108 ± 4	152 ± 12#	104 ± 6↓
3 s	109 ± 4	151 ± 12#	103 ± 6↓
4 s	109 ± 4	148 ± 12#	103 ± 6↓
5 s	109 ± 4	148 ± 12#	104 ± 7↓
6 s	108 ± 4	151 ± 12#	104 ± 7↓
7 s	108 ± 4	150 ± 12#	105 ± 6↓
8 s	109 ± 4	151 ± 12#	104 ± 6↓
9 s	110 ± 4	151 ± 12#	105 ± 7↓
10 s	109 ± 4	147 ± 12#	102 ± 7↓
Δ PAD (mmHg)			
0 s	0	0	0
1 s	-1 ± 1	2 ± 1	0 ± 1
2 s	-2 ± 2	4 ± 2	1 ± 2
3 s	0 ± 2	3 ± 2	1 ± 2
4 s	0 ± 2	0 ± 2	0 ± 2
5 s	0 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
6 s	-1 ± 1	4 ± 1	1 ± 1
7 s	-1 ± 1	2 ± 2	2 ± 1
8 s	0 ± 1	3 ± 2	1 ± 2
9 s	1 ± 1	0 ± 4	2 ± 1
10 s	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 2

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de salina. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. ↓p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

Apêndice C|

Valores expressos do DHK 1mM

Tabela A 5 | Valores expressos da pressão arterial média (PAM, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
PAM (mmHg)			
-1 s	119 ± 3	172 ± 18#	124 ± 7⊥
0 s	119 ± 3	172 ± 18#	124 ± 6⊥
1 s	121 ± 3	172 ± 18#	128 ± 8⊥
2 s	124 ± 4	174 ± 16#	131 ± 9⊥
3 s	124 ± 5	174 ± 15#	134 ± 10⊥
4 s	127 ± 5	177 ± 15#	133 ± 10⊥
5 s	127 ± 6	178 ± 17#	135 ± 10⊥
6 s	125 ± 6	185 ± 18#	136 ± 11⊥
7 s	124 ± 6	184 ± 18#	134 ± 10⊥
8 s	124 ± 5	182 ± 18#	134 ± 9⊥
9 s	124 ± 6	181 ± 15#	135 ± 9⊥
10 s	124 ± 5	184 ± 16#	136 ± 9⊥
Δ PAM (mmHg)			
0 s	0	0	0
1 s	2 ± 1	0 ± 3	4 ± 3
2 s	5 ± 2	2 ± 4	8 ± 5
3 s	4 ± 3	2 ± 5	11 ± 7
4 s	7 ± 4	5 ± 6	11 ± 7
5 s	8 ± 5	6 ± 8	13 ± 8
6 s	5 ± 4	13 ± 10	12 ± 8
7 s	4 ± 5	12 ± 10	12 ± 7
8 s	4 ± 4	10 ± 10	11 ± 7
9 s	5 ± 5	9 ± 9	12 ± 7
10 s	5 ± 4	12 ± 10	12 ± 7

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de DHK. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. ⊥p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

Tabela A 6 | Valores expressos da frequência cardíaca (FC, bpm) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
FC (bpm)			
-1 s	335 ± 11	337 ± 9	355 ± 16
0 s	335 ± 11	337 ± 9	355 ± 16
1 s	317 ± 23	326 ± 14	347 ± 16
2 s	352 ± 15	336 ± 15	346 ± 16
3 s	332 ± 11	334 ± 16	346 ± 16
4 s	338 ± 7	332 ± 18	354 ± 15
5 s	340 ± 6	331 ± 19	353 ± 16
6 s	323 ± 20	325 ± 23	341 ± 18
7 s	332 ± 13	325 ± 24	347 ± 19
8 s	317 ± 25	324 ± 22	343 ± 19
9 s	321 ± 23	314 ± 24	343 ± 19
10 s	329 ± 16	317 ± 32	344 ± 19
Δ FC (bpm)			
0 s	0	0	0
1 s	-5 ± 6	5 ± 4	-2 ± 3
2 s	-7 ± 7	3 ± 4	-6 ± 3
3 s	-1 ± 7	3 ± 4	-1 ± 4
4 s	-1 ± 5	2 ± 4	2 ± 8
5 s	-5 ± 5	2 ± 5	0 ± 4
6 s	-2 ± 6	1 ± 4	-2 ± 6
7 s	-1 ± 5	2 ± 5	5 ± 7
8 s	-2 ± 7	-1 ± 4	2 ± 6
9 s	-1 ± 5	-10 ± 8	1 ± 8
10 s	0 ± 5	2 ± 7	-1 ± 6

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de DHK. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. †p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

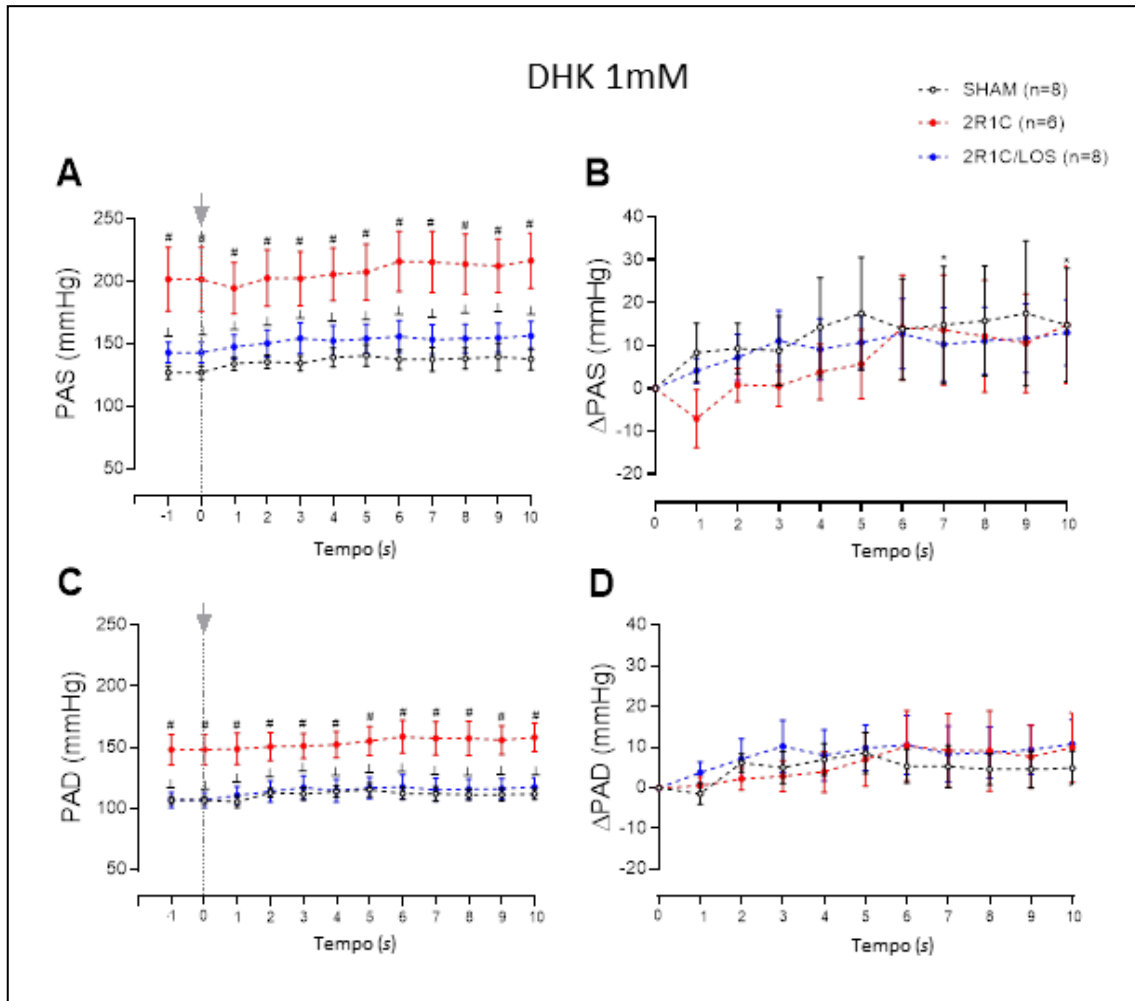


Figura A 2] Alterações na pressão arterial sistólica [PAS, mmHg (*Painéis A e B*)] e diastólica [PAD, mmHg (*Painéis C e D*)] após a microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. Dados analisados pelo ANOVA *Two-Way*; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA ± EPM. * $p < 0,05$ vs. Tempo 0; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM; † $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C.

Tabela A 7 | Valores expressos da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
PAS (mmHg)			
-1 s	127 ± 5	201 ± 25#	143 ± 8↓
0 s	127 ± 5	201 ± 25#	143 ± 8↓
1 s	134 ± 5	194 ± 20#	147 ± 9↓
2 s	135 ± 5	202 ± 22#	150 ± 10↓
3 s	134 ± 6	202 ± 21#	154 ± 12↓
4 s	139 ± 8	205 ± 21#	152 ± 12↓
5 s	140 ± 9	207 ± 22#	154 ± 11↓
6 s	137 ± 8	216 ± 24#	156 ± 12↓
7 s	137 ± 9	215 ± 24#	154 ± 12↓
8 s	138 ± 8	214 ± 24#	154 ± 12↓
9 s	139 ± 11	212 ± 21#	155 ± 12↓
10 s	137 ± 8	216 ± 22#	156 ± 11↓
Δ PAS (mmHg)			
0 s	0	0	0
1 s	8 ± 7	-10 ± 7	4 ± 3
2 s	9 ± 6	-2 ± 3	7 ± 5
3 s	8 ± 8	-3 ± 4	11 ± 7
4 s	14 ± 11	-1 ± 5	9 ± 7
5 s	17 ± 13	-2 ± 3	11 ± 7
6 s	13 ± 11	2 ± 2	10 ± 6
7 s	14 ± 13	1 ± 3	13 ± 8
8 s	15 ± 12	-1 ± 4	10 ± 9
9 s	17 ± 16	0 ± 5	11 ± 7
10 s	14 ± 13	2 ± 4	13 ± 7

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de DHK. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. ↓p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

Tabela A 8 | Valores expressos da pressão arterial diastólica (PAD, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de DHK (1mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
PAD (mmHg)			
-1 s	106 ± 3	148 ± 12#	107 ± 6 _L
0 s	106 ± 3	148 ± 12#	107 ± 6 _L
1 s	105 ± 4	148 ± 12#	110 ± 7 _L
2 s	113 ± 3	150 ± 11#	114 ± 8 _L
3 s	111 ± 5	151 ± 10#	117 ± 9 _L
4 s	113 ± 4	152 ± 10#	114 ± 9 _L
5 s	115 ± 5	155 ± 11#	117 ± 8 _L
6 s	112 ± 5	158 ± 13#	117 ± 10 _L
7 s	112 ± 5	157 ± 13#	115 ± 9 _L
8 s	111 ± 4	157 ± 13#	116 ± 8 _L
9 s	111 ± 5	155 ± 11#	116 ± 8 _L
10 s	111 ± 4	158 ± 11#	117 ± 8 _L
Δ PAD (mmHg)			
0 s	0	0	0
1 s	-2 ± 3	1 ± 2	4 ± 3
2 s	6 ± 2	2 ± 3	7 ± 5
3 s	5 ± 3	3 ± 4	10 ± 6
4 s	7 ± 3	4 ± 5	8 ± 6
5 s	8 ± 5	7 ± 7	10 ± 6
6 s	5 ± 4	10 ± 8	10 ± 7
7 s	5 ± 5	9 ± 9	8 ± 7
8 s	4 ± 3	9 ± 9	9 ± 6
9 s	4 ± 4	8 ± 7	9 ± 6
10 s	5 ± 4	10 ± 8	11 ± 6

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de DHK. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. _Lp<0,05 vs. Grupo 2R1C.

Apêndice D|

Valores expressos do L-AAA 2mM

Tabela A 9 | Valores expressos da pressão arterial média (PAM, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de L-AAA (2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
PAM (mmHg)			
-1 s	115 ± 5	165 ± 16#	119 ± 6↓
0 s	115 ± 5	165 ± 16#	119 ± 6↓
1 s	115 ± 6	164 ± 16#	121 ± 6↓
2 s	114 ± 6	166 ± 15#	124 ± 6↓
3 s	117 ± 5	164 ± 14#	123 ± 6↓
4 s	119 ± 4	164 ± 14#	119 ± 7↓
5 s	120 ± 3	161 ± 14#	124 ± 6↓
6 s	120 ± 3	165 ± 16#	121 ± 6↓
7 s	121 ± 3	172 ± 22#	123 ± 6↓
8 s	121 ± 4	173 ± 22#	123 ± 6↓
9 s	122 ± 4	171 ± 23#	125 ± 5↓
10 s	122 ± 4	175 ± 24#	125 ± 5↓
Δ PAM (mmHg)			
0 s	0	0	0
1 s	1 ± 2	-1 ± 2	2 ± 2
2 s	0 ± 2	2 ± 3	5 ± 6
3 s	2 ± 3	0 ± 4	4 ± 1
4 s	5 ± 4	0 ± 3	-1 ± 3
5 s	6 ± 5	-4 ± 4	4 ± 1
6 s	6 ± 5	0 ± 3	2 ± 2
7 s	7 ± 5	7 ± 7	4 ± 1
8 s	7 ± 3	9 ± 7	4 ± 2
9 s	7 ± 6	6 ± 8	6 ± 2
10 s	7 ± 6	10 ± 8	6 ± 3

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de L-AAA. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo

Tabela A 10 | Valores expressos da pressão arterial média (PAM, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de L-AAA (2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
FC (bpm)			
-1 s	309 ± 19	332 ± 6	369 ± 21#
0 s	309 ± 19	332 ± 6	369 ± 21#
1 s	308 ± 20	330 ± 6	367 ± 21#
2 s	304 ± 20	329 ± 8	362 ± 21#
3 s	305 ± 17	328 ± 9	366 ± 21#
4 s	312 ± 12	331 ± 6	366 ± 21
5 s	308 ± 16	330 ± 6	368 ± 21#
6 s	306 ± 14	325 ± 9	367 ± 21#
7 s	318 ± 9	337 ± 6	365 ± 21
8 s	311 ± 12	339 ± 5	369 ± 21#
9 s	322 ± 8	337 ± 5	372 ± 20
10 s	321 ± 9	338 ± 4	369 ± 20
Δ FC (bpm)			
0 s	0	0	0
1 s	-1 ± 7	5 ± 4	-2 ± 3
2 s	-4 ± 9	3 ± 4	-6 ± 3
3 s	-3 ± 12	3 ± 4	-2 ± 6
4 s	3 ± 11	2 ± 4	2 ± 9
5 s	-1 ± 9	2 ± 5	-1 ± 5
6 s	-3 ± 9	1 ± 4	-2 ± 7
7 s	8 ± 12	2 ± 4	7 ± 8
8 s	2 ± 9	-1 ± 4	3 ± 7
9 s	-5 ± 5	-10 ± 8	2 ± 9
10 s	-6 ± 6	2 ± 7	0 ± 7

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de L-AAA. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. †p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

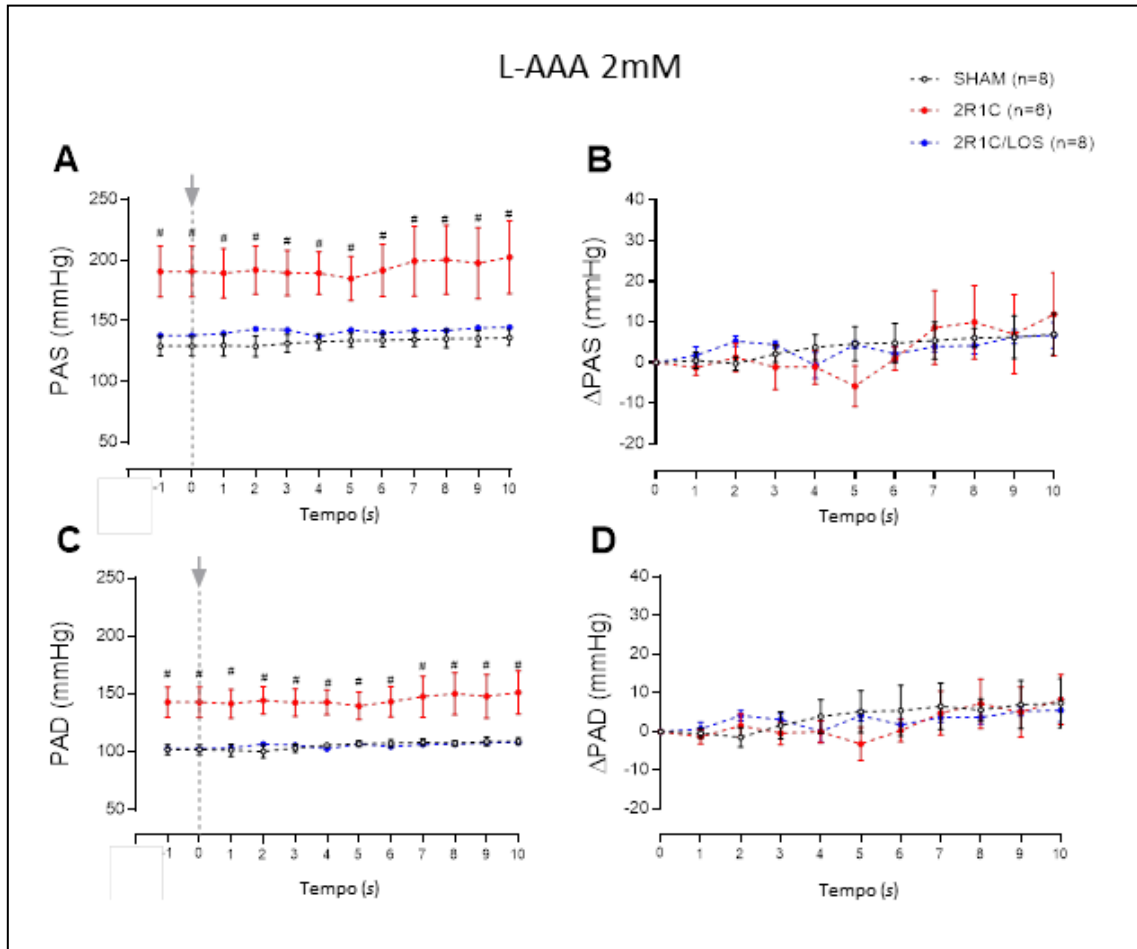


Figura A 3| Alterações na pressão arterial sistólica [PAS, mmHg (*Painéis A e B*)] e diastólica [PAD, mmHg (*Painéis C e D*)] após a microinjeção ICM de L-AAA (2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. Dados analisados pelo ANOVA *Two-Way*; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA ± EPM. * $p < 0,05$ vs. *Tempo 0*; [#] $p < 0,05$ vs. grupo SHAM; [†] $p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C.

Tabela A 11 | Valores expressos da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de L-AAA (2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
PAS (mmHg)			
-1 s	129 ± 8	190 ± 20#	137 ± 7 _↓
0 s	129 ± 8	190 ± 20#	137 ± 7 _↓
1 s	129 ± 9	189 ± 20#	139 ± 7 _↓
2 s	128 ± 8	191 ± 20#	143 ± 7 _↓
3 s	131 ± 7	189 ± 18#	142 ± 6 _↓
4 s	132 ± 6	189 ± 18#	137 ± 8 _↓
5 s	133 ± 6	184 ± 18#	142 ± 7 _↓
6 s	133 ± 5	191 ± 21#	140 ± 7 _↓
7 s	134 ± 6	199 ± 28#	141 ± 7 _↓
8 s	135 ± 7	200 ± 28#	142 ± 7 _↓
9 s	135 ± 6	197 ± 29#	144 ± 7 _↓
10 s	136 ± 6	202 ± 29#	144 ± 7 _↓
Δ PAS (mmHg)			
0 s	0	0	0
1 s	0 ± 2	-1 ± 2	2 ± 2
2 s	0 ± 2	1 ± 3	5 ± 1
3 s	2 ± 2	1 ± 5	4 ± 1
4 s	4 ± 3	-1 ± 4	-1 ± 3
5 s	5 ± 4	-6 ± 5	4 ± 1
6 s	5 ± 4	1 ± 3	2 ± 2
7 s	5 ± 4	9 ± 9	4 ± 1
8 s	6 ± 2	10 ± 9	4 ± 2
9 s	6 ± 5	7 ± 9	6 ± 2
10 s	7 ± 5	12 ± 10	7 ± 3

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de L-AAA. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. _↓p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

Tabela A 12 | Valores expressos da pressão arterial diastólica (PAD, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de L-AAA (2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
PAD (mmHg)			
-1 s	101 ± 4	142 ± 12#	102 ± 5↓
0 s	101 ± 4	142 ± 12#	102 ± 5↓
1 s	101 ± 5	141 ± 12#	103 ± 5↓
2 s	100 ± 5	144 ± 11#	106 ± 6↓
3 s	103 ± 4	142 ± 12#	105 ± 6↓
4 s	105 ± 2	142 ± 11#	102 ± 7↓
5 s	107 ± 3	139 ± 12#	106 ± 6↓
6 s	107 ± 3	143 ± 13#	104 ± 6↓
7 s	108 ± 3	147 ± 17#	106 ± 5↓
8 s	107 ± 3	150 ± 18#	106 ± 5↓
9 s	108 ± 4	147 ± 18#	107 ± 5↓
10 s	109 ± 3	151 ± 18#	108 ± 5↓
Δ PAD (mmHg)			
0 s	0	0	0
1 s	0 ± 1	-1 ± 2	1 ± 2
2 s	-1 ± 2	2 ± 2	4 ± 1
3 s	2 ± 3	0 ± 2	3 ± 1
4 s	4 ± 4	0 ± 3	0 ± 3
5 s	5 ± 5	-3 ± 4	4 ± 1
6 s	6 ± 6	0 ± 3	2 ± 2
7 s	7 ± 6	5 ± 6	4 ± 1
8 s	6 ± 3	7 ± 6	4 ± 2
9 s	7 ± 6	5 ± 6	5 ± 1
10 s	7 ± 6	9 ± 6	6 ± 3

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de L-AAA. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. ↓p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

Apêndice E|

Valores expressos do FCt 0,2mM

Tabela A 13 | Valores expressos da pressão arterial média (PAM, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de FCt (0,2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
PAM (mmHg)			
-1 s	120 ± 3	163 ± 15#	122 ± 6⊥
0 s	120 ± 3	163 ± 15#	122 ± 6⊥
1 s	120 ± 4	161 ± 13#	124 ± 6⊥
2 s	122 ± 3	167 ± 15#	124 ± 6⊥
3 s	114 ± 3	164 ± 15#	132 ± 9⊥
4 s	114 ± 4	165 ± 18#	136 ± 12⊥
5 s	116 ± 4	177 ± 24#	133 ± 12⊥
6 s	112 ± 7	179 ± 28#	135 ± 12⊥
7 s	113 ± 6	172 ± 20#	132 ± 11⊥
8 s	111 ± 6	177 ± 25#	133 ± 11⊥
9 s	114 ± 7	173 ± 20#	136 ± 11⊥
10 s	116 ± 7	179 ± 24#	136 ± 10⊥
Δ PAM (mmHg)			
0 s	0	0	0
1 s	0 ± 1	-2 ± 2	2 ± 2
2 s	2 ± 1	4 ± 2	2 ± 3
3 s	-5 ± 2	1 ± 2	10 ± 6
4 s	-5 ± 4	3 ± 5	15 ± 9
5 s	-3 ± 3	14 ± 10	11 ± 9
6 s	-4 ± 7	16 ± 14*	13 ± 8
7 s	-6 ± 6	9 ± 7	11 ± 7
8 s	7 ± 6	14 ± 11	11 ± 7
9 s	-5 ± 6	10 ± 5	14 ± 7
10 s	-3 ± 6	16 ± 10	14 ± 7

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de FCt. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. ⊥p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

Tabela A 14 | Valores expressos da frequência cardíaca (FC, bpm) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de FcT (0,2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
FC (bpm)			
-1 s	328 ± 7	330 ± 6	358 ± 20
0 s	328 ± 7	330 ± 6	358 ± 20
1 s	319 ± 12	319 ± 11	351 ± 19
2 s	330 ± 14	328 ± 10	345 ± 39
3 s	304 ± 18	326 ± 10	394 ± 41
4 s	319 ± 23	338 ± 6	346 ± 19
5 s	324 ± 18	337 ± 6	347 ± 19
6 s	301 ± 34	346 ± 9	364 ± 19
7 s	312 ± 21	335 ± 5	393 ± 47
8 s	298 ± 27	366 ± 28	351 ± 26
9 s	302 ± 27	345 ± 10	347 ± 22
10 s	318 ± 11	354 ± 21	348 ± 17
Δ FC (bpm)			
0 s	0	0	0
1 s	-5 ± 6	-3 ± 2	1 ± 3
2 s	-1 ± 8	6 ± 5	7 ± 31
3 s	-3 ± 5	4 ± 4	9 ± 19
4 s	10 ± 9	10 ± 5	1 ± 7
5 s	6 ± 10	6 ± 4	4 ± 10
6 s	4 ± 10	7 ± 6	9 ± 6
7 s	2 ± 8	7 ± 5	10 ± 6
8 s	-4 ± 10	7 ± 3	15 ± 6
9 s	2 ± 5	5 ± 4	7 ± 8
10 s	-5 ± 6	2 ± 2	-1 ± 9

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de FcT. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. †p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

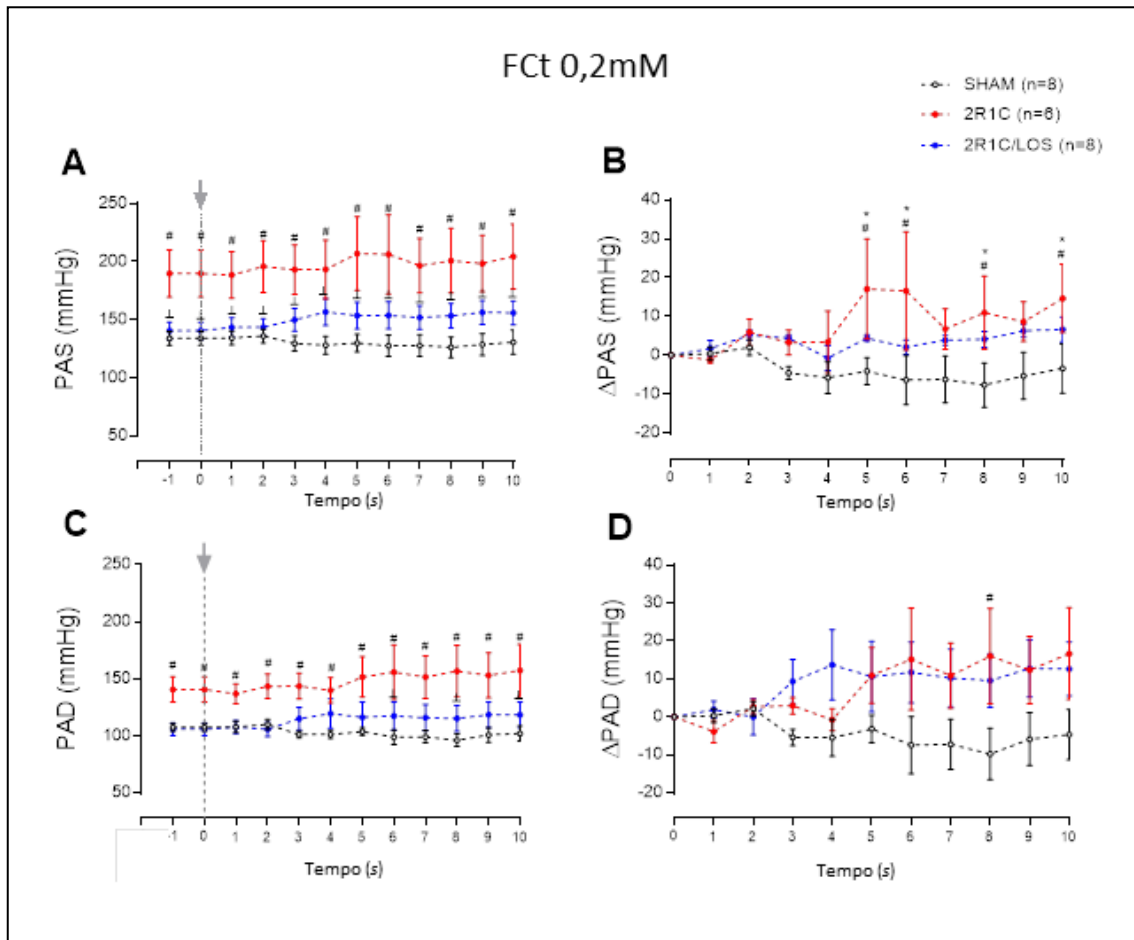


Figura A 4| Alterações na pressão arterial sistólica [PAS, mmHg (*Painéis A e B*)] e diastólica [PAD, mmHg (*Painéis C e D*)] após a microinjeção ICM de Fct (0,2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS. Dados analisados pelo ANOVA *Two-Way*; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIA $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. *Tempo 0*; # $p < 0,05$ vs. grupo SHAM; $^{\dagger}p < 0,05$ vs. Grupo 2R1C.

Tabela A 15 | Valores expressos da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de FcT (0,2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
PAS (mmHg)			
-1 s	133 ± 6	189 ± 20#	140 ± 8↓
0 s	133 ± 6	189 ± 20#	140 ± 8↓
1 s	134 ± 6	188 ± 20#	143 ± 8↓
2 s	135 ± 6	195 ± 22#	143 ± 7↓
3 s	129 ± 6	193 ± 21#	149 ± 9↓
4 s	128 ± 7	193 ± 25#	156 ± 11↓
5 s	129 ± 7	206 ± 31#	153 ± 11↓
6 s	127 ± 9	206 ± 34#	153 ± 12↓
7 s	127 ± 9	196 ± 23#	151 ± 10↓
8 s	126 ± 9	200 ± 27#	153 ± 11↓
9 s	128 ± 9	198 ± 24#	156 ± 10↓
10 s	130 ± 10	204 ± 27#	155 ± 10↓
Δ PAS (mmHg)			
0 s	0	0	0
1 s	1 ± 2	-1 ± 1	2 ± 2
2 s	2 ± 2	6 ± 3	5 ± 1
3 s	-5 ± 2	3 ± 3	4 ± 1
4 s	-6 ± 4	3 ± 8	-1 ± 3
5 s	-4 ± 3	17 ± 12#*	4 ± 1
6 s	-6 ± 6	17 ± 15#*	2 ± 2
7 s	-6 ± 6	7 ± 5	4 ± 1
8 s	-8 ± 6	11 ± 9#*	4 ± 2
9 s	-5 ± 6	9 ± 5	6 ± 2
10 s	-3 ± 6	15 ± 9#*	7 ± 3

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de FcT. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. ↓p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

Tabela A 16 | Valores expressos da pressão arterial diastólica (PAD, mmHg) em diferentes tempos após a microinjeção ICM de FcT (0,2mM) nos grupos SHAM, 2R1C ou 2R1C/LOS.

	Grupos		
	SHAM (n=8)	2R1C (n=6)	2R1C/LOS (n=8)
PAD (mmHg)			
-1 s	107 ± 3	140 ± 11#	105 ± 5⊥
0 s	107 ± 3	140 ± 11#	105 ± 5⊥
1 s	107 ± 5	136 ± 9#	107 ± 5⊥
2 s	110 ± 4	143 ± 10#	105 ± 6⊥
3 s	101 ± 3	143 ± 11#	115 ± 9⊥
4 s	101 ± 3	139 ± 11#	119 ± 12⊥
5 s	103 ± 3	151 ± 17#	116 ± 13⊥
6 s	98 ± 6	155. ± 23#	117 ± 12⊥
7 s	99 ± 5	151 ± 19#	116 ± 11⊥
8 s	96 ± 5	156 ± 23#	115 ± 11⊥
9 s	100 ± 6	153 ± 19#	118 ± 11⊥
10 s	102 ± 6	157 ± 22#	118 ± 11⊥
Δ PAD (mmHg)			
0 s	0	0	0
1 s	0 ± 2	-4 ± 3	2 ± 2
2 s	2 ± 2	3 ± 2	0 ± 5
3 s	-5 ± 2	3 ± 2	9 ± 5
4 s	-5 ± 5	-1 ± 3	13 ± 9
5 s	-3 ± 4	11 ± 7	11 ± 9
6 s	-7 ± 8	15 ± 13	12 ± 8
7 s	-7 ± 6	11 ± 9	10 ± 8
8 s	-10 ± 7	16 ± 12*	10 ± 7
9 s	-6 ± 7	12 ± 9	13 ± 8
10 s	-5 ± 6	17 ± 12	13 ± 7

Valores absolutos correspondem aos tempos de antes (-1 e 0 segundos) e após (1 à 10 segundos) à microinjeção de FcT. Valores da variação (Δ) correspondem aos tempos de 0 à 10 segundos. Dados analisados pelo ANOVA Two-Way; comparados pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações e expressos como MÉDIAS ± EPM. *p<0,05 vs. Tempo 0; #p<0,05 vs. grupo Sham. ⊥p<0,05 vs. Grupo 2R1C.

Apêndice F

Resumos de trabalhos paralelos

TRATAMENTO COM MINOCICLINA REDUZ A PRESSÃO ARTERIAL E MELHORA A SENSIBILIDADE DO BARORREFLEXO EM ANIMAIS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR (HRV)

Flôr AFL, Rayane BRSS, Braga VA, Cruz JC.

A HRv é caracterizada pelo aumento significativo da Ang-II, da atividade pró-inflamatória central e periférica. A Ang-II promove redução da recaptação de glutamato pelos astrócitos, ativação da atividade microglial e aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Entretanto, não se sabe se a atividade pró-inflamatória da micróglia é recrutada pela Ang-II plasmática para gerar esses efeitos. Nosso objetivo foi avaliar a participação da micróglia sobre a recaptação de glutamato astrocítico induzida pela Ang II na HRv. Utilizamos ratos wistar machos (180-250g; Ceua nº 8025180618). Quatro semanas após as cirurgias 2R1C ou SHAM, os animais foram submetidos ao tratamento com MINOCICLINA [(50mg/kg/dia) inibidor da atividade pró-inflamatória da micróglia] via gavagem (por 7 dias). Ao 2º dia do tratamento, implantamos uma cânula-guia na região intracisterna magna (ICM) e, ao 6º dia de tratamento, a artéria e veia femoral foram canuladas para os registros cardiovasculares frente à microinjeção ICM de DHK (1 mM; inibidor do transportador de glutamato astrocítico) e L-AAA (0,2 mM; inibidor da glutamina sintetase astrocítica) para avaliar a atividade astrocítica e frente à injeção de fenilefrina (8 µg/kg iv), nitroprussiato de sódio (25ug/Kg, iv) e hexametônio (30 µg/kg iv). Análise estatística: One-way (ANOVA), Newman-Keuls, $P < 0,05$. Nossos resultados mostraram que o tratamento com minociclina promoveu redução da pressão arterial nos animais HRv ($130,5 \pm 8$ vs. $165,5 \pm 10$ mmHg, $p = 0,03$). No entanto, a microinjeção ICM de diferentes inibidores da atividade dos astrócitos não promoveu alterações significativas na PA ou na FC basal dos animais SHAM ou 2R1C. O tratamento com minociclina melhorou a sensibilidade do barorreflexo induzido, mas não reduziu a influência simpática nos animais hipertensos. Nossos resultados sugerem que há alteração da atividade da micróglia na HRv. Contudo ainda são necessários experimentos adicionais para melhor avaliarmos a participação dos astrócitos na modulação da PA em animais HRv.

Palavras-chave: atividade pró-inflamatória microglial, minociclina, HRv.

RECAPTAÇÃO DE GLUTAMATO ASTROCÍTICO NO BULBO ESTÁ ALTERADA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

Flôr AFL, Braga VA, Cruz JC.

Os Astrócitos mantêm a homeostase de glutamato no sistema nervoso central através da recaptação do glutamato residual extracelular. Sabese que na hipertensão há aumento da liberação de glutamato por neurônios em núcleos bulbares contribuindo para simpatoexcitação e hiperatividade neuronal. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel funcional da recaptação de glutamato astrocítico (RGAst) na região do bulbo em ratos hipertensos. Nosso objetivo foi avaliar, por meio de estudos *in vivo*, o papel da RGAst na região do bulbo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Ratos Wistar Kyoto e SHR [(300 – 340g) Ceua n.8025180618 foram anestesiados (ip) e submetidos ao implante de cânula-guia na região intracisterna magna (ICM) para a microinjeção de DHK [(1mM) inibidor do transportador de glutamato astrocítico] e Fluorocitrato [FCt (1nMol) gliotoxina]. A artéria femoral dos animais foi canulada (5-6 dias após a estereotaxia). No dia seguinte, sem efeito anestésico, os animais foram colocados em caixas pletismográficas e a cânula arterial conectada à um transdutor de pressão, possibilitando o registro das variáveis cardiovasculares. Análise estatística: Teste de normalidade seguido da análise paramétrica (One-Way ANOVA e Teste *t*) ou não-paramétrica, sendo $p < 0,05$. Os resultados mostraram que as microinjeções de DHK ($\Delta 24,9 \pm 7,2$ vs. $\Delta -0,3 \pm 1,3$ mmHg, $p < 0,01$) e FCt ($\Delta 18 \pm 2,5$ vs. $\Delta 1,4 \pm 0,5$ mmHg, $p < 0,02$) na CM promoveram resposta pressora nos animais SHR ($n=5$), mas não em animais Wistar kyoto ($n=5$). Além disso, também foi observada bradicardia induzida pelo DHK ($\Delta -61,5 \pm 19,4$ vs. $\Delta 1,2 \pm 9,8$ mmHg, $p < 0,03$) e pelo FCt ($\Delta -7,4 \pm 3,5$ vs. $\Delta 1,2 \pm 9,8$ mmHg, $p < 0,03$) em animais SHR quando comparado aos animais Wistar kyoto. Nossos resultados mostraram que a função de RGAst na região do bulbo parece estar alterada na hipertensão espontânea, sugerindo que esta função é mais recrutada no bulbo durante a hipertensão.

Palavras-chave: Recaptação glutamatérgica, astrócitos, hipertensão, bulbo.

TRANSPORTE DE LACTATO EM ASTRÓCITOS E NEURÔNIOS (ANLS) ESTÁ ENVOLVIDO NA INGESTÃO DE ÁGUA E SÓDIO INDUZIDA PELA ANGIOTENSINA II (ANG II) NO ÓRGÃO SUBFORNICIAL (SFO).

Flôr, AFL, Costa, FF, Braga, VA, Cruz, JC.

Estudos mostraram que os neurônios GABAérgicos do mecanismo ANLS estão envolvidos com o comportamento de aversão ao sódio induzido pela solução hipertônica de Na^+ . Recentemente, observamos que a inibição das células gliais atenua a ingestão de sódio induzida pela ANG II central. No entanto, o envolvimento do mecanismo ANLS na ingestão de água e sódio induzida pela ANG-II ainda precisa ser elucidado. O objetivo do trabalho foi analisar o envolvimento do mecanismo ANLS na ingestão de água e sódio induzida pela ANG II no SFO. Uma cânula-guia foi implantada no SFO de ratos wistar machos [(280-320g) Ceua / UFPB n.133 / 2015]. Antes dos experimentos, os ratos foram adaptados em gaiolas metabólicas contendo garrafas de água e sódio (NaCl 0,3 M) por 5 dias. Em seguida, realizamos microinjeções (100 nl) de solução salina estéril (0,9%), ANG II (20 ng), α -CHCA [(4,5 μg) inibidor do transportador de lactato - MCT ou Lactato (2 μg) em SFO, seguidas pela análise da ingestão de água e sódio durante 2h. Análise estatística: *One-way* (ANOVA), pós-teste de Newman-Keuls, $P < 0,05$. ANG II no SFO produziu aumento na ingestão de água ($10,3 \pm 2,8$ vs. $0,6 \pm 0,3$ mL / 2h, $p = 0,009$, $n = 08$) e sódio ($5,7 \pm 1,3$ vs. $0,1 \pm 0,1$ mL / 2h, $p = 0,002$). A microinjeção prévia de lactato atenua a ingestão de água ($3,1 \pm 0,8$ vs. $10,3 \pm 2,8$ mL / 2h, $p = 0,03$, $n = 08$) e sódio induzida pela ANG-II ($2,3 \pm 0,9$ vs. $5,7 \pm 1,3$ mL / 2h, $p = 0,04$, $n = 08$). Além disso, o α -CHCA potencializou a ingestão de água ($18,2 \pm 2,6$ vs. $10,3 \pm 2,8$ mL / 2h, $p = 0,04$, $n = 05$) e sódio induzida pela ANG II no SFO ($12,6 \pm 1,8$ vs. $5,7 \pm 1,3$ mL / 2h, $p = 0,01$, $n = 05$). Nossos resultados sugerem que o mecanismo ANLS está envolvido nas respostas de ingestão de água e sódio induzidas pela ANG-II no SFO.

Palavras-chave: Astrócitos, Lactato, aversão ao sódio, SFO.

EFEITOS CARDIOVASCULARES DO TRATAMENTO CRÔNICO COM EXTRATO DE CANABIDIOL (CBD) EM RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR.

Flôr, AFL, Maia, SD, Souza, MRP, Costa, FF, Santos, AC, Silva, BRS, Cruz. JC.

O Canabidiol (CBD) é um fitocanabinóide não-psicoativo utilizado no tratamento de doenças neurodegenerativas. Estudos clínicos e pre-clínicos com CBD agudo promovem redução da pressão arterial e do estresse oxidativo em ratos hipertensos. Porém, poucos estudos analisaram os efeitos do tratamento crônico do CBD nessa fisiopatologia. Nosso estudo avaliou o tratamento oral crônico do CBD, produzido pelo instituto ABRACE-ESPERANÇA, em ratos com hipertensão (no modelo 2 Rins - 1 Clipe). Utilizamos ratos wistar macho (180-200g; 8 semanas). Seis semanas após as cirurgias 2R1C ou SHAM, os animais foram submetidos ao tratamento com CBD (20mg/kg) via gavagem (2x ao dia por 14 dias), de acordo com os grupos: SHAM/veículo (n=6); SHAM/CBD (n=6); 2R1C/veículo (n=6); 2R1C/CBD (n=8). Os animais tiveram artérias e veias femorais cateterizadas, para o registro das respostas cardiovasculares após a fenilefrina (8 µg/kg iv), nitroprussiato de sódio (25ug/Kg, iv) ou hexametônio (30 µg/kg iv). Análise estatística: One-Way ANOVA, t-test, Newman Kewls, $p < 0.05$. Resultados mostraram que tratamento com CBD não alterou a pressão arterial média (PAM) no grupo SHAM/CBD (109.9 ± 4.9 vs. 124.1 ± 8 mmHg; $P < 0.05$), quando comparado ao grupo SHAM. Entretanto, o tratamento reduziu a PAM no grupo 2R1C/CBD ($138,7 \pm 9,6$ vs. $174,8 \pm 11,31$ mmHg; $P = 0,03$), quando comparado ao grupo 2R1C. O CBD melhorou a sensibilidade do baroreflexo induzido ($-1,8 \pm 0,06$ vs. $-2,1 \pm 0,1$ bpm.mmHg-1; $P = 0,01$) e reduziu a influência simpática ($\Delta 50,0 \pm 3,4$ vs. $-\Delta 61,0 \pm 7,5$; $P = 0,2$) nos animais hipertensos. Nossos resultados mostram que tratamento crônico com CBD (20mg/kg) reduziu PAM, melhorou a sensibilidade do baroreflexo e diminuiu influência simpática na hipertensão renovascular.

Palavras-chave: Canabidiol, tratamento crônico, Hipertensão Renovascular.

Anexo A|

Manuscrito não relacionado à tese

Astrocytic activity markers are altered in the cardiovascular brainstem and hypothalamic nuclei of chronic heart failure rats

Flôr, AFL¹; Almeida-Pereira, G³; Lataro, RM⁴; Brito Alves, JL¹; Braga, VA¹; Salgado, HC³; Elias, LLK³; Antunes-Rodrigues, J³; Cruz, JC^{1*}.

Department of ¹Biotechnology, ²Physiology and Pathology of Federal University of Paraiba, Paraiba, 58051-900, Brazil

Department of ³Physiology of University of São Paulo, Ribeirao Preto, 14049-900, Brazil.

Department of ⁴Physiological Sciences, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, Santa Catarina, 88040-900, Brazil.

Running title: Changes in astrocytic markers in CHF rats.

***Corresponding Author:**

Josiane de Campos Cruz, MD, PhD.

Department of Biotechnology of Federal University of Paraiba.

João Pessoa, PB, 58033-455, Brazil.

Phone: (55) 83 3216 7366 or 3216 7177

FAX: (55) 83 3216 75 11 or 83 3216 73 65

E-mail: josianecruz@cbiotec.ufpb.br

Keywords: heart failure, astrocytes, glutamate transporter, glutamine synthetase, GFAP.

Abstract

Background: Chronic Heart Failure (CHF) is characterized by neurohumoral and cardiovascular autonomic dysfunction induced by increase in sympathetic nerve activity (SNA), reduction in the cardiac vagal tone and increase in the plasma hormones. Neurohumoral and cardiovascular autonomic changes in CHF seem to be a result of brain imbalance between glutamatergic mechanisms modulating cardiovascular homeostasis. Recently, pioneer studies have suggested that increased neurohumoral and sympathetic drive in CHF are mediated by changes in glial fibrillary acidic protein (GFAP); glutamine synthetase (GS) and/or astrocytic glutamate transporters (GLT1 and GLAST), which are specific glial cells markers involved in the astrocyte - modulated glutamate synthase and recycling. However, the profile expression of these specific glial markers in the cardiovascular brainstem and hypothalamic nuclei in CHF remains to be better characterized.

Methods and Results: Here, we evaluate GFAP, GS, GLT1 and GLAST proteins expression in the nucleus of tractus solitarius (NTS) and rostral ventrolateral medulla (RVLM) in the brainstem and the subfornical nucleus (SFO) and the paraventricular nucleus (PVN) in the hypothalamus from SHAM and CHF rats. GLT1, GLAST and GS expression are decreased in the RVLM and in the SFO nuclei. Furthermore, GLT-1 and GS expression are decreased in the NTS, while GFAP expression is reduced in the NTS, RVLM and PVN, but increased in the SFO from CHF rats.

Conclusions: Taken together, our findings suggest that astrocytic mechanisms involved in the glutamate extracellular uptake and recycling appear to be impaired in the hypothalamus and brainstem cardiovascular nuclei in CHF rats.

Introduction

Clinical and experimental evidence suggests that sympathetic nerve overactivity is intimately linked to the development and progression of CHF^{269–271}. Experimentally, CHF animals present impaired in the autonomic cardiovascular brainstem and hypothalamic nuclei^{272–275}. There is evidence that sympathetic nerve overactivity in the CHF is modulated by an increase in the glutamatergic transmission along the subfornical nucleus – paraventricular nucleus – rostral ventrolateral medulla (SFO-PVN-RVLM) axis, which could be induced by exacerbated central Ang-II and reactive oxygen species (ROS) signaling (Braga et al., 2011).

Ang-II type I receptors (AT1R) are expressed in glial cells, the most abundant cells in the central nervous system (CNS)^{69,210}. Studies by Isegawa et al. (2014) observed that AT1Rs in astrocytes are upregulated in RVLM of the heart failure (HF) mice. The same study documented a reduction in the left ventricular size, heart weight, urinary norepinephrine and survival rate in astrocyte AT1R knockout HF mice, suggesting that astrocytic cells may play a role in enhancing central sympathetic outflow in HF mice.

Glial cells are the major contributors to the function and adaptation of the neural circuitry. Accumulated studies suggest that glutamate signaling is actively regulated by astroglia cells, expressing a high density of glutamate transporters (GLT-1 and GLAST), which are responsible for extracellular glutamate clearance. In the astrocytic cytoplasm, glutamate is converted to glutamine through glutamine synthetase (GS) action, an important glial-specific enzyme. Additionally, studies have suggested that Ang-II-induced a decrease in the astrocytic glutamate transporter activity, contributing to increasing extracellular glutamate environment and consequently increasing PVN

pre-sympathetic neuron activity^{69,102}. Nevertheless, data from our group and collaborators showed that neuroglial signaling in the PVN is involved in the Ang-II-mediated sympathoexcitation, which seems to be modulated by a dysfunction in the astrocytic glutamate transporters elicited by Ang II, contributing to increasing glutamate in the extracellular space^{69,102}. Furthermore, studies by Potapenko et al. (2012) observed in the supraoptic nucleus (SON) from CHF rats that GLT1 expression is decreased while GLAST is increased. The authors suggested that this discrepancy could be important to compensate for the deficiency in glutamate transport, suggesting that GLT1 dysfunction into SON contributes to augmented neurohumoral drive in the CHF.

Another astrocytic mechanism to modulate neuron activity is through astrocytic process retraction, which is modulated by glial fibrillary acid protein (GFAP), a cytoskeleton polymer. Neurons surfaces are almost entirely covered by these astrocytic processes, where GFAP depolymerization induces astrocytic process retraction and consequently increasing synaptic contact and extracellular neurotransmitter traffic (Wang and Hatton 2009). Furthermore, GFAP is also essential to GLT1, GLAST and GS traffic through astrocytic cytosol¹¹⁶. Studies by Sullivian et al. (2007) suggested that GFAP polymerization is also essential to anchoring GLAST in the astrocytic membrane.

Despite the evidence supporting astrocyte dysfunctions are involved in the cardiovascular implications of the CHF development, the expression of important astrocytic activity markers to glutamate recycle and reuptake from extracellular space in the brainstem and hypothalamic cardiovascular nuclei remains to be evaluated. Thus, here we analyzed the GFAP, GS, GLT1 and GLAST protein expression in brainstem

and hypothalamus nuclei involved with the cardiovascular and sympathetic modulation in CHF rat.

Methods

Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 200-250g were obtained from the School of Medicine of Ribeirão Preto of University of Sao Paulo. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Biotechnology Center of the Federal University of Paraíba (n° 133/2015) in accordance with the National Institutes of Health (NIH).

Experimental CHF

CHF was induced by coronary artery *ligation*, which promotes myocardial infarction, as previously described by Potapenko et al., (2012). After anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (50 and 10 mg/kg, i.p.), rats were endotracheally intubated and mechanically ventilated (Harvard Rodent Ventilator, Harvard Apparatus, Holliston, MA). A left thoracotomy was performed, the heart was exteriorized and the left anterior descending coronary artery was ligated between the pulmonary artery outflow tract and the left atrium with polyester suture. SHAM animals underwent the same procedure, but the coronary artery was not occluded. After surgery, rats received Penicillin and streptomycin [(0.1 ml/100 g, i.m.) 1,200,000 IU, Fort Dodge, Campinas,

SP, Brazil] and analgesic Tramadol chloride [(0.1 mg/100 g, s.c.) John Martin S.R.L. Ciudad Autónoma de Buenos Aires].

Tail-Cuff Recording

Six weeks after coronary ligation (or SHAM surgery), cardiovascular hemodynamic values were measured in conscious and resting animals, using noninvasive tail-cuff plethysmography method (Kent Scientific, CODA - Torrington, CT, USA) and the blood pressure measurements were conducted following the manufacturer's protocol.

Transthoracic echocardiography

After six weeks of surgical induction of CHF and immediately after the *tail-cuff recording*, transthoracic echocardiography was performed in rats under ketamine and xylazine (50 and 10 mg/kg, i.p.) anesthesia using VeVo 2100 Ultrasound System equipment (FUJIFILM Visual Sonics, Toronto, ON, Canada). The left ventricle internal diameter and the posterior and anterior walls diameters were obtained through the cardiac cycle from the short-axis, motion-imaging mode. Automatic calculation using the parameters measured was obtained for ejection fraction and fractional shortening.

The water content of the lung and biometric analysis

The water content of the lung was obtained from wet and dry weights organ, defined by: $\%H_2O = (\text{wet weight} - \text{dry weight} / \text{wet weight}) \times 100$. The Body and Heart weight (BW) of

each animal was determined at the end of the experimental protocol to calculate the cardiac weight index (Heart/Body Weight), after the hearts were submitted to histological processing with picosirius red. Only rats with infarct size close to 40% of the cross-sectional area of the left ventricle wall were enrolled in the study, as illustrated in figure 1A.

Western Blotting

After transthoracic echocardiography procedures, animals were decapitated and punches from SFO, PVN, RVLM and NTS areas were obtained through microdissections of 1200- μ m (for SFO and PVN) and 900- μ m (for RVLM and NTS) coronal sections using a cryostat, according to coordinates from the Paxinos and Watson (2004) atlas: SFO and PVN (-1 to -2.2mm) caudal to the bregma and RVLM and NTS (-3.2 to -4.1mm) caudal to the lambda.

The brain punches were processed to quantify the levels of the following total proteins by Western blot; GFAP (#G9269, Sigma-Aldrich, USA), EAAT2/GLT1 (#WH0006507M10, Sigma-Aldrich, USA), EAAT1/GLAST (#ab127026, Abcam, EUA), GS (#G2781, Sigma-Aldrich, USA) and β -actin (#4970, Cell Signaling Technology, USA). The protein concentration of the supernatant was determined using the BCA method (Thermo Scientific, Washington, EUA), and 5 μ g from RVLM, 10 μ g from SFO or NTS and 20 μ g from PVN were used. The nonspecific binding was blocked with 10% bovine serum albumin (BSA) for EAAT1/GLAST and GFAP or with 10% skim milk for GS and β -actin. Briefly, membranes were incubated overnight with rabbit anti-GFAP (1:200.000), anti-EAAT2/GLT1 (1:500), anti-EAAT1/GLAST (1:5000), anti-GS (1:200.000), and anti- β -actin (1:40.000) primary antibodies at 4 °C. After washing, the membranes were incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit

secondary antibody (1:10000, #7074, Cell Signaling Technology, USA) or with peroxidase-conjugated anti-goat secondary antibody (1:10000, #C0408, Santa Cruz Biotechnology, USA) at room temperature. The protein bands were visualized through chemoluminescence (ECL Plus Kit, AmerSHAM Biosciences, Sweden) techniques. The areas and intensities of the bands were quantified using imaging software and Chemidoc XRS system (Bio-Rad).

Statistical analysis

The data were analyzed by T-test in the software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software®, San Diego, CA, USA). Results were reported as means $\pm$ SEM using and p values < 0.05 were considered as statistically significant.

Results

Hemodynamic measurements:

Representative echocardiography images are shown in Fig. 1A. Histological sections used to obtain infarct size are shown in Fig 1B and morphological, hemodynamic characteristics and cardiac function values are expressed in table I. Our results showed an increase in body, heart weight, cardiac weight index and % lung H₂O in the CHF rats. The hemodynamic parameters obtained by tail-cuff recording showed that CHF does not change baseline MAP but decreases HR. Besides, cardiac function values by echocardiography showed a significant reduction in the ejection fraction percentage and fractional shortening accompanied by an increase in the internal

dimension of the left ventricle throughout the cardiac cycle (fig. 1B). These findings are consistent with the development of cardiac remodeling in ischemic CHF.

Glial cells markers proteins expressions:

Figure 1C-F shows the protein expression of different glial activity markers in the brainstem and hypothalamus nuclei. Figure 1C shows glial markers expression in the NTS region. CHF significantly reduced GFAP (46.4 ± 10.1 vs. $100 \pm 10.8\%$, $p=0.006$), GLT1/EAAT2 (57.8 ± 12.7 vs. $100 \pm 10.3\%$, $p=0.027$) and GS (74.1 ± 5.5 vs. $100 \pm 7.1\%$, $p=0.016$) protein expression. However, there were no changes in the GLAST/EAAT1 protein expression (108.2 ± 8.6 vs. $112.7 \pm 15.2\%$) in the NTS of CHF rats.

Figure 1D shows glial markers activity expression in the RVLM region. Our results showed a significant reduction in the GFAP (39.4 ± 7.9 vs. $100 \pm 19.1\%$, $p=0.015$), GLT1/EAAT2 (28.8 ± 14.2 vs. $100 \pm 27.7\%$, $p=0.045$), GLAST/EAAT1 (51.5 ± 17.9 vs. $118.9 \pm 19.1\%$, $p=0.030$) and GS (43.6 ± 14.7 vs. $117.8 \pm 19.2\%$, $p=0.012$) in the RVLM from CHF rats.

Figure 1E shows the expression of different glial activity marker proteins in the SFO region. Our results showed a significant increase in the GFAP (156 ± 21.7 vs. $100 \pm 10.7\%$, $p=0.037$), but reduction in the GLT1/EAAT2 (37.2 ± 16.4 vs. $100 \pm 18.7\%$, $p=0.030$), GLAST/EAAT1 (47.7 ± 8.3 vs. $100 \pm 13.8\%$, $p=0.013$) and GS expression (66.8 ± 11.6 vs. $100 \pm 7.7\%$, $p=0.039$) were observed in the SFO from CHF rats.

Figure 1F shows the expression of glial activity markers in the PVN region. We can observe that CHF reduces GFAP expression (62.6 ± 8.8 vs. $117.9 \pm 22.4\%$, $p=0.035$),

but did not change the expression of the others glial markers: GLT1/EAAT2 (114.4 ± 16.7 vs. $100 \pm 17.8\%$), GLAST/EAAT1 (115.7 ± 18.3 vs. $100 \pm 10.9\%$) or GS (114.7 ± 17.3 vs. $100 \pm 11\%$) in CHF rats.

Discussion

Glial glutamate transporter is impaired in CHF rats:

It is known that enhanced glutamatergic activity in cardiovascular nuclei, such as RVLM, NTS and PVN contributed to sympathetic overactivity in CHF ^{210,277}. Supporting that, our molecular data showed a significant decrease in the GLT1 protein expression in the SFO, NTS and RVLM nuclei from CHF rats. Furthermore, we found a decrease in GLAST expression in the SFO and the RVLM nuclei. Nevertheless, studies by Potapenko et al. (2012) found a decrease in the GLT1 protein expression, but an increase in the GLAST, which was accomplished by a glutamatergic overactivity into SON plasma membrane fraction from CHF rats. These discrepancies between our results about GLAST expression could be explained by the differences in the nucleus analyzed and its functions and/or because in our study we do not separate cytoplasmatic and membrane fraction to protein analysis, but together, Potapenko et al. (2012) and our studies suggest that astrocytic glutamatergic clearance are impaired in CHF rats, which could contribute to a glutamatergic overactivity-induced increase in the sympathetic nerve activity in cardiovascular diseases.

Ang- II contributes to sympathetic overactivity in CHF ^{210,278}. Studies by Isegawa et al., (2012) suggested that upregulation of the astrocyte AT1 receptors in the brainstem of the CHF mice, which seem to be involved in the sympathoexcitation and

the development of LV remodeling in CHF mice. Moreover, *in vitro* and *in vivo* studies have suggested that Ang-II induced a decrease in the astrocytic glutamate transporters activity/function, inducing an increase in extracellular glutamate^{69,102}. Our molecular findings provide novel evidence showing an impairment in the astrocytic glutamate transporter expression in the CHF. Future studies are required to better understand the involvement of Ang-II and GLT1 and GLAST expression in CHF rats.

Previous studies reported a decrease in the GFAP immunohistochemistry in the RVLM of the MI-induced HF mice (Isegawa). Our results showed a decrease in the GFAP in the NTS, RVLM and PVN nucleus from CHF rats, which could suggest a diminished astrocytic process covering the neuronal surface, and consequently, dysfunction in the astrocyte modulate glutamine and glutamate cycle, which in turn, could contribute to increasing synaptic transmission and neurons overactivity in the cardiovascular nuclei as observed in CHF^{116,122,210}. Our molecular evidence in the brain of the CHF rats stimulates us to pursue further studies aiming to unravel potential mechanisms involved in the astrocytic dysfunction in the CHF brain stem and hypothalamus modulating sympathetic nerve overactivity in this chronic cardiovascular disease.

Glutamine synthetase expression is impaired in CHF rats

Our findings showed that GS protein expression was impaired in the NTS, RVLM and SFO by CHF, which was accompanied by a decrease in the GLT-1 and GLAST (in the SFO and RVLM nucleus) expressions. *Studies in* brainstem slices demonstrated that stimulation of GLT1/GLAST by a D-aspartate substrate-induced

astrocytic glutamine release, suggesting that GS activity seems to be astrocytic glutamate transport-dependent ²⁷⁹. Nevertheless, studies *in vitro* demonstrated that inhibition of astrocytic GS significantly impaired glutamate uptake, as well as, glutamine release ¹⁷⁶. Possibly, reduction in the GLT-1 and GLAST expression can reduce the enzyme-substrate, contributing to downregulation of GS expression ²⁸⁰. Thus, it is possible that reduction in GLT-1 and GLAST expression following by reduction in the GS expression as observed in the NTS, RVLM and SFO nucleus have affected the glutamate uptake and recycling, contributing to a glutamatergic overactivity, as observed in CHF rats (Isegawa et al., 2014; Potapenko et al., 2012).

In conclusion, our study is the first to show that astrocytic GLAST, GLT1 and GS proteins essential to the glutamine-glutamate cycle are impaired along SFO, NTS and RVLM nuclei in CHF rats, which could contribute to the enhanced glutamate functions and consequently, sympathetic overactivity observed in this cardiovascular pathology.

Acknowledgments

The authors thank Milene Mantovani, Maria Valci Santos, Carlos Alberto Aguiar Silva and Jaci Airton Castania for their technical assistance. Thank Ana Carolina Mieke Omoto and Vanessa de Souza Nakagi for their assistance in the management of the echocardiogram. And, finally, thank Rubens F. de Melo for the excellent histological support.

Sources of Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 447690/2014-0; CNPq 4086117/2018-7), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes 8888.1.062209/2014.1), FAPESP (Process 2009/54010-1) through the acquisition of the VeVo 2100 Ultrasound System equipment and Fundação de Amparo à pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ, ID: 007/2019 FAPESQ-PB-MCT/CNPq).

Disclosures

None.

References

1. Faber JE, Brody MJ. Neural Contribution to Renal Hypertension Following Acute Renal Artery Stenosis in Conscious Rats. *Hypertension*. 1983;5(2):I-155-I-164. doi:10.1161/01.HYP.5.2_Pt_2.I155
2. Michelini LC, Bonagamba LG. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. *Hypertension*. 1988;11:I75-I79. doi:10.1161/01.HYP.11.2
3. Cutsforth-Gregory JK, Benarroch EE. Nucleus of the solitary tract, medullary reflexes, and clinical implications. *Neurology*. 2017;88(12):1187-1196. doi:10.1212/WNL.0000000000003751
4. Reid IA. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol - Endocrinol*

- Metab.* 1992;262(6 25-6). doi:10.1152/ajpendo.1992.262.6.e763
5. Cowley AW, DeClue JW. Quantification of baroreceptor influence on arterial pressure changes seen in primary angiotensin induced hypertension in dogs. *Circ Res.* 1976;39(6):779-787. doi:10.1161/01.RES.39.6.779
 6. Brooks VL. Interactions between angiotensin II and the sympathetic nervous system in the long-term control of arterial pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997;24(1):83-90. doi:10.1111/j.1440-1681.1997.tb01788.x
 7. Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Carillo BA, et al. Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. *Am J Hypertens.* 2009;22(5):484-492. doi:10.1038/ajh.2009.17
 8. Aronow WS. Treatment of systemic hypertension. *Am J Cardiovasc Dis.* 2012;2(3):160-170.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22937486><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3427981>
 9. Parati G, Esler M. The human sympathetic nervous system: Its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J.* Published online 2012. doi:10.1093/eurheartj/ehs041
 10. Brunström M, Carlberg B. Association of blood pressure lowering with mortality and cardiovascular disease across blood pressure levels a systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med.* 2018;178(1):28-36. doi:10.1001/jamainternmed.2017.6015

11. Takeda K, Buñag RD. Augmented sympathetic nerve activity and pressor responsiveness in DOCA hypertensive rats. *Hypertension*. 1980;2(1):97-101. doi:10.1161/01.HYP.2.1.97
12. Arribas SM, Alonso MJ, Marín J, et al. Noradrenergic transmission in the tail artery of hypertensive rats transgenic for the mouse renin gene Ren-2. *J Auton Pharmacol*. 1996;16(2):69-77. doi:10.1111/j.1474-8673.1996.tb00414.x
13. Cabassi A, Vinci S, Cantoni AM, et al. Sympathetic activation in adipose tissue and skeletal muscle of hypertensive rats. *Hypertension*. 2002;39(2 II):656-661. doi:10.1161/hy0202.103471
14. Leenen FHH, Ruzicka M, Huang BS. The brain and saltsensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2002;4(2):129-135. doi:10.1007/s11906-002-0037-y
15. Guimarães DD, Cruz JC, Carvalho-Galvão A, et al. Dietary nitrate reduces blood pressure in rats with angiotensin II-induced hypertension via mechanisms that involve reduction of sympathetic hyperactivity. *Hypertension*. 2019;73(4):839-848. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12425
16. Fink GD. Long-term sympatho-excitatory effect of angiotensin II: A mechanism of spontaneous and renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24(1):91-95. doi:10.1111/j.1440-1681.1997.tb01789.x
17. Carvalho THF, Bergamaschi CT, Lopes OU, Campos RR. Role of Endogenous Angiotensin II on Glutamatergic Actions in the Rostral Ventrolateral Medulla in Goldblatt Hypertensive Rats. *Hypertension*. 2003;42(4):707-712. doi:10.1161/01.HYP.0000086524.35251.2D

18. Braga VA, Medeiros IA, Ribeiro TP, França-Silva MS, Botelho-Ono MS, Guimarães DD. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: Implications in neurogenic hypertension. *Brazilian J Med Biol Res.* 2011;44(9):871-876. doi:10.1590/S0100-879X2011007500088
19. Nishi EE, Bergamaschi CT, Oliveira-Sales EB, Simon KA, Campos RR. Losartana reduces oxidative stress within the rostral ventrolateral medulla of rats with renovascular hypertension. *Am J Hypertens.* 2013;26(7):858-865. doi:10.1093/ajh/hpt037
20. Rossi NF, Zenner Z, Rishi AK, Levi E, Maliszewska-Scislo M. AT 1 receptors in the subfornical organ modulate arterial pressure and the baroreflex in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2019;316(2):R172-R185. doi:10.1152/ajpregu.00289.2018
21. Tigerstedt R, Bergman. PG. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol.* 1898;8(1):223–271.
22. Goldblatt H. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION: I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA. *J Exp Med.* Published online 1934. doi:10.1084/jem.59.3.347
23. Goldblatt H. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION : III. THE PRODUCTION OF PERSISTENT HYPERTENSION IN MONKEYS (MACAQUE) BY RENAL ISCHEMIA. *J Exp Med.* 1937;65(5):671-675.
24. BRAUN-MENENDEZ E, FASCILOLO JC, LELOIR FL, MUNOZ JM. THE SUBSTANCE CAUSING RENAL HYPERTENSION. *J Physiol.* 1940;98:283-

- 298.
25. Skrbic R, Igic R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). *Peptides*. 2009;30(10):1945-1950. doi:10.1016/j.peptides.2009.07.003
 26. Page I, Helmer O. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J Exp Med*. 1940;71(1):29-42. doi:10.1084/jem.71.1.29
 27. Page I, Helmer O, Plentl A, Kohlstaedt K, Corcoran A. Suggested Change in Designation of `` Renin-Activator `` (Hypertensinogen) to Renin- Substrate (alpha 2 Globulin). *Science (80-)*. 1943;98(2537):153-154.
 28. Skeggs L, Kahn J, Shumway N. THE PREPARATION AND FUNCTION OF THE HYPERTENSIN-CONVERTING ENZYME. *J Exp Med*. 1956;103(3):295–299.
 29. BRAUN-MENENDEZ E, PAGE I. Suggested Revision of Nomenclature-- Angiotensin. *Science (80-)*. 1958;127(3292):242–242.
 30. Faarup P. RENIN LOCATION IN THE DIFFERENT PARTS OF THE JUXTAGLOMERULAR APPARATUS IN THE CAT KIDNEY: 2. Fractions of the Afferent Arteriole, The Cell Group of Goormaghtigh, the Efferent Arteriole and the Glomerulus. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1968;71(4):509-521. doi:10.1111/j.1699-0463.1967.tb05173.x
 31. Frederiksen O, Leyssac PP, Skinner SL. Sensitive osmometer function of juxtaglomerular cells in vitro. *J Physiol*. 1975;252(3):669-679. doi:10.1113/jphysiol.1975.sp011164

32. Baumbach L, Leyssac P, Skinner S. Studies on renin release from isolated superfused glomeruli: effects of temperature, urea, ouabain and ethacrynic acid. . *J Physiol*. 1976;258(1):243-256.
33. Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension*. 1991;17(5):707-719. doi:10.1161/01.HYP.17.5.707
34. Jr RF, José V, Cesar H. Modelos de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2001;8(1):19-29.
35. Cavalcanti C de O, Alves RR, de Oliveira AL, et al. Inhibition of PDE5 restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. *Front Physiol*. 2016;7(JAN):1-9. doi:10.3389/fphys.2016.00015
36. Carvalho-Galvão A, Guimarães DD, De Brito Alves JL, Braga VA. Central inhibition of tumor necrosis factor alpha reduces hypertension by attenuating oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla in renovascular hypertensive rats. *Front Physiol*. 2019;10(APR):1-10. doi:10.3389/fphys.2019.00491
37. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*. 2013;19(12):1584-1596. doi:10.1038/nm.3407
38. Volicer L, Loew CG. Penetration of angiotensin II into the brain. *Neuropharmacology*. 1971;10(5):631-634. doi:10.1016/0028-3908(71)90029-3
39. Biancardi VC, Son SJ, Ahmadi S, Filosa JA, Stern JE. Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. *Hypertension*. 2014;63(3):572-579.

doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01743

40. Gross PM, Blasberg RG, Fenstermacher JD, Patlak CS. The microcirculation of rat circumventricular organs and pituitary gland. *Brain Res Bull.* 1987;18(1):73-85. doi:10.1016/0361-9230(87)90035-9
41. Li Z, Ferguson A V. Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilize angiotensin as a neurotransmitter. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 1993;265(2 34-2):302-309. doi:10.1152/ajpregu.1993.265.2.r302
42. Gebke E, Muller AR, Jurzak M, Gerstberger R. Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience.* 1998;85(2):509-520. doi:10.1016/S0306-4522(97)00601-5
43. Phillips M, Felix D. SPECIFIC ANGIOTENSIN II RECEPTIVE NEURONS IN THE CAT SUBFORNICAL ORGAN. *Brain Res.* 1976;109(4):531-540.
44. Zubcevic J, Santisteban MM, Perez PD, et al. A single angiotensin li hypertensive stimulus is associated with prolonged neuronal and immune system activation in Wistar-Kyoto rats. *Front Physiol.* 2017;8(AUG):592. doi:10.3389/fphys.2017.00592
45. Cato MJ, Toney GM. Angiotensin II excites paraventricular nucleus neurons that innervate the rostral ventrolateral medulla: an in vitro patch-clamp study in brain slices. *J Neurophysiol.* 2005;93(1):403-413. doi:10.1152/jn.01055.2003
46. van der Kooy D, Koda LY. Organization of the projections of a circumventricular organ: The area postrema in the rat. *J Comp Neurol.* 1983;219(3):328-338. doi:10.1002/cne.902190307

47. Tan PSP, Killinger S, Horiuchi J, Dampney RAL. Baroreceptor reflex modulation by circulating angiotensin II is mediated by AT1 receptors in the nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(6):2267-2279. doi:10.1152/ajpregu.00267.2007
48. SUN M-K, SPYER K M. Gaba-mediated inhibition of medullary vasomotor neurones by area postrema stimulation in rats. *J Physiol (1991)*,. 1991;(436):669-684.
49. Wilson CG, Bonham AC. Area postrema excites and inhibits sympathetic-related neurons in rostral ventrolateral medulla in rabbit. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 1994;266(3 35-3). doi:10.1152/ajpheart.1994.266.3.h1075
50. Contreras RJ, Beckstead RM, Norgren R. The central projections of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves: an autoradiographic study in the rat. *J Auton Nerv Syst*. 1982;6(3):303-322. doi:10.1016/0165-1838(82)90003-0
51. Kumada M, Terui N, Kuwaki T. Arterial baroreceptor reflex: Its central and peripheral neural mechanisms. *Prog Neurobiol*. 1990;35(5):331-361. doi:10.1016/0301-0082(90)90036-G
52. Affleck VS, Coote JH, Pyner S. The projection and synaptic organisation of NTS afferent connections with presympathetic neurons, GABA and nNOS neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience*. 2012;219:48-61. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.070
53. Mendelowitz D, Yang M, Andresen MC, Kunze DL. Localization and retention in vitro of fluorescently labeled aortic baroreceptor terminals on neurons from the

- nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 1992;581(2):339-343. doi:10.1016/0006-8993(92)90729-S
54. Amendt K, Czachurski J, Dembowski K, Seller H. Bulbospinal projections to the intermediolateral cell column; a neuroanatomical study. *J Auton Nerv Syst.* 1979;1(1):103-117. doi:10.1016/0165-1838(79)90009-2
 55. Bains JS, Potyok a, Ferguson a V. Angiotensin II actions in paraventricular nucleus: functional evidence for neurotransmitter role in efferents originating in subfornical organ. *Brain Res.* 1992;599(2):223-229.
 56. Bains JS, Ferguson A V. Paraventricular nucleus neurons projecting to the spinal cord receive excitatory input from the subfornical organ. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 1995;268(3):R625-R633.
 57. Papas S, Smith P, Ferguson A V. Electrophysiological evidence that systemic angiotensin influences rat area postrema neurons. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 1990;258(1 27-1). doi:10.1152/ajpregu.1990.258.1.r70
 58. Nunes FC, Braga VA. Chronic angiotensin II infusion modulates angiotensin II type i receptor expression in the subfornical organ and the rostral ventrolateral medulla in hypertensive rats. *JRAAS - J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2011;12(4):440-445. doi:10.1177/1470320310394891
 59. Zhang Y, Yu XJ, Chen WS, et al. Exercise training attenuates renovascular hypertension partly via RAS-ROS-glutamate pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Sci Rep.* 2016;6(May):1-10. doi:10.1038/srep37467
 60. Stornetta RL, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG, Lynch KR. Astrocytes

- synthesize angiotensinogen in brain. *Science*. 1988;242(4884):1444-1446.
doi:10.1126/science.3201232
61. Inagami T, Celio MR, Clemens DL, et al. Renin in rat and mouse brain: immunohistochemical identification and localization. *Clin Sci*. 1980;59 Suppl 6:49-51. doi:10.1042/cs059049s
62. Li W, Peng H, Mehaffey EP, et al. Neuron-specific (Pro)renin receptor knockout prevents the development of salt-sensitive hypertension. *Hypertension*. 2014;63(2):316-323. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02041
63. Shi P, Diez-Freire C, Jun JY, et al. Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension. *Hypertension*. 2010;56(2):297-303.
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150409
64. Saavedra JM, Chevillard C. ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME IS PRESENT IN THE SUBFORNICAL ORGAN AND OTHER CIRCUMVENTRICULAR ORGANS OF THE RAT. *Neurosci Lett*. 1982;29:123-127.
65. Arregui A, Iversen LL. Angiotensin-converting enzyme: Presence of high activity in choroid plexus of mammalian brain. *Eur J Pharmacol*. 1978;52(1):147-150. doi:10.1016/0014-2999(78)90035-3
66. Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortès C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol*. 1997;18(18):383-439. doi:10.1006/frne.1997.0155

67. Chen Q, Pan HL. Signaling mechanisms of angiotensin II-induced attenuation of GABAergic input to hypothalamic presympathetic neurons. *J Neurophysiol.* 2007;97(5):3279-3287. doi:10.1152/jn.01329.2006
68. Latchford KJ, Ferguson A V. ANG II-induced excitation of paraventricular nucleus magnocellular neurons: A role for glutamate interneurons. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(5 55-5). doi:10.1152/ajpregu.00603.2003
69. Stern JE, Son S, Biancardi VC, Zheng H, Sharma N, Patel KP. Astrocytes Contribute to Angiotensin II Stimulation of Hypothalamic Neuronal Activity and Sympathetic Outflow. *Hypertension.* 2016;68(6):1483-1493. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07747
70. Qi J, Zhang DM, Suo YP, et al. Renin-angiotensin system modulates neurotransmitters in the paraventricular nucleus and contributes to angiotensin ii-induced hypertensive response. *Cardiovasc Toxicol.* 2013;13(1):48-54. doi:10.1007/s12012-012-9184-9
71. Kagiya S, Varela A, Phillips MI, Galli SM. Antisense inhibition of brain renin-angiotensin system decreased blood pressure in chronic 2-kidney, 1 clip hypertensive rats. *Hypertension.* 2001;37(2 II):371-375. doi:10.1161/01.HYP.37.2.371
72. Chen AD, Zhang SJ, Yuan N, et al. Angiotensin AT1 receptors in paraventricular nucleus contribute to sympathetic activation and enhanced cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. *Exp Physiol.* 2011;96(2):94-103. doi:10.1113/expphysiol.2010.054353
73. Fleegal-Demotta MA, Doghu S, Banks WA. Angiotensin II modulates BBB

- permeability via activation of the AT 1 receptor in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(3):640-647. doi:10.1038/jcbfm.2008.158
74. Biancardi V, Son S, Ahmadi S, Filosa J, Javier E. Circulating Angiotensin II Gains Access To the Hypothalamus and Brainstem During Hypertension. *Hypertension.* 2014;63(3):572–579.
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01743.
 75. Fan Y, Yang X, Tao Y, Lan L, Zheng L, Sun J. Tight junction disruption of blood brain barrier in white matter lesions in chronic hypertensive rats. *Neuroreport.* 2015;26(17):1039-1043. doi:10.1097/WNR.0000000000000464
 76. Biancardi VC, Stern JE. Compromised blood-brain barrier permeability: Novel mechanism by which circulating angiotensin II signals to sympathoexcitatory centres during hypertension. *J Physiol.* 2016;594(6):1591-1600.
doi:10.1113/JP271584
 77. Yao ST, May CN. Intra-carotid angiotensin II activates tyrosine hydroxylase-expressing rostral ventrolateral medulla neurons following blood-brain barrier disruption in rats. *Neuroscience.* 2013;245:148-156.
doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.023
 78. Gabor A, Leenen FHH. Central mineralocorticoid receptors and the role of angiotensin ii and glutamate in the paraventricular nucleus of rats with angiotensin ii-induced hypertension. *Hypertension.* 2013;61(5):1083-1090.
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00797
 79. Sun A, Li D. Cardiovascular responses to intracerebroventricular injection of GABA in renovascular hypertensive rats. *Acta Pharmaeologia Sinica.*

- 1994;15(2):136-138.
80. Martin DS, Haywood JR. Reduced GABA inhibition of sympathetic function in renal-wrapped hypertensive rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 1998;275(5 44-5):1523-1529. doi:10.1152/ajpregu.1998.275.5.r1523
 81. LaGrange LP, Toney GM, Bishop VS. Effect of Intravenous Angiotensin II Infusion on Responses to Hypothalamic PVN Injection of Bicuculline. *Hypertension*. 2003;42(6):1124-1129. doi:10.1161/01.HYP.0000102181.83892.04
 82. Légar L, Smolders I, Dupont AG. Angiotensin-II-mediated AT1 receptor stimulation increases glutamate release within the rostral ventrolateral medulla of normotensive rats. *Hypertens Res*. 2020;43(8):848-850. doi:10.1038/s41440-020-0419-z
 83. Tasker JG, Oliet SHR, Bains JS, Brown CH, Stern JE. Glial Regulation of Neuronal Function: From Synapse to Systems Physiology. *J Neuroendocrinol*. 2012;24(4):566-576. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02259.x
 84. Pfrieger FW. Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Res Rev*. 2010;63(1-2):39-46. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.11.002
 85. Allen NJ, Lyons DA. System Formation and Function. *Science (80-)*. 2018;185(October):181-185.
 86. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(1):41-53. doi:10.1038/nrn1824
 87. Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat*

- Neurosci.* 2007;10(11):1369-1376. doi:10.1038/nn2003
88. Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 2011;14(6):724-738. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.016
 89. Bellot-Saez A, Kékesi O, Morley JW, Buskila Y. Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017;77:87-97. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.03.002
 90. Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells.* 2019;8(2):184. doi:10.3390/cells8020184
 91. Kanai Y, Cléménçon B, Simonin A, et al. The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):108-120. doi:10.1016/j.mam.2013.01.001
 92. Roberts RC, Roche JK, McCullumsmith RE. Localization of excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 in human postmortem cortex: A light and electron microscopic study. *Neuroscience.* 2014;277:522-540. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.07.019
 93. Lehre KP, Danbolt NC. The number of glutamate transport subtype molecules at glutamatergic synapses: Chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci.* 1998;18(21):8751-8757. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-21-08751.1998
 94. Sullivan SM, Lee A, Björkman ST, et al. Cytoskeletal anchoring of GLAST

- determines susceptibility to brain damage: An identified role for GFAP. *J Biol Chem.* 2007;282(40):29414-29423. doi:10.1074/jbc.M704152200
95. Filyakova NA, Patrusheva VE, Patrushev MV, Shusharina NN, Silina EV. Expression of transporter genes in astrocytes for different neuromediators in different brain departments in rats. *J Pharm Sci Res.* 2018;10(5):1297-1305.
 96. Chounlamountry K, Kessler JP. The ultrastructure of perisynaptic glia in the nucleus tractus solitarii of the adult rat: Comparison between single synapses and multisynaptic arrangements. *Glia.* Published online 2011. doi:10.1002/glia.21135
 97. Guo W, Imai S, Zou S, et al. Altered glial glutamate transporter expression in descending circuitry and the emergence of pain chronicity. *Mol Pain.* 2019;15. doi:10.1177/1744806918825044
 98. Matott MP, Kline DD, Hasser EM. *Glial EAAT2 Regulation of Extracellular NTS Glutamate Critically Controls Neuronal Activity and Cardiorespiratory Reflexes.* Vol 595.; 2017. doi:10.1113/JP274620
 99. Matott MP, Ruyle BC, Hasser EM, Kline DD. Excitatory amino acid transporters tonically restrain nTS synaptic and neuronal activity to modulate cardiorespiratory function. *J Neurophysiol.* 2016;115(3):1691-1702. doi:10.1152/jn.01054.2015
 100. Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: Glial localization in brain. *Science (80-).* Published online 1977. doi:10.1126/science.14400
 101. Albrecht J, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. Glutamine in the

- central nervous system: Function and dysfunction. *Front Biosci.* 2007;12(1):332-343. doi:10.2741/2067
102. Flôr AFL, de Brito Alves JL, França-Silva MS, et al. Glial cells are involved in ANG-II-induced vasopressin release and sodium intake in awake rats. *Front Physiol.* 2018;9(MAY). doi:10.3389/fphys.2018.00430
 103. Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol.* 1985;8(C):203-214. doi:10.1016/S0165-5728(85)80063-1
 104. Inagaki M, IMakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N. Glial Fibrillary Acidic Protein: Dynamic Property and Regulation by Phosphorylation. *Brain Pathol.* 1994;4(3):239-243. doi:10.1111/j.1750-3639.1994.tb00839.x
 105. Tanaka J, Tada K, Takeda M, Hariguchi S, Nishimura T. Effect of metallic cations and pH on reassembly of glial fibrillary acidic protein. *Neurochem Int.* 1989;15(4):421-428. doi:10.1016/0197-0186(89)90159-9
 106. Stromer MH, Ritter MA, Pang YY, Robson RM. Effect of cations and temperature on kinetics of desmin assembly. *Biochem J.* 1987;246(1):75-81. doi:10.1042/bj2460075
 107. Inagaki M, Gonda Y, Nishizawa K, et al. Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a non- α -helical head domain. *J Biol Chem.* 1990;265(8):4722-4729.
 108. Yang ZW, Babitch JA. Factors Modulating Filament Formation by Bovine Glial Fibrillary Acidic Protein, the Intermediate Filament Component of Astroglial

- Cells. *Biochemistry*. 1988;27(18):7038-7045. doi:10.1021/bi00418a055
109. Gould E, Frankfurt M, Westlind-Danielsson A, McEwen BS. Developing forebrain astrocytes are sensitive to thyroid hormone. *Glia*. 1990;3(4):283-292. doi:10.1002/glia.440030408
 110. O'Callaghan JP, Brinton RE, McEwen BS. Glucocorticoids Regulate the Synthesis of Glial Fibrillary Acidic Protein in Intact and Adrenalectomized Rats but Do Not Affect Its Expression Following Brain Injury. *J Neurochem*. 1991;57(3):860-869. doi:10.1111/j.1471-4159.1991.tb08230.x
 111. Balasingam V, Tejada-Berges T, Wright E, Bouckova R, Yong VW. Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J Neurosci*. 1994;14(2):846-856. doi:10.1523/jneurosci.14-02-00846.1994
 112. Giulian D, Young G, Krebs F, Lachman B. Interleukin-1 Injected into Mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci*. 1988;8(7):2485-2490.
 113. Duan L, Yuan H, Su CJ, Liu YY, Rao ZR. Ultrastructure of junction areas between neurons and astrocytes in rat supraoptic nuclei. *World J Gastroenterol*. 2004;10(1):117-121. doi:10.3748/wjg.v10.i1.117
 114. Gordon GRJ, Bains JS. Noradrenaline triggers multivesicular release at glutamatergic synapses in the hypothalamus. *J Neurosci*. 2005;25(49):11385-11395. doi:10.1523/JNEUROSCI.2378-05.2005
 115. Theodosis DT, Trailin A, Poulain DA. Remodeling of astrocytes, a prerequisite for synapse turnover in the adult brain? Insights from the oxytocin system of the

- hypothalamus. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290(5).
doi:10.1152/ajpregu.00755.2005
116. Wang Y-F, Hatton GI. Astrocytic Plasticity and Patterned Oxytocin Neuronal Activity: Dynamic Interactions. *J Neurosci*. 2009;29(6):1743-1754.
doi:10.1523/JNEUROSCI.4669-08.2009
 117. Matott MP, Hasser EM, Kline DD. Sustained Hypoxia Alters nTS Glutamatergic Signaling and Expression and Function of Excitatory Amino Acid Transporters. *Neuroscience*. 2020;430:131-140. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.01.034
 118. Yamamoto K, Mifflin S. Inhibition of glial glutamate transporter GLT1 in the nucleus of the solitary tract attenuates baroreflex control of sympathetic nerve activity and heart rate. *Physiol Rep*. 2018;6(18):1-9. doi:10.14814/phy2.13877
 119. Martinez D, Rogers R, Hermann G, Hasser E, Kline D. Astrocytic glutamate transporters reduce the neuronal and physiological influence of metabotropic glutamate receptors in nucleus tractus solitarii. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. Published online 2020.
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1120700020921110><https://doi.org/10.1016/j.reuma.2018.06.001><https://doi.org/10.1016/j.arth.2018.03.044>
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1063458420300078?token=C039B8B13922A2079230DC9AF11A333E295FCD8>
 120. Martinez D, Rogers R, Hasser E, Hermann G, Kline D. Loss of excitatory amino acid transporter restraint following chronic intermittent hypoxia contributes to synaptic alterations in nucleus tractus solitarii. *J Neurophysiol*. Published online 2020.

- <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1120700020921110%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.reuma.2018.06.001%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.arth.2018.03.044%0Ahttps://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1063458420300078?token=C039B8B13922A2079230DC9AF11A333E295FCD8>
121. Gourine A V., Kasymov V, Marina N, et al. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* (80-). 2010;329(5991):571-575.
doi:10.1126/science.1190721
 122. Potapenko ES, Biancardi VC, Zhou Y, Stern JE. Altered astrocyte glutamate transporter regulation of hypothalamic neurosecretory neurons in heart failure rats. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2012;303(3):R291-R300.
doi:10.1152/ajpregu.00056.2012
 123. Marina N, Tang F, Figueiredo M, et al. Purinergic signalling in the rostral ventrolateral medulla controls sympathetic drive and contributes to the progression of heart failure following myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(1):1-10. doi:10.1007/s00395-012-0317-x
 124. Costa KM, Moraes DJA, MacHado BH. Acute inhibition of glial cells in the NTS does not affect respiratory and sympathetic activities in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Brain Res*. 2013;1496:36-48.
doi:10.1016/j.brainres.2012.12.003
 125. Isegawa K, Hirooka Y, Katsuki M, Kishi T, Sunagawa K. Angiotensin II type 1 receptor expression in astrocytes is upregulated leading to increased mortality in mice with myocardial infarction-induced heart failure. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2014;307(10):H1448-H1455. doi:10.1152/ajpheart.00462.2014

126. Marina N, Teschemacher AG, Kasparov S, Gourine A V. Glia, sympathetic activity and cardiovascular disease. *Exp Physiol*. 2016;101(5):565-576.
doi:10.1113/EP085713
127. Pandit S, Jo JY, Lee SU, et al. Enhanced astroglial GABA uptake attenuates tonic GABA inhibition of the presympathetic hypothalamic paraventricular nucleus neurons in heart failure. *J Neurophysiol*. 2015;114(2):914-926.
doi:10.1152/jn.00080.2015
128. Chaar LJ, Alves TP, Junior AMB, Michelini LC. Early training-induced reduction of Angiotensinogen in autonomic areas-the main effect of exercise on brain Renin-Angiotensin system in hypertensive rats. *PLoS One*. 2015;10(9):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0137395
129. Haspula D, Clark MA. Heterologous regulation of the cannabinoid type 1 receptor by angiotensin II in astrocytes of spontaneously hypertensive rats. *J Neurochem*. 2016;139(4):523-536. doi:10.1111/jnc.13776
130. Chen J, Yin D, He X, et al. Modulation of activated astrocytes in the hypothalamus paraventricular nucleus to prevent ventricular arrhythmia complicating acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2020;308:33-41.
doi:10.1016/j.ijcard.2020.01.035
131. Diaz JR, Kim KJ, Brands MW, Filosa JA. Augmented astrocyte microdomain Ca²⁺ dynamics and parenchymal arteriole tone in angiotensin II-infused hypertensive mice. *Glia*. 2019;67(3):551-565. doi:10.1002/glia.23564
132. Negussie S, Lymperopoulos A, Clark MA. Role of β arrestin1 in AT₁ R-mediated mitogen-activated protein kinase activation in Wistar and SHR

- brainstem astrocytes. *J Neurochem.* 2019;148(1):46-62. doi:10.1111/jnc.14620
133. Queiroz TM, Guimarães DD, Mendes-Junior LG, Braga VA. A-Lipoic Acid Reduces Hypertension and Increases Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. *Molecules.* 2012;17(11):13357-13367. doi:10.3390/molecules171113357
134. Michelini LC, Bonagamba LGH. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. *Hypertension.* 1988;11(2):I-75-I-79. doi:10.1161/01.hyp.11.2_pt_2.i75
135. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Acad Press San Diego.* 1997;3rd.
136. Oliva WM, Granjeiro ÉM, Bongamba LGH, Mendes RA, Machado BH. Dopamine microinjected into brainstem of awake rats affects baseline arterial pressure but not chemoreflex responses. *Auton Neurosci Basic Clin.* Published online 2010. doi:10.1016/j.autneu.2010.01.013
137. Granjeiro ÉM, Gomes F V., Guimarães FS, Corrêa FMA, Resstel LBM. Effects of intracisternal administration of cannabidiol on the cardiovascular and behavioral responses to acute restraint stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011;99(4):743-748. doi:10.1016/j.pbb.2011.06.027
138. Liu X-Y, Cui D, Li D, et al. Oxytocin Removes Estrous Female vs. Male Preference of Virgin Male Rats: Mediation of the Supraoptic Nucleus Via Olfactory Bulbs. *Front Cell Neurosci.* 2017;11(October):1-11. doi:10.3389/fncel.2017.00327

139. Fonnum F, Johnsen A, Hassel B. Use of Fluorocitrate and Fluoroacetate in the Study of Brain Metabolism. *Glia*. 1997;21:106-113. doi:10.1111/j.1471-4159.1987.tb05674.x
140. Almeida-Pereira G, Coletti R, Mecawi AS, Reis LC, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J. Estradiol and angiotensin II crosstalk in hydromineral balance: Role of the ERK1/2 and JNK signaling pathways. *Neuroscience*. 2016;322:525-538. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.02.067
141. Buttler L, Jordão MT, Fragas MG, Ruggeri A, Ceroni A, Michelini LC. Maintenance of blood-brain barrier integrity in hypertension: A novel benefit of exercise training for autonomic control. *Front Physiol*. 2017;8(DEC):1-14. doi:10.3389/fphys.2017.01048
142. Talman WT. Kynurenic acid microinjected into the nucleus tractus solitarius of rat blocks the arterial baroreflex but not responses to glutamate. *Neurosci Lett*. 1989;102(2-3):247-252. doi:10.1016/0304-3940(89)90086-4
143. Pawloski-Dahm C, Gordon FJ. Evidence for a kynurenate-insensitive glutamate receptor in nucleus tractus solitarii. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 1992;262(5 31-5):1611-1615. doi:10.1152/ajpheart.1992.262.5.h1611
144. Machado BH, Bonagamba LGH. Microinjection of l-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res*. 1992;576(1):131-138. doi:10.1016/0006-8993(92)90618-J
145. Colombari E, Bonagamba LGH, Machado BH. Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 1994;266(3 35-3).

doi:10.1152/ajpregu.1994.266.3.r730

146. Albrecht M, Henke J, Tacke S, Markert M, Guth B. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. *BMC Vet Res.* 2014;10(1):1-14. doi:10.1186/s12917-014-0198-3
147. Goldblatt BYH, Lynch J, Ramon F, Ph D, 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;59(3):347-79.
148. Martins-Oliveira A, Castro MM, Oliveira DMM, et al. Contrasting effects of aliskiren versus losartana on hypertensive vascular remodeling. *Int J Cardiol.* 2013;167(4):1199-1205. doi:10.1016/j.ijcard.2012.03.137
149. Neto-Neves EM, Pinheiro LC, Nogueira RC, Portella RL, Batista RI, Tanus-Santos JE. Sodium nitrite improves hypertension-induced myocardial dysfunction by mechanisms involving cardiac S-nitrosylation. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;134(June):40-50. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.06.012
150. Pereira TMC, Balarini CM, Silva I V., Cabral AM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Endogenous angiotensin II modulates nNOS expression in renovascular hypertension. *Brazilian J Med Biol Res.* 2009;42(7):685-691. doi:10.1590/S0100-879X2009000700014
151. Nekooeian AA, Rasti A. Effects of Captopril and Losartana on Cardiac Stereology in Rats with Renovascular Hypertension. Published online 2020:2-12. doi:10.30476/ijms.2020.81948.0.Abstract

152. de Sousa Lima EB, de Oliveira LCS, da Silva Cardoso G, et al. Moderate-intensity exercise and renin angiotensin system blockade improve the renovascular hypertension (2K1C)-induced gastric dysmotility in rats. *Life Sci.* 2018;210:55-64. doi:10.1016/j.lfs.2018.08.053
153. Li Z, Bains JS, Ferguson A V. Functional evidence that the angiotensin antagonist losartana crosses the blood-brain barrier in the rat. *Brain Res Bull.* 1993;30(1-2):33-39. doi:10.1016/0361-9230(93)90036-B
154. De Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR. Upregulation of α_1 R and iNOS in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) is essential for the sympathetic hyperactivity and hypertension in the 2K-1C wistar rat model. *Am J Hypertens.* 2010;23(7):708-715. doi:10.1038/ajh.2010.64
155. Li P, Zhang F, Sun HJ, Han Y. Angiotensin-(1-7) enhances the effects of angiotensin II on the cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activity in rostral ventrolateral medulla in renovascular hypertensive rats. *J Am Soc Hypertens.* 2015;9(11):865-877. doi:10.1016/j.jash.2015.08.005
156. Melo MR, Gasparini S, Speretta GF, et al. Importance of the commissural nucleus of the solitary tract in renovascular hypertension. *Hypertens Res.* 2019;42(5):587-597. doi:10.1038/s41440-018-0190-6
157. Nishi EE, Oliveira-Sales EB, Bergamaschi CT, Oliveira TGC, Boim MA, Campos RR. Chronic antioxidant treatment improves arterial renovascular hypertension and oxidative stress markers in the kidney in wistar rats. *Am J Hypertens.* 2010;23(5):473-480. doi:10.1038/ajh.2010.11

158. Abdi A, Johns EJ. The effect of angiotensin II receptor antagonists on kidney function in two-kidney, two-clip Goldblatt hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1997;331(2-3):185-192. doi:10.1016/S0014-2999(97)01038-8
159. Welch J, Wilcox S, Cardozo J, Cardozo J, Ati JW, Ghz T. ATI and TxA # GHZ throughout receptors maintain hypertension Goldblatt hypertension in the rat. Published online 2019.
160. Lacerda JEC, Campos RR, Araujo GC, Andreatta-Van Leyen S, Lopes OU, Guertzenstein PG. Cardiovascular responses to microinjections of GABA or anesthetics into the rostral ventrolateral medulla of conscious and anesthetized rats. *Brazilian J Med Biol Res.* 2003;36(9):1269-1277. doi:10.1590/S0100-879X2003000900019
161. Jackson KL, Marques FZ, Lim K, Davern PJ, Head GA. Circadian differences in the contribution of the brain renin-angiotensin system in genetically hypertensive mice. *Front Physiol.* 2018;9(MAR). doi:10.3389/fphys.2018.00231
162. Nobre F, da Silva CAA, Coelho EB, Salgado HC, Fazan R. Antihypertensive Agents Have Different Ability to Modulate Arterial Pressure and Heart Rate Variability in 2K1C Rats. *Am J Hypertens.* 2006;19(10):1079-1083. doi:10.1016/j.amjhyper.2006.02.011
163. Xie HH, Shen FM, Xu LP, Han P, Miao CY, Su DF. Reduction of blood pressure variability by combination therapy in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2007;25(11):2334-2344. doi:10.1097/HJH.0b013e3282ef547f
164. Yamamoto K, Mifflin S. Inhibition of glial glutamate transporter GLT1 in the nucleus of the solitary tract attenuates baroreflex control of sympathetic nerve

- activity and heart rate. *Physiol Rep*. 2018;6(18):1-9. doi:10.14814/phy2.13877
165. Chen CT, Hwang LL, Chang JK, Dun NJ. Pressor effects of orexins injected intracisternally and to rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2000;278(3 47-3):692-697. doi:10.1152/ajpregu.2000.278.3.r692
 166. Matott MP, Kline DD, Hasser EM. Glial EAAT2 regulation of extracellular nTS glutamate critically controls neuronal activity and cardiorespiratory reflexes. *J Physiol*. 2017;595(17):6045-6063. doi:10.1113/JP274620
 167. Salvatore MF, Davis RW, Arnold JC, Chotibut T. Transient striatal GLT-1 blockade increases EAAC1 expression, glutamate reuptake, and decreases tyrosine hydroxylase phosphorylation at ser 19. *Exp Neurol*. 2012;234(2):428-436. doi:10.1016/j.expneurol.2012.01.012
 168. Chounlamountry K, Castets F, Tell F, Kessler JP. The excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1) in the rat nucleus of the solitary tract: subcellular localization suggests no major role in glutamate clearance. *Brain Struct Funct*. 2016;221(2):1113-1124. doi:10.1007/s00429-014-0958-7
 169. Hu QX, Klatt GM, Gudmundsrud R, et al. Semi-quantitative distribution of excitatory amino acid (glutamate) transporters 1–3 (EAAT1-3) and the cystine-glutamate exchanger (xCT) in the adult murine spinal cord. *Neurochem Int*. 2020;140(April):104811. doi:10.1016/j.neuint.2020.104811
 170. Chan SHH, Hsu K Sen, Huang CC, Wang LL, Ou CC, Chan JYH. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral

medulla. *Circ Res.* 2005;97(8):772-780.

doi:10.1161/01.RES.0000185804.79157.C0

171. Piani D, Frei K, Pfister HW, Fontana A. Glutamate uptake by astrocytes is inhibited by reactive oxygen intermediates but not by other macrophage-derived molecules including cytokines, leukotrienes or platelet-activating factor. *J Neuroimmunol.* 1993;48(1):99-104. doi:10.1016/0165-5728(93)90063-5
172. Volterra A, Trotti D, Tromba C, Floridi S, Racagni G. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci.* 1994;14(5 I):2924-2932. doi:10.1523/jneurosci.14-05-02924.1994
173. Sorg O, Horn TF, Yu N, Gruol DL, Bloom FE. Inhibition of astrocyte glutamate uptake by reactive oxygen species: role of antioxidant enzymes. *Mol Med.* 1997;3(7):431-440.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2230215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
174. Zhou X, Yang H, Song X, Wang J, Shen L, Wang J. Central blockade of the AT1 receptor attenuates pressor effects via reduction of glutamate release and downregulation of NMDA/AMPA receptors in the rostral ventrolateral medulla of rats with stress-induced hypertension. *Hypertens Res.* 2019;42(8):1142-1151. doi:10.1038/s41440-019-0242-6
175. Wu X, Kihara T, Hongo H, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H. Angiotensin receptor type 1 antagonists protect against neuronal injury induced by oxygen-glucose depletion. *Br J Pharmacol.* 2010;161(1):33-50. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00840.x

176. Zou J, Wang YX, Dou FF, et al. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochem Int.* 2010;56(4):577-584. doi:10.1016/j.neuint.2009.12.021
177. Trabelsi Y, Amri M, Becq H, Molinari F, Aniksztejn L. The conversion of glutamate by glutamine synthase in neocortical astrocytes from juvenile rat is important to limit glutamate spillover and peri/extrasynaptic activation of NMDA receptors. *Glia.* 2017;65(2):401-415. doi:10.1002/glia.23099
178. Zhu X, Ye G, Wang Z, Luo J, Hao X. Sub-anesthetic doses of ketamine exert antidepressant-like effects and upregulate the expression of glutamate transporters in the hippocampus of rats. *Neurosci Lett.* 2017;639:132-137. doi:10.1016/j.neulet.2016.12.070
179. Rose CF, Verkhratsky A, Parpura V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(6):1518-1524. doi:10.1042/BST20130237
180. Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1995;38(1):73-84. doi:10.1002/ana.410380114
181. Bos IWM, Hoogland G, Meine Jansen CF, et al. Increased glutamine synthetase but normal EAAT2 expression in platelets of ALS patients. *Neurochem Int.* 2006;48(4):306-311. doi:10.1016/j.neuint.2005.09.009
182. Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S, Weindl A. Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease—an in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol.*

- 1997;56:440–454.
183. Robelet S, Melon C, Guillet B, Salin P, Kerkerian-Le Goff L. Chronic L-DOPA treatment increases extracellular glutamate levels and GLT1 expression in the basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2004;20(5):1255-1266. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03591.x
 184. Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E. Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56(8):901-911.
 185. Voss CM, Arildsen L, Nissen JD, et al. Glutamate Dehydrogenase Is Important for Ammonia Fixation and Amino Acid Homeostasis in Brain During Hyperammonemia. *Front Neurosci*. 2021;15(June):1-13. doi:10.3389/fnins.2021.646291
 186. Schmitt A, Kugler P. Cellular and regional expression of glutamate dehydrogenase in the rat nervous system: Non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience*. 1999;92(1):293-308. doi:10.1016/S0306-4522(98)00740-4
 187. Rothe F, Brosz M, STORM-MATHISEN J. QUANTITATIVE ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE IN THE RAT CEREBELLAR CORTEX. 1994. 62:1133–1146.
 188. Pardo B, Contreras L, Satrústegui J. De novo Synthesis of Glial Glutamate and Glutamine in Young Mice Requires Aspartate Provided by the Neuronal Mitochondrial Aspartate-Glutamate Carrier Aralar/AGC1. *Front Endocrinol*

- (Lausanne). 2013;4(October 2013). doi:10.3389/fendo.2013.00149
189. Pardo B, Rodrigues TB, Contreras L, et al. Brain glutamine synthesis requires neuronal-born aspartate as amino donor for glial glutamate formation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(1):90-101. doi:10.1038/jcbfm.2010.146
 190. Dadsetan S, Kukolj E, Bak LK, et al. Brain alanine formation as an ammonia-scavenging pathway during hyperammonemia: Effects of glutamine synthetase inhibition in rats and astrocyte-neuron co-cultures. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(8):1235-1241. doi:10.1038/jcbfm.2013.73
 191. McKenna MC, Stridh MH, McNair LF, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. Glutamate oxidation in astrocytes: Roles of glutamate dehydrogenase and aminotransferases. *J Neurosci Res.* 2016;94(12):1561-1571. doi:10.1002/jnr.23908
 192. Zaganas I, Waagepetersen HS, Georgopoulos P, Sonnewald U, Plaitakis A, Schousboe A. Differential expression of glutamate dehydrogenase in cultured neurons and astrocytes from mouse cerebellum and cerebral cortex. *J Neurosci Res.* 2001;66(5):909-913. doi:10.1002/jnr.10058
 193. Dadsetan S, Bak LK, Sørensen M, et al. Inhibition of glutamine synthesis induces glutamate dehydrogenase-dependent ammonia fixation into alanine in co-cultures of astrocytes and neurons. *Neurochem Int.* 2011;59(4):482-488. doi:10.1016/j.neuint.2011.03.008
 194. Bauer DE, Jackson JG, Genda EN, Montoya MM, Yudkoff M, Robinson MB. The glutamate transporter, GLAST, participates in a macromolecular complex that supports glutamate metabolism. *Neurochem Int.* 2012;61(4):566-574.

doi:10.1016/j.neuint.2012.01.013

195. Acosta GB, Fernández MA, Roselló DM, Tomaro ML, Balestrasse K, Lemberg A. Glutamine synthetase activity and glutamate uptake in hippocampus and frontal cortex in portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol*. 2009;15(23):2893-2899. doi:10.3748/wjg.15.2893
196. Eizayaga F, Scorticati C, Prestifilippo JP, et al. Altered blood-brain barrier permeability in rats with prehepatic portal hypertension turns to normal when portal pressure is lowered. *World J Gastroenterol*. 2006;12(9):1367-1372. doi:10.3748/wjg.v12.i9.1367
197. Shim KY, Eom YW, Kim MY, Kang SH, Baik SK. Role of the renin-angiotensin system in hepatic fibrosis and portal hypertension. *Korean J Intern Med*. 2018;33(3):453-461. doi:10.3904/kjim.2017.317
198. Drews HJ, Klein R, Lourhmati A, et al. Losartana improves memory, neurogenesis and cell motility in transgenic alzheimer's mice. *Pharmaceuticals*. 2021;14(2):1-17. doi:10.3390/ph14020166
199. Oliveira JC de, Antonietto CRK, Scalabrini AC, et al. Antioxidant Protective Effects of the Resveratrol on the Cardiac and Vascular Tissues from Renal Hypertensive Rats. *Open J Med Chem*. 2012;02(03):61-71. doi:10.4236/ojmc.2012.23008
200. dos Santos AQ, Nardin P, Funchal C, et al. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Arch Biochem Biophys*. 2006;453(2):161-167. doi:10.1016/j.abb.2006.06.025

201. Kleinkauf-Rocha J, Bobermin LD, Machado P de M, Gonçalves CA, Gottfried C, Quincozes-Santos A. Lipoic acid increases glutamate uptake, glutamine synthetase activity and glutathione content in C6 astrocyte cell line. *Int J Dev Neurosci*. 2013;31(3):165-170. doi:10.1016/j.ijdevneu.2012.12.006
202. Shibata K, Sugawara T, Fujishita K, et al. The astrocyte-targeted therapy by Bushi for the neuropathic pain in mice. *PLoS One*. 2011;6(8). doi:10.1371/journal.pone.0023510
203. Sobrinho CR, Gonçalves CM, Takakura AC, Mulkey DK, Moreira TS. Fluorocitrate-mediated depolarization of astrocytes in the retrotrapezoid nucleus stimulates breathing. *J Neurophysiol*. 2017;118(3):1690-1697. doi:10.1152/jn.00032.2017
204. Accorsi-Mendonça D, Zoccal DB, Bonagamba LGH, Machado BH. Glial cells modulate the synaptic transmission of NTS neurons sending projections to ventral medulla of Wistar rats. *Physiol Rep*. Published online 2013. doi:10.1002/phy2.80
205. Sobrinho C, CM G, AC T, DK M, TS M. Fluorocitrate-mediated depolarization of astrocytes in the retrotrapezoid nucleus stimulates breathing. *J Neurophysiol*. 2017;118:1690-1697.
206. Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, et al. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. 2008;21(1):98-104. doi:10.1038/ajh.2007.12
207. Bergamaschi C, Campos RR, Schor N, Lopes OU. Role of the rostral ventrolateral medulla in maintenance of blood pressure in rats with Goldblatt

- hypertension. *Hypertension*. 1995;26(6 II):1117-1120.
doi:10.1161/01.hyp.26.6.1117
208. Biancardi VC, Campos RR, Stern JE. Altered balance of γ -aminobutyric acidergic and glutamatergic afferent inputs in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of renovascular hypertensive rats. *J Comp Neurol*. 2009;518(5):567-585.
doi:10.1002/cne.22256
209. Zha YP, Wang YK, Deng Y, et al. Exercise training lowers the enhanced tonically active glutamatergic input to the rostral ventrolateral medulla in hypertensive rats. *CNS Neurosci Ther*. 2013;19(4):244-251.
doi:10.1111/cns.12065
210. Isegawa K, Hirooka Y, Katsuki M, Kishi T, Sunagawa K. Angiotensin II type 1 receptor expression in astrocytes is upregulated leading to increased mortality in mice with myocardial infarction-induced heart failure. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. Published online 2014. doi:10.1152/ajpheart.00462.2014
211. Perim RR, Bonagamba LGH, Machado BH. Cardiovascular and respiratory outcome of preconditioned rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol*. 2015;100(9):1008-1017. doi:10.1113/EP085237
212. Oyarce MP, Iturriaga R. Contribution of oxidative stress and inflammation to the neurogenic hypertension induced by intermittent hypoxia. *Front Physiol*. 2018;9(JUL):1-7. doi:10.3389/fphys.2018.00893
213. Olea E, Docio I, Quintero M, et al. Peripheral dopamine 2-receptor antagonist reverses hypertension in a chronic intermittent hypoxia rat model. *Int J Mol Sci*.

- 2020;21(14):1-13. doi:10.3390/ijms21144893
214. Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, et al. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron*. 2003;37(2):275-286. doi:10.1016/S0896-6273(02)01170-4
 215. Hughes EG, Maguire JL, McMinn MT, Scholz RE, Sutherland ML. Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking. *Mol Brain Res*. 2004;124(2):114-123. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.02.021
 216. Ito S, Komatsu K, Tsukamoto K, Kanmatsuse K, Sved AF. Ventrolateral medulla AT1 receptors support blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension*. 2002;40(4):552-559. doi:10.1161/01.HYP.0000033812.99089.92
 217. Wang L, Li CC, Wang GW, Cai JX. The effects of centrally administered fluorocitrate via inhibiting glial cells on working memory in rats. *Sci China, Ser C Life Sci*. 2009;52(8):701-709. doi:10.1007/s11427-009-0101-9
 218. Matsuura T, Kumagai H, Kawai A, et al. Rostral ventrolateral medulla neurons of neonatal Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2002;40(4):560-565. doi:10.1161/01.HYP.0000032043.64223.87
 219. Meeker KD, Meabon JS, Cook DG. Partial Loss of the Glutamate Transporter GLT-1 Alters Brain Akt and Insulin Signaling in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2015;45(2):509-520. doi:10.3233/JAD-142304
 220. Peterson AR, Binder DK. Regulation of Synaptosomal GLT-1 and GLAST

- during Epileptogenesis. *Neuroscience*. 2019;411:185-201.
doi:10.1016/j.neuroscience.2019.05.048
221. Berger U V., Hediger MA. Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*. 2000;421(3):385-399. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(20000605)421:3<385::AID-CNE7>3.0.CO;2-S
 222. Gamrani H, Elgot A, El Hiba O, Fèvre-Montange M. Cellular plasticity in the supraoptic and paraventricular nuclei after prolonged dehydration in the desert rodent *Meriones shawi*: Vasopressin and GFAP immunohistochemical study. *Brain Res*. 2011;1375:85-92. doi:10.1016/j.brainres.2010.10.049
 223. Lavielle M, Aumann G, Anlauf E, Pröls F, Arpin M, Derouiche A. Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(31):12915-12919. doi:10.1073/pnas.1100957108
 224. Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathol*. 1994;4(3):229-237. doi:10.1111/j.1750-3639.1994.tb00838.x
 225. Kurtcuoglu V, Soellinger M, Summers P, Poulikakos D, Boesiger P. Mixing and modes of mass transfer in the third cerebral ventricle: A computational analysis. *J Biomech Eng*. 2007;129(5):695-702. doi:10.1115/1.2768376
 226. Proescholdt MG, Hutto B, Brady LS, Herkenham M. Studies of cerebrospinal fluid flow and penetration into brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of the tracer [¹⁴C]inulin in rat. *Neuroscience*. 1999;95(2):577-592. doi:10.1016/S0306-4522(99)00417-0

227. Westerhout J, Ploeger B, Smeets J, Danhof M, De Lange ECM. Physiologically based pharmacokinetic modeling to investigate regional brain distribution kinetics in rats. *AAPS J*. 2012;14(3):543-553. doi:10.1208/s12248-012-9366-1
228. Davson H. The Cerebro-Spinal Fluid. *Handb Neurochem*. 1969;2:23-48. doi:10.1136/bmj.2.3679.76-c
229. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012;4(147). doi:10.1126/scitranslmed.3003748
230. Szentistvanyi I, Patlak CS, Ellis RA, Cserr HF. Drainage of interstitial fluid from different regions of rat brain. *Am J Physiol Physiol*. 1984;246(6):835–844. doi:doi:10.1152/ajprenal.1984.246.6.f835
231. Blasberg RG, Patlak C, Fenstermacher JD. Intrathecal chemotherapy: brain tissue profiles after ventriculocisternal perfusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 1975;195(1):73-83.
232. Pardridge WM. Drug transport in brain via the cerebrospinal fluid. *Fluids Barriers CNS*. 2011;8(1):7. doi:10.1186/2045-8118-8-7
233. Mak M, Fung L, Strasser JF, Saltzman WM. Distribution of drugs following controlled delivery to the brain interstitium. *J Neurooncol*. 1995;26(2):91-102. doi:10.1007/BF01060215
234. Abbott SBG, Pilowsky PM. Galanin microinjection into rostral ventrolateral medulla of the rat is hypotensive and attenuates sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(4):1019-1027.

doi:10.1152/ajpregu.90885.2008

235. Massieu L, Morales-Villagr  n A, Tapia R. Accumulation of Extracellular Glutamate by Inhibition of Its Uptake Is Not Sufficient for Inducing Neuronal Damage: An In Vivo Microdialysis Study. *J Neurochem*. 1995;64(5):2262-2272. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64052262.x
236. Massieu L, Tapia R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J Neurochem*. 1997;69(3):1151-1160. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.69031151.x
237. Arias C, Arrieta I, Massieu L, Tapia R. Neuronal damage and MAP2 changes induced by the glutamate transport inhibitor dihydrokainate and by kainate in rat hippocampus in vivo. *Exp Brain Res*. 1997;116(3):467-476. doi:10.1007/PL00005774
238. Nishimura RN, Santos D, Fu ST, Dwyer BE. Induction of cell death by L-alpha-amino adipic acid exposure in cultured rat astrocytes: relationship to protein synthesis. *Neurotoxicology*. 2000;21(3):313-320.
239. Garthwaite J, Regan CM. Toxic effects of α -amino adipate on cultured cerebellar cells. *Brain Res*. 1980;194(2):603-607. doi:10.1016/0006-8993(80)91250-0
240. Xu HL, Koenig HM, Ye S, Feinstein DL, Pelligrino DA. Influence of the glia limitans on pial arteriolar relaxation in the rat. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2004;287(1 56-1):331-339. doi:10.1152/ajpheart.00831.2003
241. O'Neill E, Chiara Goisis R, Haverty R, Harkin A. L-alpha-amino adipic acid restricts dopaminergic neurodegeneration and motor deficits in an inflammatory

- model of Parkinson's disease in male rats. *J Neurosci Res.* 2019;97(7):804-816.
doi:10.1002/jnr.24420
242. Olney JW, Ho OL, Rhee V. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res.* 1971;14(1):61-76. doi:10.1007/BF00234911
 243. Xu HL, Mao L, Ye S, Paisansathan C, Vetri F, Pelligrino DA. Astrocytes are a key conduit for upstream signaling of vasodilation during cerebral cortical neuronal activation in vivo. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2008;294(2):622-632. doi:10.1152/ajpheart.00530.2007
 244. Liu X, Zheng H. Leptin-Mediated Sympathoexcitation in Obese Rats: Role for Neuron–Astrocyte Crosstalk in the Arcuate Nucleus. *Front Neurosci.* 2019;13(November):1-12. doi:10.3389/fnins.2019.01217
 245. Perego C, Vanoni C, Bossi M, et al. The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. *J Neurochem.* 2000;75(3):1076-1084. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0751076.x
 246. Susarla BTS, Robinson MB. Internalization and degradation of the glutamate transporter GLT-1 in response to phorbol ester. *Neurochem Int.* 2008;52(4-5):709-722. doi:10.1016/j.neuint.2007.08.020
 247. Susarla BTS, Seal RP, Zelenia O, et al. Differential regulation of GLAST immunoreactivity and activity by protein kinase C: Evidence for modification of amino and carboxyl termini. *J Neurochem.* 2004;91(5):1151-1163.
doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02791.x

248. Vermeiren C, Najimi M, Maloteaux JM, Hermans E. Molecular and functional characterisation of glutamate transporters in rat cortical astrocytes exposed to a defined combination of growth factors during in vitro differentiation. *Neurochem Int.* 2005;46(2):137-147. doi:10.1016/j.neuint.2004.08.004
249. Poulsen CF, Schousboe I, Sarup A, White HS, Schousboe A. Effect of topiramate and dBcAMP on expression of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in astrocytes cultured separately, or together with neurons. *Neurochem Int.* 2006;48(6-7):657-661. doi:10.1016/j.neuint.2006.01.006
250. Lipski J, Wan CK, Bai JZ, Pi R, Li D, Donnelly D. Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience.* 2007;146(2):617-629. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.02.003
251. Beller JA, Gurkoff GG, Berman RF, Lyeth BG. Pharmacological enhancement of glutamate transport reduces excitotoxicity in vitro. *Restor Neurol Neurosci.* 2011;29(5):331-346. doi:10.3233/RNN-2011-603
252. Qian Y, Guan T, Tang X, et al. Astrocytic glutamate transporter-dependent neuroprotection against glutamate toxicity: An in vitro study of maslinic acid. *Eur J Pharmacol.* 2011;651(1-3):59-65. doi:10.1016/j.ejphar.2010.10.095
253. Benediktsson AM, Marrs GS, Tu JC, et al. Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia.* 2012;60(2):175-188. doi:10.1002/glia.21249
254. Ahlemeyer B, Kehr K, Richter E, Hirz M, Baumgart-Vogt E, Herden C. Phenotype, differentiation, and function differ in rat and mouse neocortical astrocytes cultured under the same conditions. *J Neurosci Methods.*

- 2013;212(1):156-164. doi:10.1016/j.jneumeth.2012.09.016
255. Cruz JC, LOPES MM, Elias L, Antunes-Rodrigues J. Angiotensin II change glutamate uptake and GFAP expression in astrocyte culture from hypothalamus. *Faseb J.* 2013;27:694.
 256. Piao C, Ranaivo HR, Rusie A, Wadhwani N, Koh S, Wainwright MS. Thrombin decreases expression of the glutamate transporter GLAST and inhibits glutamate uptake in primary cortical astrocytes via the Rho kinase pathway. *Exp Neurol.* 2015;273:288-300. doi:10.1016/j.expneurol.2015.09.009
 257. Ruginsk S, Vechiato F, Elias L, Antunes-Rodrigues J, Cruz JC. Angiotensin II Reduces mRNA Expression for Glutamate Transporters and Glutamine Synthetase in Cultured Hypothalamic Astrocytes. *Faseb Journal* RUGINSK, S *al Angiotensin II Reduces mRNA Expr Glutamate Transp Glutamine Synth Cult Hypothal Astrocytes Faseb Journal*, v 29, n Suppl 96819, 2015. 2015;29(Supplement 968.19).
 258. Al Awabdh S, Gupta-Agarwal S, Sheehan DF, et al. Neuronal activity mediated regulation of glutamate transporter GLT-1 surface diffusion in rat astrocytes in dissociated and slice cultures. *Glia.* 2016;64(7):1252-1264. doi:10.1002/glia.22997
 259. Armbruster M, Hanson E, Dulla CG. Glutamate clearance is locally modulated by presynaptic neuronal activity in the cerebral cortex. *J Neurosci.* 2016;36(40):10404-10415. doi:10.1523/JNEUROSCI.2066-16.2016
 260. Shu Q, Zhang J, Ma W, Lei Y, Zhou D. Orexin-A promotes Glu uptake by OX1R/PKC α /ERK1/2/GLT-1 pathway in astrocytes and protects co-cultured

- astrocytes and neurons against apoptosis in anoxia/hypoglycemic injury in vitro. *Mol Cell Biochem.* 2017;425(1-2):103-112. doi:10.1007/s11010-016-2866-z
261. Kurita M, Matsuoka Y, Nakatsuka K, et al. Norepinephrine-induced downregulation of GLT-1 mRNA in rat astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;504(1):103-108. doi:10.1016/j.bbrc.2018.08.137
 262. Yao L, Grand T, Hanson J, Paoletti P, Zhou Q. Higher ambient synaptic glutamate at inhibitory versus excitatory neurons differentially impacts NMDA receptor activity. *Nat Commun.* 2018;9(1):1-13. doi:10.1038/s41467-018-06512-7
 263. Stanimirovic DB, Ball R, Small DL, Muruganandam A. Developmental regulation of glutamate transporters and glutamine synthetase activity in astrocyte cultures differentiated in vitro. *Int J Dev Neurosci.* 1999;17(3):173-184. doi:10.1016/S0736-5748(99)00028-3
 264. Gegelashvili G, Danbolt NC, Schousboe A. Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *J Neurochem.* 1997;69(6):2612-2615. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.69062612.x
 265. Smith K. Settling the great glia debate. *Nature.* 2010;468(7321):160-162.
 266. Thrane AS, Thrane VR, Zeppenfeld D, et al. General anesthesia selectively disrupts astrocyte calcium signaling in the awake mouse cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(46):18974-18979. doi:10.1073/pnas.1209448109
 267. Oliveira-Sales EB, Colombari D, Davisson RL, et al. Kidney-induced

- hypertension depends on superoxide signaling in the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension*. 2010;56(2):290-296.
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150425
268. Bergamaschi C, Campos J, Schor N, Lopes OU. Importance of rostral ventrolateral medulla in rats with Goldblatt hypertension. *Fundam Clin Pharmacol*. 1997;11(SUPPL. 1):92-93. doi:10.1111/j.1472-8206.1997.tb00885.x
 269. Leimbach WN, Wallin BG, Victor RG, Aylward PE, Sundlöf G, Mark AL. Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patients with heart failure. *Circulation*. 1986;73(5):913-919.
doi:10.1161/01.CIR.73.5.913
 270. Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Johns JA, Korner PI. Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: Evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation*. 1986;73(4):615-621. doi:10.1161/01.CIR.73.4.615
 271. Kaye AH, Laws ER. Historical Perspective. *Brain Tumors*. Published online 2012;1-5. doi:10.1016/B978-0-443-06967-3.00001-6
 272. Almeida OP, Garrido GJ, Beer C, Lautenschlager NT, Arnolda L, Flicker L. Cognitive and brain changes associated with ischaemic heart disease and heart failure. *Eur Heart J*. 2012;33(14):1769-1776. doi:10.1093/eurheartj/ehr467
 273. Woo MA, Ogren JA, Abouzeid CM, et al. Regional hippocampal damage in heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2015;17(5):494-500. doi:10.1002/ejhf.241
 274. Suzuki H, Matsumoto Y, Ota H, et al. Hippocampal blood flow abnormality

- associated with depressive symptoms and cognitive impairment in patients with chronic heart failure. *Circ J*. 2016;80(8):1773-1780. doi:10.1253/circj.CJ-16-0367
275. Woo MA, Macey PM, Fonarow GC, Hamilton MA, Harper RM. Regional brain gray matter loss in heart failure. *J Appl Physiol*. 2003;95(2):677-684. doi:10.1152/japplphysiol.00101.2003
276. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 5th Edition*.; 2004. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
277. Wang WZ, Gao L, Wang HJ, Zucker IH, Wang W. Tonic glutamatergic input in the rostral ventrolateral medulla is increased in rats with chronic heart failure. *Hypertension*. 2009;53(2):370-374. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.122598
278. Xu B, Li H. Brain mechanisms of sympathetic activation in heart failure: Roles of the renin-angiotensin system, nitric oxide and pro-inflammatory cytokines (Review). *Mol Med Rep*. Published online 2015. doi:10.3892/mmr.2015.4434
279. Uwechue NM, Marx MC, Chevy Q, Billups B. Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. *J Physiol*. Published online 2012. doi:10.1113/jphysiol.2011.226605
280. Lehmann C, Bette S, Engele J. High extracellular glutamate modulates expression of glutamate transporters and glutamine synthetase in cultured astrocytes. *Brain Res*. 2009;1297:1-8. doi:10.1016/j.brainres.2009.08.070

TABLE 1| Hemodynamic and morphological data from SHAM and chronic heart failure (CHF) rats.

	Sham (n=6-7)	CHF (n= 6)	<i>P value</i>
BW (g)	491 ± 10	556 ± 21*	0.01
HW (mg)	1904 ± 70.6	2313 ± 157*	0.02
CWI (mg/g)	3.7 ± 0.05	4.2 ± 0.2*	0.04
Infarct size (%LV)	-	41 ± 3	<0.0001
% Lung H2O	136 ± 8.2	210 ± 30.7*	0.04
Ejection fraction (%)	60.4 ± 3.7	41.1 ± 2.3*	0.0009
Fractional shortenning (%)	33.9 ± 2.8	21.5 ± 1.4*	0.001
LVID;s (mm)	5.5 ± 0.2	8.7 ± 0.4*	0.0001
LVID;d (mm)	8.3 ± 0.3	11.2 ± 0.5*	0.001
MAP (mmHg)	115.9 ± 6.4	110.1 ± 7.4	0.57
HR (beats./min)	491.3 ± 15.4	346.6 ± 60*	0.04
Flow (mmHg/min)	14.1 ± 2.2	6.9 ± 1.1*	0.03
Volume (mmHg)	89.8 ± 13.1	48.9 ± 9.7*	0.03

Data are means ± SE. BW: body weight; HW: heart weight; CWI: cardiac weight index; LVID;s:Left ventricle internal diameter systole; LVID;d:Left ventricle internal diameter diastole; MAP: mean arterial pressure; HR: heart rate. * $P < 0.05$ vs. sham group;

FIGURE 1| Cardiac fibrosis, Echocardiographic parameters and altered astrocytic markers expression into NTS, RVLM, SFO and PVN nuclei. A) Histological sections (*picrosirius red*, 4 and 20x) through the midwall of the left ventricle: A noninfarcted ventricle from SHAM (up) and 40% of left ventricle infarction (between broken lines) from a CHF representative rat [(bottom) Note thinning of the infarcted wall and the fibrous tissue]. **B)** Echocardiographic assessment of left ventricular function: Movement-mode short-axis view in SHAM (up) and CHF (bottom) rats (Note the dilated left ventricle internal diameter systolic and diastolic - LVID,sds - in CHF rats). Astrocytic markers expression into: **C)** NTS (up, left), **D)** RVLM (up, right), **E)** SFO (bottom, left), and **F)** PVN (bottom, right) areas. GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLT1: glutamate transporter-1; GLAST: Glutamate aspartate transporter; GS: glutamine synthetase. Values were expressed as means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs. SHAM group. One-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls with post hoc comparisons. AW: anterior wall; PW: posterior wall; LVID,s/d. The sample size (n) is indicated inside the columns.

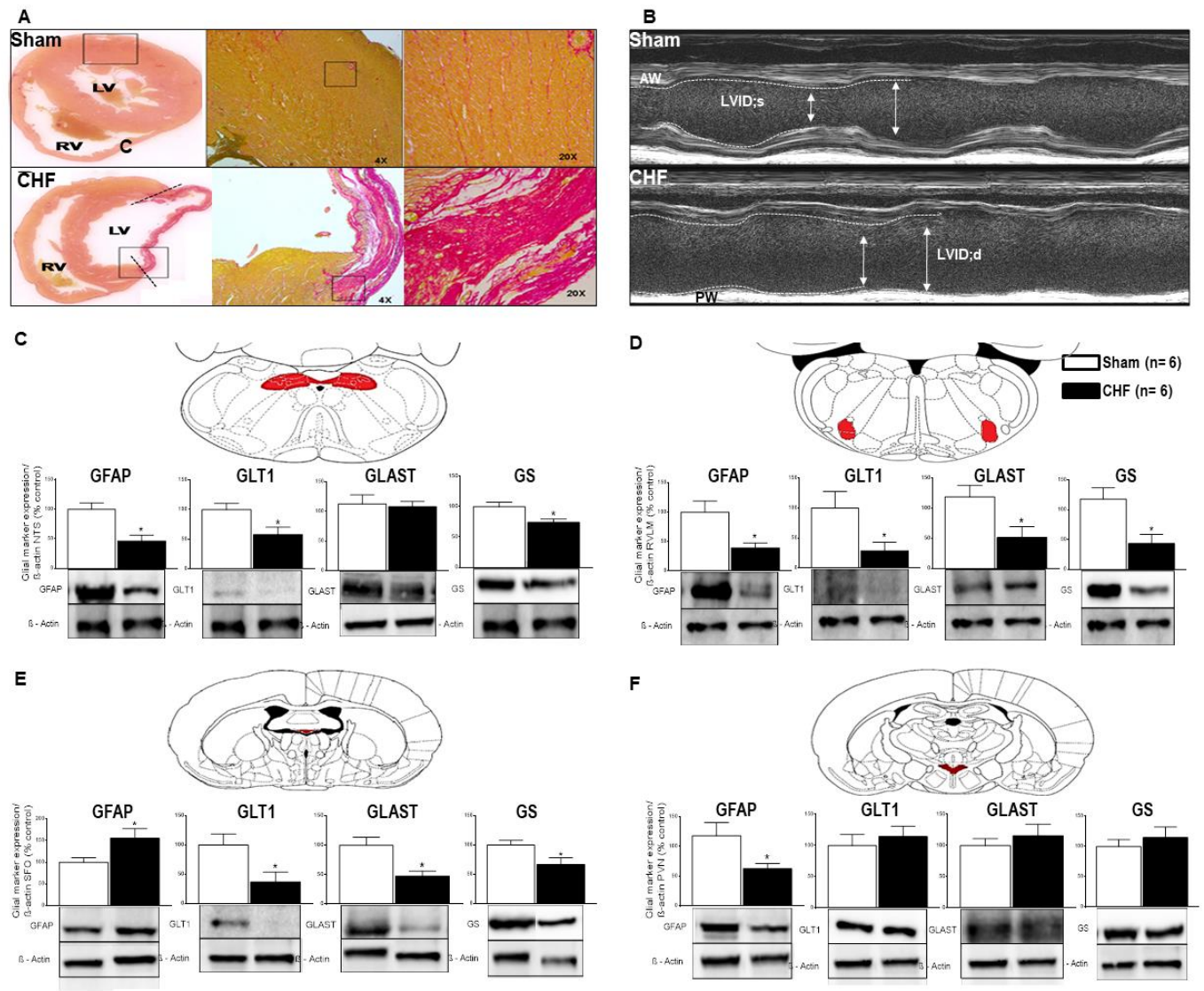


FIGURE 1

Anexo B|

Artigo publicado não relacionado à tese