

# **EMERSON FERNANDES DE SOUSA E CASTRO**

## **Avaliação dos efeitos da variabilidade da pressão arterial sistêmica sobre a pressão de perfusão ocular e suas repercussões sobre o estresse oxidativo em retinas de ratos normotensos e hipertensos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de: Cardiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen

São Paulo

2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Castro, Emerson Fernandes de Sousa e

Avaliação dos efeitos da variabilidade da pressão arterial sistêmica sobre a pressão de perfusão ocular e suas repercussões sobre o estresse oxidativo em retinas de ratos normotensos e hipertensos/ Emerson Fernandes de Sousa e Castro. --São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cardiologia.

Orientadora: Maria Claudia Costa Irigoyen.

Descritores:1.Hipertensão 2.Barorreflexo 3.Retina 4.Denervação autônoma  
5.Estresse oxidativo 6.Pressão intraocular 7.Receptor 1 de fatores de crescimento do  
endotélio vascular 8.Glaucoma

USP/FM/DBD-192/14

## **Agradecimientos**

---

*Pai e mãe, grandes incentivadores, minhas “bússolas”, responsáveis pelos meus valores!*

*Meus irmãos, incentivadores nos momentos difíceis.*

*Minha esposa, braço direito e querida organizadora da minha vida.*

*Meus filhos, que dão sentido a tudo isso.*

*Minha família que proporciona grandes alegrias na minha vida  
A minha orientadora, Profa Maria Cláudia Irigoyen, pessoa que consegue aglutinar raríssimas virtudes: generosa, capacidade de trabalho, acolhedora, grande conhecedora das relações humanas e conciliadora. Agradeço por me acolher e abrir uma nova fronteira na minha vida, despertando a paixão pela pesquisa científica!*

*Agradeço Fernando Santos, Ivana Moraes, Pamella Ramona e Cristiano Mostarda, mentes brilhantes e generosas.*

*Querida Isabel Lameirinhas, grande organizadora do laboratório, muito obrigado.*

*Bruno Rodrigues e Katia de Angelis, “peças” de altíssima qualidade que auxiliam esta brilhante equipe.*

*Edson Dias Moreira, grande cirurgião e tradição na experimentação.  
Leandro de Souza e Maicon Silva, cirurgiões e seres humanos de rara qualidade.*

*Agradeço Marcio Chaves, ser humano ímpar e profissional de rara competência.*

*Grande Roberto Nascimento! “Coroné”... Muito obrigado. Você abriu a porta!*

*Profa. Kamila C Silva da Unicamp, obrigado por sua generosidade e dicas fundamentais.*

*Aos meus queridos companheiros do Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor, que direta ou indiretamente participaram deste trabalho: Cesar Cavinato, Ademir Nascimento, Silvia Beatriz Cavasin de Souza, Jacqueline Machi, Michelle Sartori, Janaina Ferreira, Naomi Ferreira, Paula Cruz, Diego Figueroa, Alexandre Arnold, Oscar Albuquerque, Cintia Taniguti, Raquel Mateus, Nathalia, Daniela Farah. Agradeço Profa Susana Llesuy da Universidade de Buenos Aires, pela grande contribuição e ensinamentos em estresse oxidativo.*

*Aos meus mestres da oftalmologia, muito obrigado.*

*Equipe da secretaria de Pós-graduação do InCor, Juliana Lattari Sobrinho Pagni, Tatiane Lago dos Santos, Nathalia Dal Arosa Barbosa e Evinha (aposentou!), sob a tutela da coordenadora Neusa Rodrigues Dini, muito obrigado pela competência, organização e carinho!*

*Sincero agradecimento à Comissão de Pós-graduação do InCor que, ao acolher um médico oftalmologista (“forasteiro”), permitiu de maneira muito moderna, haver diversidade no quadro de pós graduandos.*

*Aos meus queridos pacientes e os doentes, motivo principal deste árduo trabalho.*

*Obrigado DEUS.*

*Apoio Financeiro*

*Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor da Faculdade  
de Medicina da USP.*

*“Não deixe que ninguém tire sua esperança”*

*Papa Francisco*

**Normatização adotada**



Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com Lista of Journals Indexed in Index Medicus.

## **Sumário**

---

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS****LISTA DE FIGURAS****RESUMO****SUMMARY**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1	Hipertensão arterial sistêmica e alterações na regulação da pressão arterial.....	02
1.2	Hipertensão arterial e doenças oculares.....	06
1.3	Hipertensão arterial e pressão de perfusão ocular.....	07
1.4	Retina.....	11
1.4.1	Retinopatias.....	13
1.4.2	Sistema renina-angiotensina.....	15
1.4.3	Sistema renina-angiotensina nos tecidos oculares.....	17
1.4.4	Retina e VEGF.....	19
1.5	Estresse oxidativo.....	20
1.5.1	Radicais livres.....	20
1.5.2	Espécies reativas.....	21
1.5.3	Sistema antioxidante.....	22
1.5.4	Retina e estresse oxidativo.....	24
1.5.5	Retina e apoptose.....	26
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>32</b>
3.1	Objetivo geral.....	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1	Animais e grupos.....	35
4.2	Desenho experimental.....	37
4.3	Desnervação sinoaórtica.....	38
4.4	Avaliações hemodinâmicas sistêmicas.....	40
4.4.1	Canulação.....	40
4.4.2	Registro da pressão arterial.....	41
4.4.3	Análise da variabilidade da pressão arterial e da frequência cardíaca esquerda.....	42

---

4.5	Medidas da pressão intraocular.....	43
4.6	Medida da pressão de perfusão ocular.....	44
4.7	Analgesia.....	45
4.8	Eutanásia.....	45
4.9	Avaliações imunohistoquímicas.....	45
4.9.1	Preparação dos globos oculares para análise imunohistoquímica.....	45
4.9.2	Imunohistoquímica para quantificação de 8-OHdG na retina..	46
4.9.3	Imunohistoquímica para quantificação de Nitrotirosina na retina.....	47
4.9.4	Imunohistoquímica para quantificação de receptores tipo AT1 da Angiotensina II na retina.....	48
4.9.5	Imunohistoquímica para quantificação de Caspase-3 na retina.....	50
4.9.6	Imunohistoquímica para quantificação de VEGF na retina.....	52
4.10	Análise Estatística.....	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
5.1	Pressão arterial sistólica.....	56
5.2	Intervalo de pulso (IP).....	56
5.3	Sensibilidade barorreflexa.....	57
5.4	Variância da pressão arterial no domínio do tempo e da frequência (Análise espectral FFT).....	58
5.5	Pressão intraocular (PIO).....	60
5.6	Pressão de perfusão ocular (PPO).....	61
5.7	Aspectos Morfológicos e Histológicos.....	62
5.7.1	Imunohistoquímica para detecção de 8-OHdG na retina.....	62
5.7.2	Imunohistoquímica para imunolocalização do receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1) na retina.....	64
5.7.3	Imunohistoquímica para detecção de Nitrotirosina na retina..	66
5.7.4	Imunohistoquímica para detecção de Caspase-3 na retina	68
5.7.5	Imunohistoquímica para detecção de VEGF na retina.....	70
5.8	Correlações entre variáveis.....	72
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
6.1	Avaliações Hemodinâmicas e Autonômicas.....	79

6.2	Avaliações da pressão de perfusão ocular e pressão intraocular.....	82
6.3	Sistema renina – angiotensina.....	85
6.4	Estresse oxidativo retiniano (dano oxidativo).....	88
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>95</b>

**Listas**

---

<b>ANOVA</b>	análise de variância
<b>Ang II</b>	angiotenina 2
<b>AT1</b>	receptor tecidual tipo 1 da angiotensina II
<b>AT2</b>	receptor tecidual tipo 2 da angiotensina II
<b>DSA</b>	desnervação sino-aórtica
<b>DM</b>	diabetes melitus
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>ECA1</b>	enzima conversora da angiotensina 1
<b>ECA II</b>	enzima conversora da angiotensina 2
<b>ERO</b>	espécie reativa de oxigênio
<b>EPM</b>	erro padrão da média
<b>FC</b>	frequência cardíaca
<b>FFT</b>	<i>fast Fourier transformer</i> (transformada rápida de Fourier)
<b>H</b>	hipertenso (grupo experimental)
<b>HAS</b>	hipertensão arterial sistêmica
<b>HD</b>	hipertenso desnervado (grupo experimental)
<b>HF</b>	<i>high frequency</i> (alta frequência)
<b>IP</b>	intervalo de pulso
<b>LF</b>	<i>low frequency</i> (baixa frequência)
<b>N</b>	normotenso (grupo experimental)
<b>ND</b>	normotenso desnervado (grupo experimental)
<b>8-OHdG</b>	8-hidroxideoxiguanosina
<b>OMS</b>	organização mundial da saúde
<b>PA</b>	pressão arterial

<b>PAD</b>	pressão arterial diastólica
<b>PAM</b>	pressão arterial média
<b>PAS</b>	pressão arterial sistólica
<b>PIO</b>	pressão intraocular
<b>PPO</b>	pressão de perfusão ocular
<b>RE</b>	retículo endoplasmático
<b>RD</b>	retinopatia diabética
<b>SHR</b>	<i>spontaneous hypertensive rat</i> (rato espontaneamente hipertenso)
<b>SNC</b>	sistema nervoso central
<b>SRA</b>	sistema renina-angiotensina
<b>UPR</b>	<i>unfolded protein response</i> (resposta a proteínas não dobradas)
<b>VAR PAS</b>	variância da pressão arterial sistêmica
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento endotelial vascular)
<b>VPA</b>	variabilidade da pressão arterial



---

<b>Figura 1</b>	Corte de retina de rato corada com hematoxilina-eosina. Camadas da retina.....	13
<b>Figura 2</b>	Esquematização resumida do sistema renina-angiotensina.....	17
<b>Figura 3</b>	Vias de apoptose.....	29
<b>Figura 4</b>	Desenho Experimental.....	37
<b>Figura 5</b>	A) Visão ventral do animal com incisão expondo a musculatura do pescoço; B) Visão do feixe vásculo-nervoso após afastamento da musculatura do pescoço. (Desenho S. Lacchini).....	39
<b>Figura 6</b>	Inervação da região da bifurcação da carótida. A) Localização do nervo laríngeo superior; B) Detalhe da inervação do corpo carotídeo e dos pressoreceptores carotídeos. (Desenho S. Lacchini).....	39
<b>Figura 7</b>	Esquema do sistema de registro de pressão arterial. (Desenho: S. Lacchini modificado).....	42
<b>Figura 8</b>	Pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. $\text{¥}$ $p < 0,05$ vs N, $\text{‡}$ $p < 0,05$ vs ND, $\text{¤}$ $p < 0,05$ vs H.....	56
<b>Figura 9</b>	Intervalo de Pulso (IP) dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. $\text{¥}$ $p < 0,05$ vs N, $\text{¤}$ $p < 0,05$ vs H.....	57
<b>Figura 10</b>	Sensibilidade barorreflexa (alfa índice) dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. $\text{¥}$ $p < 0,05$ vs N.....	58
<b>Figura 11</b>	Variância da PAS dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. $\text{¥}$ $p < 0,05$ vs N, $\text{‡}$ $p < 0,05$ vs ND.....	59

- Figura 12** Índice de baixa frequência da PAS (LF PAS) dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni.  $\text{¥}$   $p < 0,05$  vs N,  $\text{‡}$   $p < 0,05$  vs ND..... 60
- Figura 13** Pressão intraocular dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni.  $\text{¥}$   $p < 0,05$  vs N,  $\text{‡}$   $p < 0,05$  vs ND,  $\text{¤}$   $p < 0,05$  vs H..... 61
- Figura 14** Pressão de perfusão (em mmHg) dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni.  $\text{¥}$   $p < 0,05$  vs N,  $\text{‡}$   $p < 0,05$  vs ND,  $\text{¤}$   $p < 0,05$  vs H..... 62
- Figura 15** A) Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica para quantificação tecidual de 8-OHdG retiniano do grupo crônico nos animais Normotensos (N), Normotensos desnervados (ND), Hipertensos (H), Hipertensos desnervados (HD) e Controles negativos (CTR-). A presença de 8-OHdG apresenta tonalidade marrom escuro. B) Porcentagem de área com 8-OHdG na retina dos grupos Normotenso, Normotenso desnervado, Hipertenso e Hipertenso desnervado. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni.  $\text{¥}$   $p < 0,05$  vs N,  $\text{¤}$   $p < 0,05$  vs H..... 63
- Figura 16** A) Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica para quantificação de receptores AT1 da AngII retiniana do grupo crônico nos animais Normotensos (N), Normotensos desnervados (ND), Hipertensos (H), Hipertensos desnervados (HD) e Controles negativos (CTR-). A presença de receptores AT1 apresenta tonalidade marrom escuro. B) Porcentagem de área com receptores AT1 na retina dos grupos Normotenso, Normotenso desnervado, Hipertenso e Hipertenso desnervado. Os

	resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. $\text{¥}$ $p < 0,05$ vs N, $\text{‡}$ $p < 0,05$ vs ND.....	65
<b>Figura 17</b>	A) Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica para quantificação de nitrotirosina retiniana do grupo crônico nos animais Normotensos (N), Normotensos desnervados (ND), Hipertensos (H), Hipertensos desnervados (HD) e Controles negativos (CTR-). A presença de nitrotirosina apresenta tonalidade marrom escuro.....	67
<b>Figura 18</b>	A) Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica para quantificação de Caspase-3 retiniana do grupo crônico nos animais Normotensos (N), Normotensos desnervados (ND), Hipertensos (H), Hipertensos desnervados (HD) e Controles negativos (CTR-). A presença de Caspase-3 apresenta tonalidade marrom escuro.....	69
<b>Figura 19</b>	A) Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica para quantificação de VEGF retiniano do grupo crônico nos animais Normotensos (N), Normotensos desnervados (ND), Hipertensos (H), Hipertensos desnervados (HD) e Controles negativos (CTR-). A presença de VEGF apresenta tonalidade marrom escuro.....	71
<b>Figura 20</b>	Correlação entre porcentagem de área de VEGF e pressão intraocular em normotensos desnervados.....	72
<b>Figura 21</b>	Correlação entre porcentagem de área de VEGF e LF da pressão em normotensos desnervados.....	73
<b>Figura 22</b>	Correlação entre pressão intraocular e LF da pressão em normotensos desnervados.....	73
<b>Figura 23</b>	Correlação entre porcentagem de área de VEGF e porcentagem de área de 8OH em hipertensos desnervados.....	74
<b>Figura 24</b>	Correlação entre pressão de perfusão ocular e porcentagem de área de VEGF em hipertensos desnervados.....	75
<b>Figura 25</b>	Correlação entre pressão intraocular e porcentagem de área de 8OH em hipertensos desnervados.....	76

**Resumo**

---

Castro, EFS. Avaliação dos efeitos da variabilidade da pressão arterial sistêmica sobre a pressão de perfusão ocular e suas repercussões sobre o estresse oxidativo de ratos normotensos e hipertensos. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

**Introdução:** A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença que pode determinar lesões em diversos órgãos inclusive nos olhos. As doenças vasculares oculares constituem a grande maioria das causas de cegueira na atualidade e a HAS tem contribuição importante nesta estatística. A variabilidade da pressão arterial tem sido implicada na gênese de uma série de lesões de órgãos-alvo. Na tentativa de compreender melhor a patogênese das doenças vasculares oculares testamos a hipótese de que não apenas os efeitos da HAS, mas também a variabilidade da pressão arterial (PA) poderia determinar lesão de órgão-alvo (ocular).

**Materiais e Métodos:** A desnervação sino-aórtica (DSA), um modelo experimental de aumento da variabilidade da pressão arterial foi utilizado nos experimentos. Foram obtidas medidas da pressão intraocular e a partir destas medidas, a pressão de perfusão ocular. Foram analisados marcadores de estresse oxidativo (8-OHdG e nitrotirosina), VEGF e receptores AT1 na retina de animais normotensos e hipertensos com e sem DSA aguda (12 e 24 horas) e crônica (10 semanas).

**Resultados:** Os animais desnervados apresentaram aumento da variabilidade da PA sem modificar a PA basal e redução da sensibilidade do barorreflexo. Houve aumento da modulação simpática vascular e da pressão de perfusão ocular (PPO), nos animais hipertensos, com aumento adicional da PPO nos hipertensos e desnervados crônicos. Observou-se estresse oxidativo retiniano nos animais desnervados agudos e nos hipertensos desnervados crônicos, além do aumento da expressão de receptores AT1 da Angiotensina II nos animais hipertensos. Os níveis de VEGF retinianos dos animais desnervados crônicos, apresentaram comportamento inverso aos níveis de Caspase-3.

**Conclusão:** Tais resultados indicam que só a HAS, mas também a variabilidade da PA podem determinar variações na pressão de perfusão ocular, assim como também podem induzir dano oxidativo às células retinianas. Além disso, pode-se sugerir efeito neuroprotetor retiniano do VEGF.

**Descritores:** 1.Hipertensão 2.Barorreflexo 3.Retina 4.Denervação autônoma 5.Estresse oxidativo 6.Pressão intraocular 7.Receptor 1 de fatores de crescimento do endotélio vascular 8.Glaucoma

**Abstract**

---

Castro, EFS. Assessment of the effects of the variability of blood pressure on the ocular perfusion pressure and its effects on oxidative stress in normotensive and hypertensive rats. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

**Introduction:** High blood pressure (HBP) is a disease that can determine lesions in many organs including the eyes. The ocular vascular diseases constitute the vast majority of causes of blindness and hypertension has important contribution in this statistic. Blood pressure variability has been implicated in the genesis of a series of end-organ damage. In an attempt to better understand the pathogenesis of ocular vascular diseases, we hypothesized that not only the effects of hypertension, but also the variability of blood pressure (BPV) could determine target end-organ damage (ocular). **Materials and Methods:** Sino-aortic denervation (SAD), an experimental model of increased blood pressure variability was used in the experiments. The intraocular pressure measurements were performed and from these measurements the ocular perfusion pressure was estimated. Oxidative stress markers (8-OHdG and nitrotyrosine), VEGF and AT1 receptor in rat retinas were analyzed in acute and chronic hypertensive and normotensive SAD rats and in controls.

**Results:** Denervated animals showed increased BP variability without altering the basal BP, while presenting reduced baroreflex sensitivity. There was an increase in sympathetic vascular modulation and in OPP, in hypertensive animals, that was additionally in chronic denervated hypertensive animals. Acute denervated and chronic hypertensive denervated animals showed retinal oxidative stress as well as hypertensive animals presented increased expression of AT1 receptors of angiotensin II. The levels of retinal VEGF of chronically denervated animals showed inverse behavior of levels of Caspase-3. **Conclusion:** These results suggest that, apart from the arterial hypertension, BP variability not only determines changes in ocular perfusion pressure, but also induces oxidative damage to retinal cells. Furthermore, one can suggest retinal neuroprotective effect of VEGF.

**Descriptors:** 1. Hypertension 2. Baroreflex 3. Retina 4. Autonomic denervation 5. Oxidative stress 6. Intraocular pressure 7. VEGF 8. Glaucoma

# **1. Introdução**

---



## **1.1 Hipertensão arterial sistêmica e alterações na regulação da pressão arterial**

A hipertensão arterial é um dos maiores fatores de risco para as doenças cardiovasculares (Kannel, 1993, 2000), aumentando significativamente a incidência de lesões em órgãos-alvo como coração, rins e olhos. De fato, a manutenção (componente tônico), bem como a variação momento a momento da PA (componente fásico) dependem de mecanismos complexos e redundantes que determinam ajustes apropriados da frequência e contratilidade cardíaca, do estado contrátil dos vasos de resistência e de capacitância e da distribuição de fluido dentro e fora dos vasos (Michelini, 1999; Kaplan, 1998).

O controle neural da circulação é fundamental para a regulação da PA a curto e longo prazo (Cowley, 1992). Parte deste controle é realizado por alças de retroalimentação que modulam a atividade nervosa simpática e parassimpática, das quais os pressorreceptores arteriais (ou barorreceptores) são os elementos mais importantes (Michelini, 1999; Franchini, 2003). Os barorreceptores são mecanorreceptores sensíveis às deformações da parede vascular. Estes mecanorreceptores estão localizados principalmente no arco da aorta e no seio carotídeo e devido ao seu alto ganho, constituem-se na forma mais importante de controle da pressão arterial em curto prazo, ou seja, momento a momento (Franchini e Krieger, 1995). Além do controle reflexo da atividade autonômica, os pressorreceptores também exercem controle tônico sobre a atividade simpática (inibição) e parassimpática (estimulação). Assim o comprometimento da função dos pressorreceptores poderia atuar como

elemento permissivo ao estabelecimento de alterações primárias de outros mecanismos de controle da função cardiovascular, por não modular a atividade simpática e parassimpática adequadamente (Irigoyen et al., 1995).

Os receptores cardiopulmonares também compõem um mecanismo importante na regulação em curto prazo da PA. Os receptores cardiopulmonares estão distribuídos nas estruturas cardiovasculares, como grandes vasos (veias cava e pulmonares), átrios e pericárdio e sua principal função é a manutenção dos níveis de volume sanguíneo (Michelini, 1999).

Embora os receptores arteriais sejam capazes de se adaptar aguda e cronicamente a altos níveis de PA (Krieger, 1989), a disfunção barorreflexa tem sido documentada na hipertensão arterial e em outras doenças cardiovasculares em estudos clínicos e experimentais (Irigoyen e Krieger, 1998; Zanchetti e Mancia, 1991). Da mesma forma, estudos de Consolim-Colombo e colaboradores, (2000), Lacerda et al. (2007) e Silva et al. (1997) mostraram prejuízo do reflexo cardiopulmonar respectivamente na doença de Chagas, no infarto do miocárdio e na hipertensão espontânea em ratos.

A disfunção barorreflexa tem sido demonstrada em várias doenças (La Rovere et al., 1998; Dall'Ago et al., 1997; Harthmann et al, 2007) e na hipertensão clínica e experimental (Irigoyen e Krieger, 1998; Mancia et al., 1997). Dessa forma, intervenções no sentido de melhorar a sensibilidade do barorreflexo e/ou a participação do parassimpático cardíaco no controle da PA e da FC têm sido vistas como novas estratégias no manejo das doenças cardiovasculares.

Um considerável número de evidências dá suporte ao aumento da atividade simpática precocemente na hipertensão (De Quattro e Feng, 2002;

Irigoyen et al., 2001). Uma das possibilidades para tal aumento seria a redução da eficiência do barorreflexo. Embora muitos reflexos estejam envolvidos na modulação da atividade simpática, o reflexo comandado pelos pressorreceptores arteriais (alta pressão), ao perder eficiência, poderia reduzir a inibição tônica que exerce sobre a atividade simpática e com isso aumentá-la para a periferia.

Além disso, a menor sensibilidade dos barorreceptores, que normalmente acompanha a hipertensão (Krieger, 1984), é provavelmente o maior determinante do aumento da variabilidade da PA (VPA) (Irigoyen e Krieger, 1998; Floras et al., 1988) a qual, tem sido associada às lesões dos órgãos-alvo em indivíduos hipertensos (Floras et al., 1988).

Dessa forma, o reflexo comandado pelos pressorreceptores, embora reconhecido como o mais importante controlador da PA momento a momento, parece ter também um papel homeostático em longo prazo como modulador da atividade parassimpática e simpática sobre coração e vasos nas diferentes disfunções dos sistemas cardiovascular e/ou cardiorrenal.

A importância dos barorreceptores sobre a regulação da PA pode ser demonstrada pela desnervação sino aórtica (DSA), que consiste na remoção cirúrgica dos aferentes pressorreceptores aórticos e carotídeos, considerados o mais importante mecanismo de controle fásico da PA (Krieger e Michelini, 1992). Experimentalmente, a remoção cirúrgica das aferências aórticas e carotídeas descrita em ratos (Krieger, 1964), demonstrou uma acentuada labilidade da PA, com hipertensão na fase aguda (Werber e cols., 1994) e retorno aos níveis pressóricos normais na fase crônica (Irigoyen et al., 1995). A hiperatividade simpática parece ser o maior determinante do aumento

da pressão arterial após a desnervação sinoaórtica (Alexander et al., 1980; Vasquez e Krieger, 1980), verificada principalmente no coração, rins e vasos de resistência. Várias alterações hemodinâmicas, neurais e bioquímicas (Trapani et al., 1986; Franchini e Krieger, 1995) indicam hiperatividade simpática após deafferentação pressorreceptora. Os ratos com DSA também apresentam taquicardia (Irigoyen et al., 1988) que atinge valores máximos após 5 horas da desnervação. Porém, a taquicardia não é mantida e a frequência cardíaca gradualmente diminui para valores normais em 10 dias (Irigoyen et al., 1995). Na fase crônica (20 dias ou mais), a normalização da PA e da atividade nervosa simpática renal refletem o balanço entre efeitos opostos dos pressoreceptores e quimiorreceptores (Irigoyen et al., 1995).

Outra alteração cardiovascular produzida pela DSA é o aumento VPA, caracterizada pelo aumento do desvio padrão e variância da PA obtidas de registros computadorizados (Trapani et al., 1986). Alterações neuro-humorais (sistema renina-angiotensina e vasopressina) têm sido implicadas na geração e manutenção do aumento da VPA (Franchini e Krieger, 1995). A diminuição da VPA na hipertensão arterial tem sido considerada importante no tratamento desta doença, já que a VPA está associada às complicações decorrentes da hipertensão sobre os órgãos-alvo de maneira mais determinante do que a própria pressão arterial constantemente elevada (Su e Miao, 2005).

Assim, é provável que a liberação do controle tônico inibitório que os barorreceptores exercem sobre a atividade simpática gerada centralmente (Irigoyen et al., 1995) permita seu aumento para a periferia e desencadeie a potenciação das respostas de ajuste de órgãos alvo à hipertensão, como a hipertrofia ventricular esquerda, e outras situações patológicas. Todavia, não

existem dados conclusivos se essas respostas adaptativas dependem do aumento do simpático ou dos aumentos associados da PA, da VPA e da VFC. Além disso, pouco se conhece sobre os efeitos das alterações da variabilidade da PA e/ou da FC sobre a função ou morfologia ocular. Informações nesse sentido poderão contribuir para o melhor entendimento de processos de ajuste associados à redução da sensibilidade do barorreflexo e podem fundamentar a busca de estratégias mais precisas no manejo das disfunções crônicas associadas ao prejuízo desse reflexo.

## **1.2 Hipertensão arterial e doenças oculares**

A hipertensão arterial sistêmica está associada a alterações observáveis na microvasculatura retiniana incluindo retinopatia, coroidopatia e neuropatia óptica, bem como a um risco aumentado de outras doenças vasculares oculares como oclusões de veias e artérias retinianas, formação de macroaneurismas retinianos arteriolares e eventos embólicos. A hipertensão arterial também confere risco de desenvolvimento e progressão de retinopatia diabética, glaucoma e degeneração macular relacionada à idade (Della Croce JT et al., 2008).

A prevalência destas doenças oculares relacionadas à hipertensão arterial é extremamente elevada. Segundo a OMS, a retinopatia diabética, que sofre forte influência dos níveis pressóricos arteriais, determina cerca de 5% do total de casos de cegueira no mundo, aproximadamente 5 milhões de pessoas. O glaucoma, também influenciado pelos níveis pressóricos arteriais,

corresponde a 12% de todos os casos de cegueira no mundo e a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) cerca de 9%.

As oclusões venosas são a segunda causa mais comum de doenças vasculares da retina, atrás apenas da retinopatia diabética (Rosa et al., 2003), sendo o motivo mais comum de perda visual súbita em pacientes hipertensos (Staurenghi et al., 1994).

Rosa et al., 2003 em nosso meio, verificaram associação de 92,8% entre oclusão de veia central da retina e HAS.

O componente vascular tem papel fundamental na fisiologia ocular e a HAS tem influência direta na gênese de doenças oculares vasculares. A variabilidade da pressão arterial tem sido implicada na gênese de lesões de órgãos-alvo. Considerando a extrema importância do tema, desconhecemos qualquer estudo experimental relacionando variabilidade da PA e olho. É de se esperar que a gênese de doenças oculares vasculares se relacione da mesma forma, com a variabilidade da PA.

### **1.3 Hipertensão arterial e pressão de perfusão ocular**

O glaucoma é caracterizado por degeneração progressiva do nervo óptico e é a maior causa de cegueira irreversível no mundo. Mais de 50 milhões de pessoas são afetadas por glaucoma ao redor do mundo (Congdon et al, 2003). Há geralmente de pressão intraocular (PIO) elevada, alterações campimétricas, aumento da escavação e atrofia do disco óptico (Quigley et al, 2010). A pressão intraocular (PIO) ainda é considerada o principal fator de risco para a doença e é o único fator sobre o qual se pode atuar para evitar sua

progressão. Vários estudos multicêntricos sugerem que a PIO não é o único fator envolvido na fisiopatogenia do glaucoma como o Normal Tension Glaucoma Study 1998, Ocular Hypertension Treatment Study 2002, Early Manifest Glaucoma Trial, 2003. Segundo Sommer, 1989 há uma relação de “dose-resposta” entre o fator de risco PIO e a doença, ou seja, quanto maior o nível da pressão, maior o risco de ocorrer glaucoma. Entretanto, os mecanismos que levam à atrofia do nervo óptico permanecem desconhecidos (Moroi et al., 1996).

Existem duas principais teorias relacionadas à patogênese da neuropatia óptica glaucomatosa- uma mecânica e outra vascular (Flammer et al, 2002).. A teoria mecânica enfatiza essencialmente o papel da PIO no processo da doença. Pressões intraoculares elevadas determinariam dano direto aos axônios do nervo óptico e indireto por deformação tecidual. A teoria vascular considera a neuropatia óptica glaucomatosa como consequência do comprometimento do suprimento sanguíneo ocular devido ao aumento da PIO ou disfunção vascular levando a uma instabilidade do suprimento de oxigênio (lesão por isquemia/reperfusão) e consequente estresse oxidativo das células ganglionares retinianas (Flammer et al, 2002).

Trabalhos com doppler colorido demonstraram diminuição do fluxo sanguíneo e aumento da resistência vascular na artéria oftálmica em pacientes com glaucoma em relação a indivíduos normais (Rojanapongpun , 1993 e Butt et al.,1995 ). Assim, a pressão arterial (PA) poderia ter um papel importante no mecanismo de lesão, pois dela depende em parte a perfusão do nervo óptico. Para vários autores, existe uma relação entre o nível da PIO e o nível da PA: para um aumento de 10 mmHg da PA corresponde um aumento

de cerca de 0,2 mmHg da PIO (Bulpitt et al.,1975 e Tielsch et al.,1995). A relação da PA e PIO, do ponto de vista clínico, ainda não foi bem estabelecida. O importante desta relação (entre a PA e a PIO) seria a chamada pressão de perfusão (PAM-PIO). Por definição, a pressão de perfusão de um órgão corresponde à diferença entre a pressão arterial e a pressão venosa deste órgão. No olho, a pressão venosa é grosseiramente igual a PIO, o que permite que calculemos a pressão de perfusão ocular como a diferença entre a pressão arterial e a PIO. Uma redução da pressão de perfusão, tanto por um aumento da PIO como por uma queda da PA, poderia causar dano ao nervo óptico ( Alm et al.,1979 e Tielsch et al.,1995). Este dano poderia ser decorrente do esgotamento da reserva autorregulatória do fluxo sanguíneo do nervo óptico.

Autorregulação do fluxo sanguíneo é definida como a habilidade intrínseca de um órgão em manter o fluxo sanguíneo constante a despeito de mudanças na pressão de perfusão deste órgão. A reserva autorregulatória é determinada pelos limites inferior e superior da autorregulação. Os principais mecanismos de autorregulação do fluxo sanguíneo ocular são:

Neuronal: Em contraste com os vasos retinianos, os vasos da coróide apresentam rica inervação (Cioffi et al., 2003). A inervação simpática da coróide deriva do gânglio cervical superior ipsilateral (Lutjen-Drecoll, 2006). A estimulação simpática reduz o fluxo sanguíneo da coróide em várias espécies (Riva e Schemettere, 2008; Steinle et al.,2002) e a desnervação simpática leva ao aumento do fluxo sanguíneo coroidal em ratos e coelhos (Chou et al.,2000,2002; Steinle et al., 2002).

Metabólico: De acordo com a teoria metabólica da autorregulação, o fluxo sanguíneo é regulado para atender as necessidades metabólicas de um



tecido específico. Gases como o O<sub>2</sub> e o CO<sub>2</sub> têm efeitos significantes no fluxo sanguíneo ocular. Em indivíduos saudáveis, a inalação de monóxido de carbono (CO) aumenta os fluxos sanguíneos da retina e coroide, porém o exato papel do CO na regulação do fluxo sanguíneo ocular permanece desconhecido. (Resch et al., 2005).

**Miogênico:** A resposta miogênica, também chamada de efeito Bayliss, (Bayliss et al., 1902) é caracterizada pelo aumento do diâmetro vascular após aumento da pressão transmural (Schubert e Mulvany, 1999). A maior parte do volume sanguíneo ocular provém da coroide. Kiel, 1994 teoriza que os vasos da coróide podem estabilizar a PIO durante variações da PA, através da autorregulação miogênica.

**Hormonais:** Há evidências que o sistema renina-angiotensina (SRA) faça parte da regulação do fluxo sanguíneo ocular. Em porcos, Angiotensina II tem papel importante na regulação do fluxo sanguíneo ocular (Meyer et al., 1995).

Há evidências que pacientes com glaucoma apresentem autorregulação anormal do fluxo sanguíneo ocular. As razões para este fato permanecem desconhecidas, há evidências que a redução da PIO melhore a autorregulação em pacientes com glaucoma (Schmidl et al., 2010).

Sabe-se que a hipotensão arterial sistêmica pode ser um fator de risco relevante para o desenvolvimento do glaucoma, especialmente o de pressão normal (Kaiser et al., 1991 e Kaiser et al., 1993). Entretanto, assim como a pressão intraocular elevada não determina glaucoma em todos os indivíduos, a pressão arterial baixa também não. Isto pode ser explicado por um melhor ou

pior controle da autorregulação do fluxo sanguíneo ocular (Flammer et al., 2008).

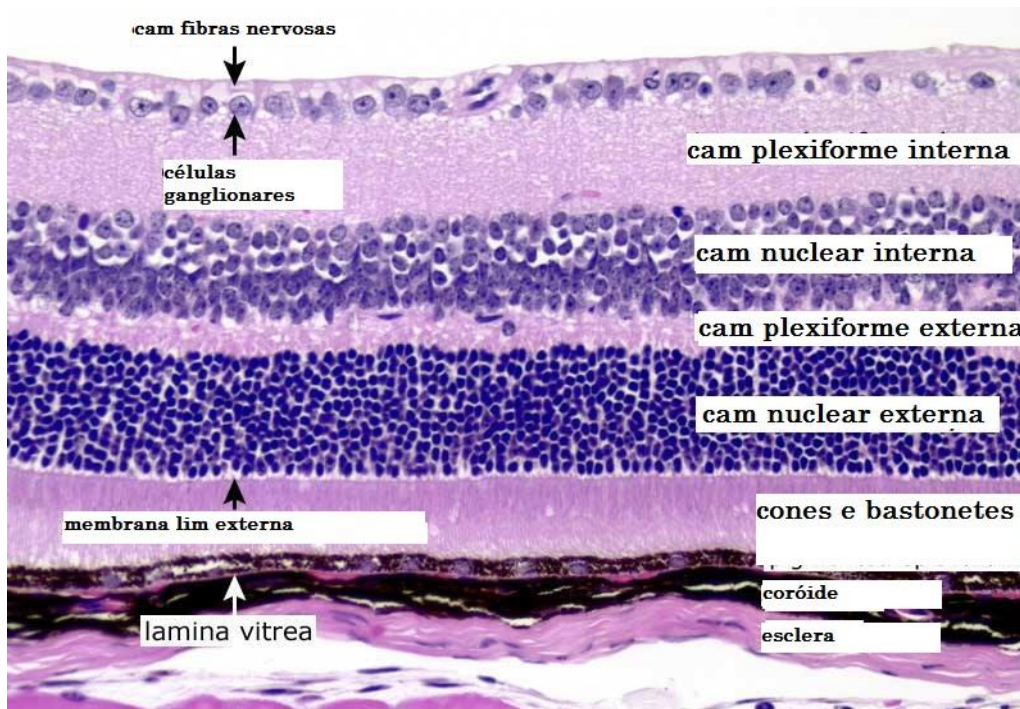
Apesar da correlação existente entre PIO e PA, a relação entre a hipertensão arterial e o glaucoma é controversa, tendo sido observada por alguns autores e contestada por outros. Segundo Tielsch et al. 1995, a hipertensão arterial em sua fase inicial poderia exercer um papel de proteção do nervo óptico por um aumento de perfusão sanguínea. Entretanto, com o comprometimento vascular pela hipertensão crônica, haveria uma diminuição da irrigação do nervo óptico. Em estudos de medida de PA de 24 horas, houve associação entre uso de medicação anti-hipertensiva, hipotensão noturna e piora de campo visual em pacientes com glaucoma (Hayreh, 1994). Apesar dessas informações, poucos são os dados de literatura que relacionam a variabilidade de pressão arterial com as doenças oculares, entre elas o glaucoma, retinopatia hipertensiva e diabética e degeneração macular relacionada à idade.

#### **1.4 Retina**

A retina é considerada parte integrante do sistema nervoso central (SNC) por derivar de vesículas ópticas originárias do diencéfalo (Mey e Thanos, 2000). A retina é composta por 10 camadas: membrana limitante interna; camada de fibras nervosas; camada plexiforme interna, camada plexiforme externa, camada nuclear externa, camada de fotorreceptores e epitélio pigmentado da retina (Bosco et al., 2005; Wu et al., 2006). (Figura 1). As células fotorreceptoras são divididas em duas classes, os cones e os

bastonetes. As células bipolares e ganglionares transmitem o sinal visual através do nervo óptico para posterior envio às vias centrais da visão. As células horizontais e amácrinas promovem interações laterais entre as células. Já as células de Muller são responsáveis pela manutenção da função e estrutura da retina (Bringmann et al., 2006). A organização estrutural da retina é praticamente a mesma em todos os vertebrados (Wässle & Boycot, 1991).

As camadas internas da retina recebem suporte metabólico da rede vascular que atravessa a camada ganglionar e se estende até a camada plexiforme externa (Margalit 2003; Bosco et al., 2005). O oxigênio e os nutrientes para a retina externa são adquiridos por difusão através dos vasos da coróide que estão adjacentes ao epitélio pigmentar da retina (Margalit, 2003; Bosco et al., 2005). Juntos, os vasos da retina e o epitélio pigmentar formam a barreira hemato-retiniana, uma forte barreira contra macromoléculas, fazendo da retina neural um tecido imunologicamente privilegiado e propiciando mecanismo para controlar fluxo de fluidos e metabólitos (Bosco et al., 2005).



**Figura 1** - Corte de retina de rato corada com hematoxilina-eosina. Camadas da retina

#### 1.4.1 Retinopatias

O United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS, 1998), com pacientes diabéticos tipo 2, confirmou que em pacientes com controle metabólico intensivo houve uma redução de 25% no desenvolvimento da retinopatia diabética (RD), e ainda, que o controle pressórico rigoroso teve um impacto protetor de 37% no desenvolvimento da RD. Estes dados confirmam outros importantes estudos epidemiológicos nos quais foi demonstrado que a hipertensão arterial é o fator independente mais importante associado à RD, depois da hiperglicemia (Klein et al., 1983; Janka et al., 1989).

Estudos como o EURODIAB EUCLID (Chaturvedi et al., 2008) demonstraram que o Lisinopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) reduziu o risco da progressão da retinopatia diabética.

Entretanto não ficou claro se estes resultados são mais dependentes da diminuição da pressão arterial ou de mecanismos de bloqueio local (ocular) do SRA. Recentemente o estudo DIRECT (Diabetic Retinopathy Candesartan Trial) onde foi utilizado grupo de Candesartan, um bloqueador dos receptores da angiotensina II, mostrou que tal droga reduziu a incidência de retinopatia diabética em 35% em pacientes diabéticos tipo I. Em pacientes diabéticos tipo II a redução da progressão foi de 34% em pacientes com retinopatia não proliferativa inicial, sugerindo um papel do SRA na fisiopatologia da retinopatia (Chatuverdi et al., 2008, Sjølie AK et al., 2008).

O estudo RASS -The renin-angiotensin system study (Mauer et al., 2009) comparou a progressão da retinopatia diabética entre duas classes de inibidores do SRA, um inibidor da ECA e um bloqueador dos receptores AT1. Ambos reduziram a progressão da retinopatia diabética em 60 e 65% de pacientes com retinopatia diabética não proliferativa ou sem retinopatia. Tratamento com bloqueador dos receptores AT1(Losartana), em estudo envolvendo modelo animal de diabetes e hipertensão arterial demonstrou pela primeira vez, efeitos de neuro proteção na retinopatia diabética ao restabelecer as funções redox oxidativas e mitocondrial (Silva et al., 2009 ).

Evidências sugerem que a pressão arterial, além da própria hiperglicemia, reflete importante efeito sobre a incidência e progressão de complicações microvasculares retinianas. Entretanto, ainda não é sabido se a associação entre hipertensão arterial e retinopatia diabética é secundária aos efeitos hemodinâmicos da pressão arterial alta na microvasculatura da retina ou se representa uma associação complexa com a genética da hipertensão arterial.

### 1.4.2 Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é o maior sistema endócrino do organismo humano. A renina, que é derivada da pró renina, cliva o angiotensinogênio em Angiotensina I (Ang I). Esta é transformada em Angiotensina II (AngII) pela ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA I). A ECA2 é um homólogo da ECA que cliva a angiotensina II em Angiotensina 1-7 (Ang1-7) – (Burrell et al., 2004). Existem outras vias para formação de peptídeos no sistema (Sampaio et al., 2009).(Figura 2).

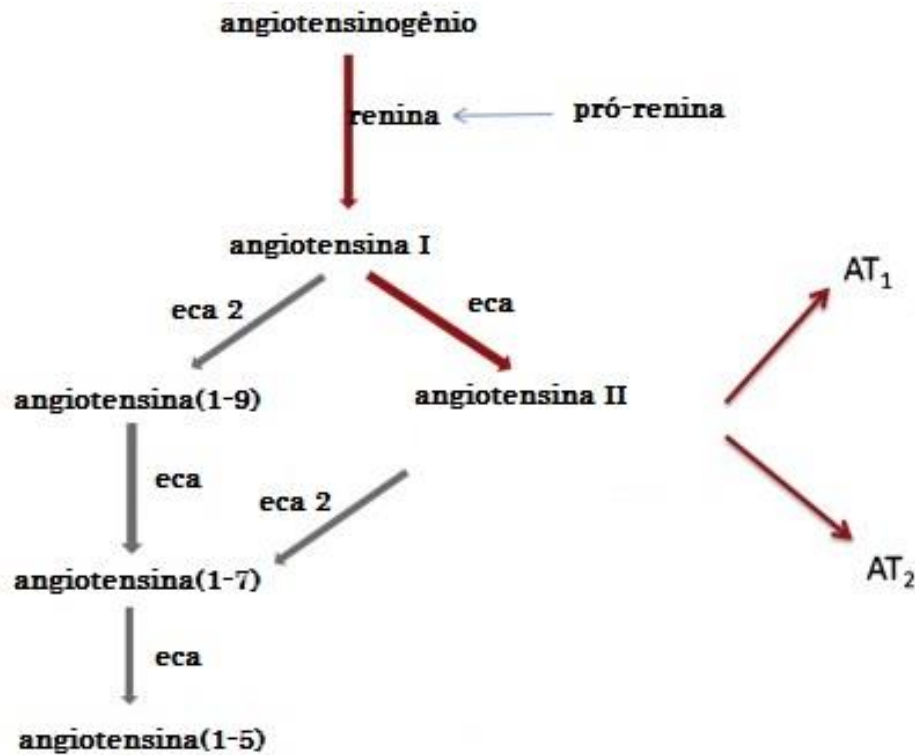
As ações deste sistema são bastante complexas e apresentam características contrarregulatórias em que as angiotensinas formadas, exercem influência modulatória entre si. Neste cenário podemos observar dois subsistemas de antagonismo endógeno: um é representado pelas ações da Ang II e Ang III, via receptor AT1, que levam, na vasculatura, à vasoconstrição, proliferação, inflamação, estresse oxidativo, trombogênese e fibrose, e o outro, pelas ações da Ang-(1-7) que, na sua maioria, levam à vasodilatação, potenciam o efeito vasodilatador da bradicinina, inibem a proliferação e a trombogênese, atenuam o efeito vasoconstritor da Ang II e inibem a ECA (Santos et al, 2008; Touyz, 2004; Billet S et al, 2008).

O sistema renina-angiotensina exerce influência no controle da pressão arterial principalmente pelas ações da Ang II mediadas pelo receptor AT1. Estas ações incluem vasoconstrição, síntese e secreção de aldosterona e reabsorção tubular de sódio. Como neurotransmissor e neuroregulador, a Ang II modula o controle central da pressão arterial, a atividade simpática, o apetite pelo sal e a sede, estimulando a atividade noradrenérgica periférica. Além

disso, a Ang II age através do receptor AT1 na secreção hormonal, modulando a liberação de ACTH, prolactina, vasopressina, dopamina e melatonina (Sampaio et al, 2009).

O desequilíbrio na relação existente entre os peptídeos do SRA, com predomínio do eixo Ang II-AT1 e/ou a redução da Ang-(1-7), parece haver relação entre o aparecimento e a progressão das doenças cardiovasculares bem como a aceleração do processo de lesão de órgãos-alvo. A atividade sustentada do eixo Ang II-AT1, nos tecidos envolvidos na regulação cardiovascular, estimula uma série de cascatas intracelulares complexas resultando em estresse oxidativo, inflamação, proliferação, fibrose e trombogênese, com consequente de lesão e deterioração dos tecidos cardiovasculares (Santos et al., 2008; Iwai et al., 2009).

Recentemente um número grande de publicações demonstrou o papel do SRA que outrora se acreditava estar restrito a ações na regulação da pressão arterial e na homeostase dos eletrólitos, tem também atuação parácrina/autócrina em diversos tecidos, incluindo ações nos olhos (de Gooyer et al., 2004; Re et al., 1984).



**Figura 2** -Esquematização resumida do sistema renina-angiotensina

### 1.4.3 Sistema renina-angiotensina nos tecidos oculares

Estudos demonstraram que os níveis de Ang I e Ang II oculares são cem vezes maiores que os plasmáticos, sugerindo produção local de angiotensina II em tecidos oculares (Kohler et al., 1997 e Wagner et al., 1996). No tecido retiniano os componentes do SRA são comumente encontrados em dois locais: neurônios e células da glia da retina interna e vasos sanguíneos.

A pró-renina foi o primeiro componente do SRA identificada em grande quantidade no humor vítreo de pacientes com retinopatia diabética proliferativa (Danser et al., 1989). Mais tarde foram encontrados níveis oculares elevados de angiotensina II; nestes mesmos pacientes os níveis plasmáticos da



angiotensinalleram inferioresaos oculares o que sugeriu produção local deste componente (Danser et al., 1994).

A pró-renina, a renina e a angiotensina estão localizadas nas células amácrinas e ganglionares, com a renina também presente nas células de Muller. A Renina e a ECA são também encontradas nos vasos retinianos e da coroide (Satofuka et al., 2008 e Alcazar et al., 2009) . Os papéis do SRA ocular parecem estar relacionados à regulação do fluxo sanguíneo (Rockwood et al., 1987) e da pressão intraocular. A Ang II também é um potente fator de crescimento para células musculares lisas dos vasos sanguíneos (Jurklies et al., 1995 e Jacobi et al., 1994) e angiogênico (Bui et al., 2003) embora o mecanismo de angiogênese não seja ainda totalmente compreendido.

As ações da Ang II ocorrem através de dois receptores: AT1 e AT2. Nas células endoteliais retinianas a Ang II estimula proliferação vascular via receptor AT1, onde este exerce regulação positiva com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Otani et al., 1998; Nagisa et al., 2001 e Ferrara, 2001). As funções dos receptores AT2 parecem ser opostas às dos AT1(Tamarat et al., 2002).

Além disso, a Ang II pode agir como agente inflamatório ao aumentar a permeabilidade vascular através das prostaglandinas e VEGF (Chua et al., 1998), contribuir para o recrutamento de células inflamatórias ao induzir as quemoquinas e moléculas de adesão (Chua et al., 1998 e Pastore et al, 1999) e induzir estresse oxidativo( Ellis et al., 1998). Por sua vez o próprio estresse oxidativo tem a capacidade de estimular expressão de receptores AT1 (Banday et al., 2008).

Além do SRA funcional intraocular (Bader et al., 2008 e Wilkinson-Berka et al., 2008), há recentemente evidências de que existam receptores mineralocorticóides funcionalmente ativos. Estes estimulam angiogênese e inflamação. A significância funcional destes receptores ainda é pouco conhecida, embora pareçam ser importantes na manutenção da pressão intraocular (Vaajanen et al., 2008), em condições fisiológicas. Em condições patológicas a aldosterona parece contribuir com dano vascular (Wilkinson-Berka et al., 2009).

#### **1.4.4 Retina e VEGF**

Entre os diversos fatores implicados na permeabilidade vascular e angiogênese, está o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A expressão do VEGF é aumentada pela glicose, aumento de produtos glicosilados, fator beta de crescimento e fator de crescimento (Rocha e Funder., 2002) insulina-like, os quais são modulados pelo SRA (Silva KC et al., 2009). Há um SRA ocular localmente funcionando onde ocorre interação com o VEGF, causando hiperpermeabilidade e angiogênese, pontos cruciais no desenvolvimento de doenças vasoproliferativas, como o diabetes (Strain et al., 2002).

O bloqueio dos efeitos do VEGF com drogas intravítreas anti-VEGF, como pegaptanibe, ranibizumabe e bevacizumabe, modificam a vasoproliferação e previnem a neovascularização retiniana. No entanto, apesar dos benefícios dessas drogas, sabe-se que elas nem sempre previnem a progressão de doenças como a DMRI e oclusões venosas retinianas (Van Wijn

Gaarden et al., 2008). Isto ocorre porque o VEGF é pleiotrópico, afetando um amplo espectro de comportamentos no endotélio, neurônio e glia. Por essa razão, emerge a possibilidade de intervenção no SRA, que pode ser mais efetivo contra a vasculopatia retiniana, especialmente, porque o SRA no eixo ANGII/AT1 é pró-inflamatório e fibrogênico.

Modelos experimentais e a observação clínica demonstraram que o bloqueio do SRA, com um inibidor da enzima conversora de angiotensina1 (ECA1) ou bloqueadores do receptor da angiotensina II tipo 1(AT1), podem amenizar muitas anormalidades vasculares que se desenvolvem nas retinopatias diabética e da prematuridade, independentemente dos valores de VEGF ( Strain et al., 2002).

## **1.5 Estresse oxidativo**

### **1.5.1 Radicais livres**

Um radical livre é qualquer espécie que contém um ou mais elétrons não pareados, ou seja, elétrons livres ocupando um orbital atômico ou molecular (Halliwell e Whiteman, 2004). Por serem os elétrons mais estáveis quando estão pareados nas órbitas, os radicais livres geralmente reagem com outras espécies (Halliwell, 1989). Elétrons não pareados têm uma forte tendência de formar par estável. Assim, um radical poderia doar seu elétron não pareado para outra molécula ou poderia retirar um elétron de outra molécula na sequência para parear. Conseqüentemente, se um radical doa um elétron ou retira um elétron de outra molécula, esta outra molécula torna-se um

radical. Um importante aspecto das reações mediadas por radicais livres é que elas tendem a ocorrer como uma reação em cadeia (Halliwell, 1989).

### 1.5.2 Espécies reativas

As três classes diferentes de espécies reativas relevantes na biologia e na medicina são: espécies reativas do oxigênio (ERO), espécies reativas do nitrogênio e espécies reativas do cloro. Espécies reativas podem ser ou não um radical livre (Halliwell e Whiteman, 2004). ERO é um termo coletivo que inclui os radicais do oxigênio e não radicais evidentes que são agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais. O superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são exemplos de ERO radical e não radical, respectivamente. Similarmente, espécies reativas do nitrogênio é um termo coletivo que inclui radicais (óxido nítrico,  $NO^{\bullet}$ ) e não radicais (peroxinitrito,  $ONOO^-$ ) e as espécies reativas do cloro é também um termo coletivo que inclui radicais (cloro atômico,  $Cl^{\bullet}$ ) e não radicais (ácido hipocloroso,  $HOCl$ ) (Halliwell, 2006). Várias outras espécies reativas de significado fisiológico, incluindo  $H_2O_2$ , radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e  $ONOO^-$  são derivadas do  $O_2^{\bullet-}$  como produtos de uma reação em cascata (Munzel et al., 2002). O  $O_2^{\bullet-}$  pode ser produzido pela corrente do transporte de elétrons mitocondrial, por NADPH oxidase, xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase, óxido nítrico sintase e citocromo P450 (Schnachenberg, 2002).

### 1.5.3 Sistema antioxidante

Os antioxidantes provêm proteção contra o estresse oxidativo pela neutralização ou pela limpeza das espécies reativas ou ainda pela quebra das reações de cadeia (Scandalios, 2005). Os antioxidantes são divididos em enzimáticos ou não enzimáticos. Os enzimáticos são:

- superóxido dismutase (SOD): uma enzima responsável por dismutar o superóxido em peróxido de hidrogênio. Existem três tipos de SOD específicos: manganês SOD (MnSOD) encontrado na mitocôndria; extracelular SOD (EC SOD) encontrado no extracelular e o cobre-zinco SOD (CuZn SOD) encontrado no citosol celular.

- a catalase e a glutatona peroxidase: responsáveis por degradar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

Os antioxidantes não enzimáticos são as vitaminas C e E, a glutatona (forma reduzida, GSH) e o betacaroteno. A transferrina, ceruloplasmina e albumina também possuem papel antioxidante por sequestrarem íons de metais de transição, como o ferro e o cobre, os quais reagem rapidamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para produzir o radical livre hidroxila altamente tóxico pela reação de Fenton (Halliwell, 1989).

Contudo, as espécies reativas nem sempre são prejudiciais. Elas ajudam os fagócitos a eliminar micro-organismos e regular eventos sinalizadores pela via redox (redução e oxidação) e dessa forma influenciar na fosforilação e desfosforilação de enzimas e fatores de transcrição (Halliwell, 2006).

Oxidação pode ser definida como a remoção de elétrons e redução é definida como ganho de elétrons (Mayes e Botham, 2003). Nas reações, um radical livre pode agir como um agente oxidante por tomar elétron de outras espécies ou como um agente redutor por doar elétron para outras espécies (Halliwell, 2006). O termo pró-oxidante não é bem definido;pró-oxidante pode ser qualquer substância que pode gerar espécies reativas ou capaz de induzir estresse oxidativo. Um antioxidante é definido como qualquer substância que quando presente em concentrações baixas, comparado com aquelas de um substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação desse substrato (Halliwell e Whiteman, 2004).

A definição clássica de estresse oxidativo é "um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor do pró-oxidante" (Sies H., 1985). No entanto, esse conceito vem se adaptando às recentes descobertas as quais demonstram que as EROs podem atuar como segundos mensageiros de vias específicas na sinalização celular (Jones, 2006 e Rosa et al., 2004). Esses dois conceitos foram incorporados dentro de uma nova definição: "um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a um desarranjo da sinalização e do controle redox e/ou a um dano molecular (Jones. 2006). As consequências do estresse oxidativo podem ser muito sutis ou muito sérias (incluindo dano oxidativo das biomoléculas, interrupção do sinal de transdução, mutação e morte celular) dependendo do balanço entre a geração de espécies reativas e a defesa antioxidante (Halliwell e Whiteman, 2004).

Recentemente estudos sobre a sinalização redox, outras formas de estresse e análise intracelular dos mecanismos redox tem sido realizados (Doh

et al., 2010). Há evidências que o retículo endoplasmático (RE) seja responsável por importantes funções como coordenação de vias de sinalização, modulação de funcionamento e sobrevivência celular. Condições fisiológicas e patológicas como excesso de proteínas mutantes, deprivação de nutrientes ou energia, infecções virais e alterações do estado redox podem comprometer a capacidade do RE no armazenamento proteico resultando em acúmulo de proteínas não armazenadas ou mal armazenadas no lúmen do RE ou levando a estresse de RE. Para eliminar componentes proteicos tóxicos, as células ativam um mecanismo de adaptação que consiste em um número de vias intracelulares de sinalização, coletivamente conhecida como UPR (resposta a proteínas não dobradas). A UPR diminui o estresse de RE e reestabelece a homeostase proteica. Doh et al., 2010 observaram marcadores de estresse de RE em modelo animal de glaucoma.

#### **1.5.4 Retina e estresse oxidativo**

A retina é particularmente susceptível ao estresse oxidativo por apresentar alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, ter o maior consumo de oxigênio e oxidação de glicose em relação a qualquer outro tecido e apresentar grande exposição à luz (BEATTY et al, 2000) . Este fenômeno torna a retina mais suscetível a estresse oxidativo (Anderson RE et al.,1984). Tem sido sugerido que a correlação entre hiperglicemia, alterações na homeostase e estresse oxidativo são os eventos-chave na patogênese da retinopatia diabética. Estudos em animais têm demonstrado que o estresse oxidativo

contribui não só para o desenvolvimento da retinopatia diabética, mas também para a resistência da retinopatia reverter após bom controle glicêmico, fenômeno conhecido como memória metabólica (Kowluru RA et al ,2001). A dificuldade em reverter a retinopatia diabética pode ser atribuída ao acúmulo de moléculas danificadas e ERO, que não são facilmente removidas, mesmo depois de bom controle glicêmico.

Em pacientes diabéticos tipo 2, o aumento da produção dos radicais livres e a diminuição dos mecanismos antioxidantes têm sido associados às complicações microvasculares do DM, incluindo a retinopatia diabética (Maritim et al., 2003).

Estudos demonstram o papel do peroxinitrito na disfunção vascular de diabéticos. Análises mostram que a formação de nitrotirosina em retina de ratos diabéticos e no plasma de pacientes diabéticos e tem evidenciado o papel do peroxinitrito nas complicações vasculares do diabetes (Caldwell et al., 2003).

Há várias vias que induzem o dano oxidativo das biomoléculas mediado pelas ERO. Uma via que inicia da interação entre dois radicais livres comuns encontrados in vivo são o  $O_2^{\bullet-}$  e  $NO^{\bullet}$ .  $O_2^{\bullet-} + NO^{\bullet} \rightarrow ONOO^-$  (Peroxinitrito) O produto da reação é o peroxinitrito, que em pH fisiológico, rapidamente se transforma em ácido peroxinitroso. Este poderoso agente oxidante e nitrante pode danificar diretamente proteínas, lipídeos e DNA (Halliwell, 2006). O peroxinitrito pode reagir com resíduos de tirosina presentes em proteínas formando a nitrotirosina e/ou se decompõe em várias espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que promovem a peroxidação lipídica, aumento da permeabilidade vascular e adesão plaquetária. A nitrotirosina é amplamente usada como um biomarcador do estresse oxidativo e nitrativo.



Contudo, não é um biomarcador específico para a formação de peroxinitrito, pois há vários outros agentes nitrativos *in vivo* (Halliwell, 1997). A nitração de estruturas proteicas, incluindo neurofilamentos e actina, podem romper filamentos agrupados com consequências patológicas. (Beckman 1996). Em adição, o peroxinitrito intermedeia a disfunção mitocondrial dependente de cálcio e morte celular pela ativação das calpaínas, proteases de cisteína dependentes de cálcio (Whiteman et al., 2004).

A hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) induz peroxidação lipídica e hidroxilação do DNA que são as maiores vias de dano oxidativo. A  $\text{OH}\cdot$  é a espécie reativa mais conhecida quimicamente por atacar e danificar quase todas as moléculas encontradas nas células (Halliwell, 1989). A  $\text{OH}\cdot$  pode reagir com a estrutura cíclica da guanina do DNA formando o radical 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) que pode propagar uma reação de cadeia através do DNA e causar alteração nas bases, assim como provocar a quebra da fita do DNA. O reparo imperfeito do dano do DNA pode levar a mutações, impedir o crescimento celular ou levar a apoptose (Evans et al., 2004). A  $\text{OH}\cdot$  pode também levar à peroxidação lipídica reagindo com proteínas de membrana. Os efeitos gerais da peroxidação lipídica são a diminuição da fluidez da membrana, aumento da quebra de membrana e dano das proteínas de membrana, desse modo ocorre inativação de receptores, enzimas e canais de íon (Halliwell, 2006).

### **1.5.5 Retina e apoptose**

Apoptose é uma das formas de morte celular programada que ocorre em vários eventos fisiológicos e patológicos. Existem características celulares

para caracterização deste evento: retração celular, condensação e marginação da cromatina da membrana nuclear, cariorrexe e formação de corpos apoptóticos que são fagocitados por macrófagos (Chowdhury et al., 2006).

Acompanhando este processo, também são observadas algumas alterações bioquímicas tais como exposição da fosfatidilserina na membrana plasmática, alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial, liberação de proteínas mitocondriais, ativação de caspases e clivagem do DNA em fragmentos internucleossomais.

Em contraste, a necrose é caracterizada como uma catástrofe bioenergética patológica resultante da depleção de ATP, envolvendo mais rapidamente, a desintegração de organelas celulares, a ruptura da membrana plasmática com inflamação e liberação do conteúdo de lisossomos, moléculas próinflamatórias e conteúdo celular em resposta a induções não fisiológicas, tais como choques sépticos, hipertermia, hipoxia, trauma, e acumulação de substâncias tóxicas no organismo (Chowdhury et al., 2006).

A apoptose é mediada por duas vias: extrínseca e intrínseca, que resultam na ativação da cascata das caspases, que são proteases atuantes em várias proteínas celulares e , portanto, responsáveis pelas alterações morfológicas características da apoptose. A caspase executora mais importante é a Caspase-3 (Chowdhury et al., 2006).

A via extrínseca é ativada por sinais que surgem dos receptores de morte, localizados na membrana celular, os quais são ativados por ligantes, tais como o fator de necrose tumoral (TNF) e FasL (CD95L).

A via intrínseca é desencadeada por vários estímulos tais como radiação, citocinas e privação de hormônios, e é regulada pelo equilíbrio de

proteínas pró-apoptóticas (Bak e Bax) e anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-X1). As proteínas da família Bcl-2 estão envolvidas no controle da permeabilidade da membrana mitocondrial. O aumento da permeabilidade mitocondrial libera citocromo C no citosol que desencadeia a ativação das Caspases (Burlacu, 2003) (Figura 3).

A microscopia eletrônica é considerada “padrão ouro” na identificação da célula apoptótica, mas não é utilizada rotineiramente em pesquisas, pois não permite quantificação.

Nos tecidos a apoptose tem sido frequentemente identificada através da técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-end labeling) que detecta fragmentos de DNA. A apoptose também pode ser indicada pela expressão imuno-histoquímica de Caspase-3 (Chowdhury et al., 2006). Como a Caspase-3 é o principal executor das cascatas apoptóticas, é um importante marcador de apoptose.

Na retina, Hamet et al 1995, demonstraram pela primeira vez em órgãos e em cultura de células de ratos geneticamente hipertensos, uma alta taxa de apoptose. A apoptose tem sido implicada na patogênese de uma série de doenças oculares como glaucoma, retinopatia diabética e oclusões vasculares (Silva KC et al, 2009).

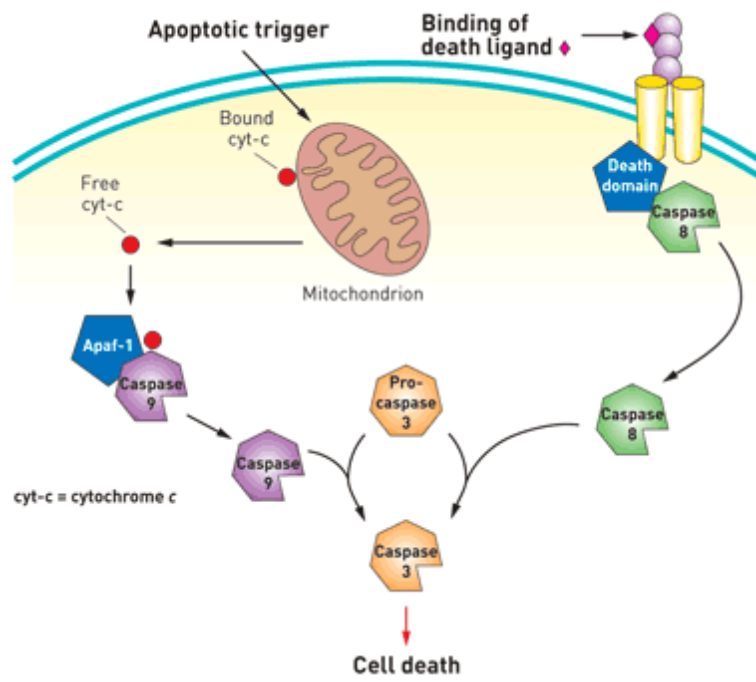


Figura 3 - Vias de apoptose

## **2. Justificativa**

---

Diante desta revisão sobre as alterações decorrentes da hipertensão arterial, descrevemos evidências de que esta doença é caracterizada por hiperatividade simpática e dessensibilização dos receptores regulatórios da PA (barorreceptores e receptores cardiopulmonares). Além disso, relatamos os achados de nosso grupo que demonstraram que a desnervação dos barorreceptores induz maior hipertrofia cardíaca em ratos com hipertensão renovascular (Rosa, 2005) e também na hipertensão essencial em ratos (Silva e cols., 2007), demonstrando o importante papel dos barorreceptores nas lesões de órgão – alvo associadas ou não à hipertensão.

Assim, neste trabalho, testamos as hipóteses de que a VPA isoladamente ou associada às complicações decorrentes da hipertensão arterial, tem efeitos significativos sobre os órgãos-alvo. Desta forma, foram estudados os efeitos da variabilidade da PA sobre a pressão de perfusão ocular, pressão intraocular e estresse oxidativo da retina.

### **3. Objetivos**

---

### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo do presente estudo foi verificar não apenas os efeitos da hipertensão arterial, mas também da variabilidade da pressão arterial sobre a pressão de perfusão ocular, pressão intraocular, bem como no estresse oxidativo da retina de animais normotensos e hipertensos submetidos ou não a desnervação sino-aórtica, um modelo de aumento de variabilidade da pressão arterial.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar as repercussões da variabilidade da PA sobre as pressões intraoculares e de perfusão ocular
- Avaliar as repercussões da variabilidade da PA sobre o sistema renina-angiotensina, VEGF e estresse oxidativo retinianos



## **4. Materiais e Métodos**

---

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) ([www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br)), sendo o projeto referente a esta qualificação de doutorado aprovado pela comissão de ética CAPPesq da diretoria clínica do Hospital das Clínicas em 22 de Dezembro de 2009 , Registro 5347 e projeto 027/10.

#### **4.1 Animais e grupos**

Foram utilizados ratos machos das linhagens Wistar e SHR, com 2 meses de idade, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram alocados no Biotério do laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração (Hospital das Clínicas, FMUSP), em ambiente com temperatura (220 - 240C) e luz controladas, em ciclo de 12 horas (claro-escuro). Água e comida foram oferecidas de modo irrestrito com dieta normoprotéica (12% de proteínas).

Os animais foram divididos em dois grupos: Normotensos (N) e Hipertensos (H) e subdivididos de acordo com o momento de avaliação e presença ou não da desnervação sinoaórtica (DSA)em:

**Agudo -12 horas** (avaliados após 12horas da DSA)

Normotenso 12h (N 12), n=12.

Normotenso Desnervado 12h (ND 12), n=12.

Hipertenso 12h (H 12), n=12.

Hipertenso desnervado 12h (HD 12), n=12.

**Agudo - 24 horas** (avaliados após 24horas da DSA)

Normotenso 24h (N 24), n=12.

Normotenso Desnervado 24h (ND 24), n=12.

Hipertenso 24h (H 24), n=12.

Hipertenso desnervado 24h (HD 24), n=12.

**Crônico** (avaliados após 10 semanas da DSA)

Normotenso crônico (NC), n=8.

Normotenso desnervado crônico (NDC), n=8.

Hipertenso crônico (HC), n=8.

Hipertenso desnervado crônico(HDC), n=8.

## 4.2 Desenho experimental

A fase experimental iniciou-se aos dois meses de idade quando a hipertensão arterial começa a se estabelecer no modelo SHR. Os animais (normotensos e hipertensos) foram submetidos à canulação da artéria e veia femoral, desnervação sinoaórtica/SHAM, registros e eutanásia após 12 horas, 24 horas e 10 semanas da desnervação sinoaórtica / SHAM.

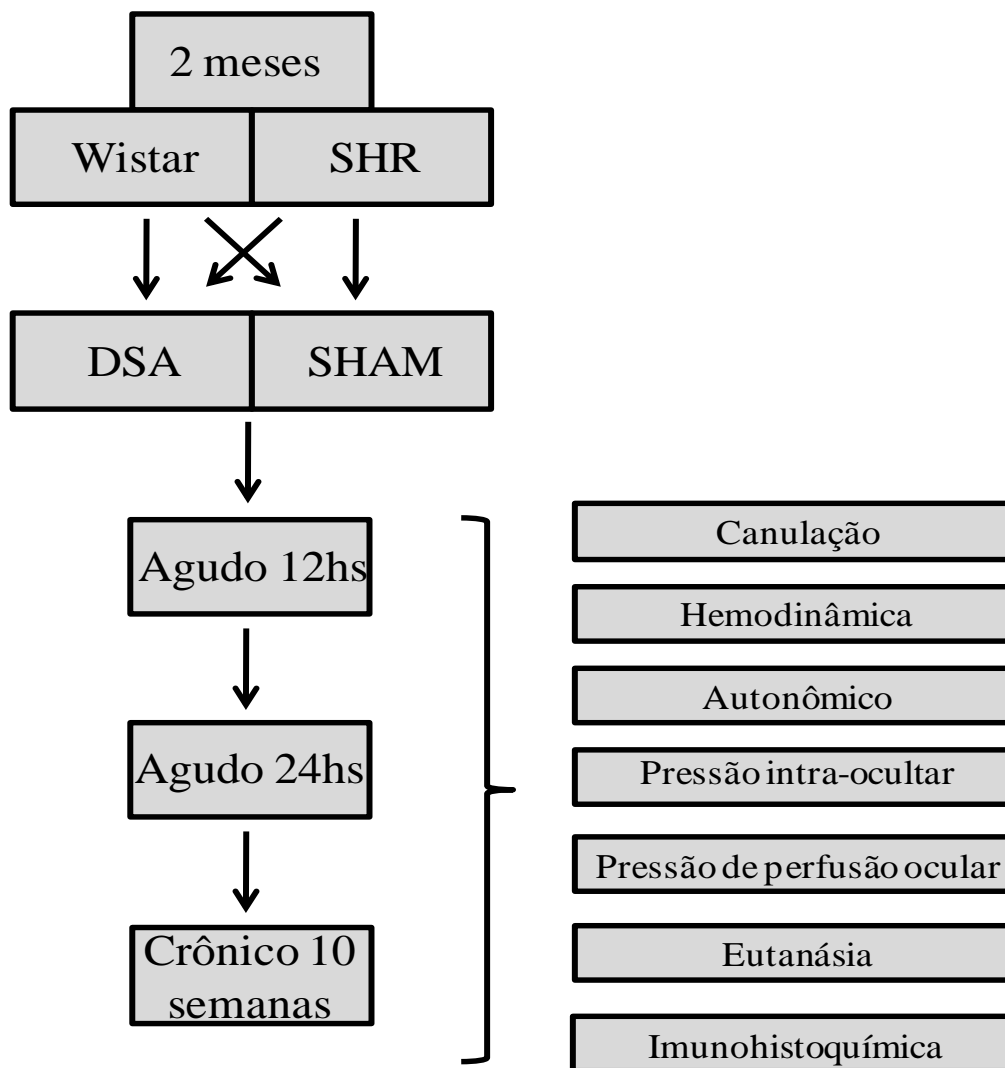
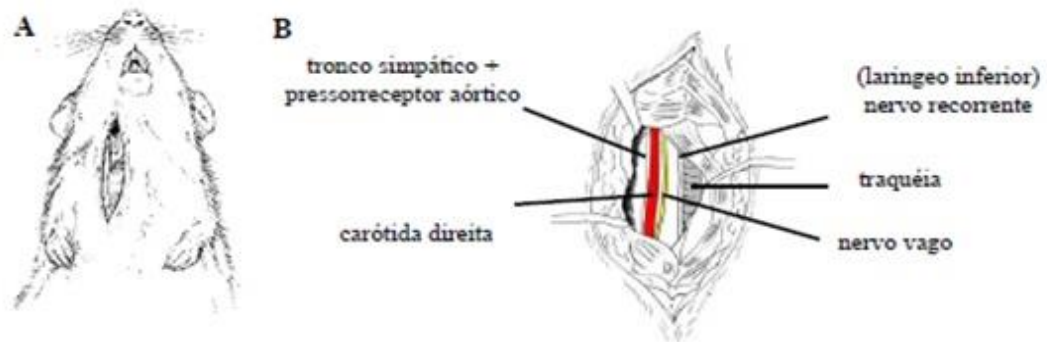


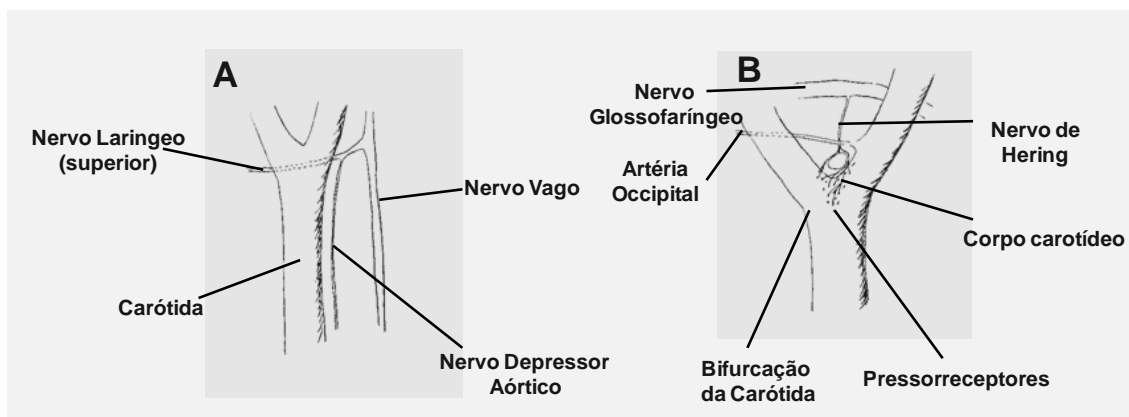
Figura 4 - Desenho Experimental

### 4.3 Desnervação sinoaórtica

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg intra-peritoneal. Para o procedimento cirúrgico o animal foi colocado deitado na posição dorsoventral e reto-caudal em mesa cirúrgica aquecida. O método de desnervação sinoaórtica foi feito de acordo com o descrito por Krieger,1964. O procedimento consistiu em uma incisão mediana na região cervical anterior, separação dos músculos pré-traqueais e localização bilateral do feixe vaso nervoso, constituído pela artéria carótida, nervo vago e tronco simpático. As fibras pressorreceptoras aórticas que trafegam junto ao tronco simpático ou como nervo isolado foram seccionadas. A bifurcação da carótida comum foi localizada, exposta e dissecada completamente nos dois lados, seccionando-se as fibras carotídeas, destruindo-se o corpúsculo carotídeo. Finalmente, o outro contingente de fibras pressorreceptoras aórticas que podem situar-se junto ao nervo laríngeo inferior também foi interrompido quando seccionou-se o laríngeo superior (Krieger e Marseillan, 1963). As figuras 4 e 5 ilustram os procedimentos descritos.



**Figura 5 -** A) Visão ventral do animal com incisão expondo a musculatura do pescoço; B) Visão do feixe vâsculo-nervoso após afastamento da musculatura do pescoço. (Desenho S. Lacchini)



**Figura 6 -** Inervação da região da bifurcação da carótida. A) Localização do nervo laríngeo superior; B) Detalhe da inervação do corpo carotídeo e dos pressorreceptores carotídeos. (Desenho S. Lacchini)

## 4.4 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas

### 4.4.1 Canulação

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg para a colocação de cateteres de polietileno (PE-10, com diâmetro interno de 0,01 mm que foi conectado ao PE-50, com diâmetro interno de 0,05 mm). As cânulas foram preenchidas com soro fisiológico, e posicionadas no interior da aorta abdominal e da veia cava inferior, através da artéria e veia femorais esquerdas para registro de pressão arterial, frequência cardíaca e administração de drogas, respectivamente. Através de uma pequena incisão na região inguinal esquerda em direção ao feixe vásculo-nervoso femoral, as extremidades das cânulas com menor calibre (PE-10) foram introduzidas na artéria e na veia femoral.

As cânulas foram fixadas com fio de algodão, na artéria e na veia e suas extremidades mais calibrosas foram passadas subcutaneamente, exteriorizadas no dorso da região cervical e fixadas com fio de algodão na pele.

Após o término da cirurgia, os animais foram tratados com uma única injeção intramuscular de penicilina G (Benzetacil®, Fontoura-Wyeth, 60.000 U) e os cuidados pós-operatórios foram baseados na descrição de Flecknell (1992). Para a manutenção da cânula, a fim de se evitar obstruções, foi feita lavagem precedente ao registro de PA, usando-se 0,02ml de heparina sódica (Liquemine – Roche, 5.000U) em 0,5 ml de solução fisiológica de NaCl 0,9%.

Cada rato foi mantido em uma caixa (Plexiglas, 25x15x10cm) após a canulação e durante a realização das avaliações hemodinâmicas sistêmicas.

#### 4.4.2 Registro da pressão arterial

No dia seguinte à canulação, com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão foi conectada a um transdutor (Kent Instruments, EUA) que, por sua vez, estava conectado a um pré-amplificador (Hewlett-Packard 8805C, Puerto Rico, EUA). Sinais de pressão arterial foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windaq, 2KHz, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal, para estudo dos valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Os valores de frequência cardíaca foram derivados do sinal pulsátil da pressão arterial.

Neste mesmo programa foi possível executar cálculos a partir dos valores obtidos e já gravados, a fim de se gerar uma planilha com valores de pico (sístole), vale (diástole), e período (entre um pico e outro), para cada onda de pulso. Isto possibilita o trabalho com os valores de PAS, PAD, PAM e intervalo de cada pulso de pressão. A partir do período entre um pico e outro, calculou-se os valores da frequência cardíaca (FC) para cada batimento, através do inverso período multiplicado por 60 (segundos). Os sinais gravados no disco rígido geraram uma planilha, a qual foi analisada em programa comercial para análise (Excel 5.0). Nesta



planilha obtiveram-se os valores de PAS, PAD, PAM e FC, além dos gráficos destes dados.



**Figura 7-** Esquema do sistema de registro de pressão arterial. (Desenho: S. Lacchini modificado).

#### 4.4.3 Análise da variabilidade da pressão arterial e da frequência cardíaca

Os parâmetros para análise da VPA e VFC no domínio do tempo consistem em calcular os valores médios do intervalo de pulso, FC, PAM, PAS e PAD. As variabilidades destas mesmas variáveis foram quantificadas pelos seus respectivos desvios padrões.

Para a análise no domínio da frequência, foi realizada a análise espectral dos registros basais utilizando o método da Transformada Rápida de Fourier (FFT). A potência foi obtida usando-se o Método do Periodograma de Welch em séries de 16384 pontos das séries temporais decimadas de intervalo

de pulso e pressão arterial, com uma janela Hanning de 512 pontos e com 50% de sobreposição (MATLAB 6.0, Mathworks, Inc). As potências para as bandas de muito baixa (MBF, 0,0-0,20 Hz; modulação humoral), baixa (BF, 0,20-0.75 Hz; modulação simpática) e alta (AF, 0.75-3.0 Hz; modulação parassimpática) frequências foram calculadas pela integração da potência nas bandas de interesse e apresentadas como valores absolutos e normalizados. Para a normalização, as potências das bandas de BF e AF foram divididas pela variância subtraída da potência na banda MBF (Pagani e cols., 1986). O acoplamento entre intervalo de pulso e pressão arterial sistólica é estimado pela função de coerência. Valores de coerência (K) maior que 0.5 foram considerados significativos. Após teste de coerência, calculamos o índice alfa pela seguinte fórmula:

$$\sqrt{\frac{LF(ms^2)}{LF(mmHg^2)}}$$

#### 4.5 Medidas da pressão intraocular

As medidas da pressão intraocular foram realizadas através de tonômetro eletrônico (Tonopen XL; Mentor, Norwell, MA) após receberem uma gota de colírio anestésico hidrocloridrato de proparacaína 0,5%. (Alcon) em cada olho.

A indução anestésica foi realizada em câmara de indução plástica e transparente, com mistura de Isoflurano 20% (MWI, Meridian, ID, USA) e 80%

de glicerol. A câmara foi então fechada até a queda dos animais. Então os ratos foram removidos da câmara de indução e colocados em uma plataforma aquecida para as medidas.

As medidas da PIO foram realizadas cerca de 45 segundos após início da indução, para minimizar os efeitos do Isoflurano sobre a PIO ( Ding et al, 2011). O Isoflurano começa a diminuir a PIO após 3 minutos da indução da anestesia, antes disso as modificações da PIO são mínimas ( Ding et al, 2011).

Foram realizadas cinco medidas da PIO em cada olho através do contato do equipamento com a córnea. A medida final da PIO de cada olho foi obtida através da média das cinco medidas fornecidas pelo equipamento.

Moore et al., 1995 demonstraram que tal metodologia é indolor, não invasiva e reprodutível. As medidas foram realizadas no mesmo horário para minimizar os efeitos do ciclo circadiano sobre a PIO e pelo mesmo examinador.

#### **4.6. Medida da pressão de perfusão ocular**

A pressão de perfusão ocular foi calculada pela diferença da pressão arterial média e pressão intraocular. ( $PPO = PAM - PIO$ ). Em primatas, este cálculo difere um pouco pelo fato das medidas serem realizadas em posição ereta, diferentemente dos ratos, em posição supina. Esta estimativa da PPO é consistente com prévios estudos.

## **4.7 Analgesia**

Todos os procedimentos invasivos foram realizados sob efeito de anestésicos como previamente descrevemos, e após os procedimentos cirúrgicos foi administrado Dipirona sódica 0,1ml intra plantar, na pata direita dos animais. Sabe-se que de acordo com Reis e cols 2006, o efeito analgésico deste fármaco pode ser prolongado com uma simples aplicação.

## **4.8 Eutanásia**

Após o término do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico (pentobarbital sódico, 40mg/Kg). Foram retirados os globos oculares e as carcaças, colocadas em sacos específicos para lixo biológico e mantidos em refrigerador, para posteriormente serem incinerados pela empresa responsável.

## **4.9 Avaliações imunohistoquímicas**

### **4.9.1 Preparação dos globos oculares para análise imunohistoquímica**

Os olhos enucleados foram fixados em metacarnol (clorofórmio 30%, ácido acético 10%, metanol 60%) por no máximo 24 horas e então transferidos para álcool 70% por 24 horas. Após este período foram embebidos em parafina e realizados cortes transversais de 4 micrômetros de espessura. Os cortes foram montados em lâminas tratadas com silano.

#### 4.9.2 Imunohistoquímica para quantificação de 8-OHdG na retina

Primeiramente, foi realizada desparafinização dos cortes de olho com xilol, re-hidratação com passagens por concentrações decrescentes de etanol. A recuperação antigênica foi realizada com aquecimento em panela de pressão (DAKO), as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio pH 6,0 por 30 minutos sob pressão e em seguida as mesmas ficaram em descanso em temperatura ambiente por 20 minutos.

A seguir as lâminas foram lavadas três vezes por 7 minutos em PBS 1X, depois realizado bloqueio de peroxidase endógena H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 vol) através de três lavagens de 7 minutos em temperatura ambiente. Em seguida realizada duas lavagens em água corrente, uma vez em água deionizada e uma vez em PBS 1X. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com solução de caseína 2% PBS por 60 minutos em temperatura ambiente. Cada corte foi circundado com caneta Pap Pen (DAKO) e o anticorpo "mouse" monoclonal para 8 Hidroxiguanosina (Abcam 62623) diluído em solução de caseína 1% foi incubado "overnight" em 4 graus Celsius.

O anticorpo para 8 hidroxideoxiguanosina foi diluído em 1/200.

Após o período de incubação, foram feitas três lavagens em PBS 1X, o polímero antimouse foi aplicado por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas três vezes com PBS 1X seguido pela adição de diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB Sigma). Na sequência as lâminas foram lavadas mais duas vezes em água corrente.

Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harry por 1 minuto em temperatura ambiente, desidratados em concentrações crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e montados em meio permanente (historesina).

O controle negativo foi obtido omitindo-se o anticorpo primário para o controle da reação. Foram realizadas avaliações de 8 cortes não consecutivos de retina de um olho para cada animal.

As lâminas foram observadas em um microscópio Leica sob aumento de 400x e iluminação entre 9 e 10. A análise das imagens foi obtida através da porcentagem de área corada com programa Image J, realizada por um observador que desconhecia a identidade de cada lâmina.

#### **4.9.3 Imunohistoquímica para quantificação de Nitrotirosina na retina**

Primeiramente foi realizada desparafinização dos cortes de olho com xilol, re-hidratação com passagens por concentrações decrescentes de etanol. A recuperação antigênica foi realizada com aquecimento em panela de pressão (DAKO), as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio pH 6,0 por 30 minutos sob pressão e em seguida as mesmas ficaram em descanso em temperatura ambiente por 20 minutos.

A seguir as lâminas foram lavadas três vezes por 7 minutos em PBS 1X, depois realizado bloqueio de peroxidase endógena (10 vol) através de três lavagens de 7 minutos em temperatura ambiente. Em seguida realizada duas lavagens em água corrente, uma vez em água deionizada e uma vez em PBS 1X. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com solução de caseína 2% PBS por 60 minutos em temperatura ambiente. Cada corte foi circundado

com caneta Pap Pen (DAKO) e o anticorpo “mouse” monoclonal para 3-Nitrotirosina (Abcam110282) diluído em solução de caseína 1% foi incubado “overnight” em 4 graus Celsius.

O anticorpo para 3-Nitrotirosina foi diluído em 1/100.

Após três lavagens em PBS 1X, o polímero antimouse foi aplicado por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas três vezes com PBS 1X seguido pela adição de diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB Sigma). Na sequência as lâminas foram lavadas mais duas vezes em água corrente.

Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harry por 1 minuto em temperatura ambiente, desidratados em concentrações crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e montados em meio permanente (historesina).

O controle negativo foi obtido omitindo-se o anticorpo primário para o controle da reação. Foram realizadas avaliações de 8 cortes não consecutivos de retina de um olho para cada animal.

As lâminas foram observadas em um microscópio Leica sob aumento de 400x e iluminação entre 9 e 10. A análise das imagens foi obtida através da porcentagem de área corada com programa Image J, realizada por um observador que desconhecia a identidade de cada lâmina.

#### **4.9.4 Imunohistoquímica para quantificação de receptores tipo AT1 da Angiotensina II na retina**

Primeiramente foi realizada desparafinização dos cortes de olho com xilol, re-hidratação com passagens por concentrações decrescentes de etanol.

A recuperação antigênica foi realizada com aquecimento em panela de pressão (DAKO), as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio pH 6,0 por 30 minutos sob pressão e em seguida as mesmas ficaram em descanso em temperatura ambiente por 20 minutos.

A seguir as lâminas foram lavadas três vezes por 7 minutos em PBS 1X, depois realizado bloqueio de peroxidase endógena H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 vol.) através de três lavagens de 7 minutos em temperatura ambiente. Em seguida realizada duas lavagens em água corrente, uma vez em água deionizada e uma vez em PBS 1X. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com solução de caseína 2% PBS por 60 minutos em temperatura ambiente. Cada corte foi circundado com caneta Pap Pen (DAKO) e o anticorpo "mouse" monoclonal para receptor tipo 1 de angiotensina II (Abcam 19134) diluído em solução de caseína 1% foi incubado "overnight" em 4 graus Celsius.

Após três lavagens em PBS 1X, o polímero antimouse foi aplicado por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas três vezes com PBS 1X seguido pela adição de diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB Sigma). Na sequência as lâminas foram lavadas mais duas vezes em água corrente.

Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harry por 1 minuto em temperatura ambiente, desidratados em concentrações crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e montados em meio permanente (historesina).

O anticorpo para receptor tipo 1 de angiotensina II foi diluído em 1/100.



O controle negativo foi obtido omitindo-se o anticorpo primário para o controle da reação. Foram realizadas avaliações de 8 cortes não consecutivos de retina de um olho para cada animal.

As lâminas foram observadas em um microscópio Leica sob aumento de 400x e iluminação entre 9 e 10. A análise das imagens foi obtida através da porcentagem de área corada realizada com programa Image J, por um observador que desconhecia a identidade de cada lâmina.

#### **4.9.5 Imunohistoquímica para quantificação de Caspase-3 na retina**

A recuperação antigênica se fez necessária para exposição dos epitopos e consequente ligação do anticorpo, visto que o material foi fixado em tampão formalina 10% e embebido em Paraplast. Utilizamos banho maria a 95° Celsius, com as lâminas em tampão citrato pH 6,0 por 30 minutos. Após, as mesmas foram deixadas em temperatura ambiente por mais 20 minutos.

Utilizou-se PBS 1X como tampão de lavagens.

Em seguida foram feitos três bloqueios de 5min cada em temperatura ambiente, com Peróxido de Hidrogênio 3% (10vol). Estes banhos foram protegidos da luz e bem fechados, evitando a perda da ação do peróxido. Com isso, a peroxidase endógena foi inativada. Lavou-se em água corrente e destilada, em seguida.

O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com caseína 2% em PBS, por uma hora em temperatura ambiente. As lâminas foram apenas escurridas e os cortes circulados com caneta Pap pen (Dako).

Instilou-se o anticorpo Caspase-3, policlonal IgG produzido em coelho (Sta Cruz #SC7148), em concentração de 1/100 em Caseína 1% PBS. Este anticorpo foi incubado em câmara úmida, por 18 horas (Over-night) a 4 graus Celsius. Como controle positivo utilizou-se pele de rato. Para o controle negativo, omitiu-se o anticorpo primário e em seu lugar foi colocado caseína 1% PBS.

Utilizou-se PBS1X como tampão, em 3 lavagens de 5 minutos cada.

Aplicou-se o polímero universal e seu conjugado- estreptoavidina com HRP (Invitrogen), incubados respectivamente por 20 e 30 minutos em temperatura ambiente.

Novas lavagens em tampão PBS1X foram realizadas.

Como cromógeno revelador da reação, utilizamos o DAB (diaminobenzidina) da Invitrogen, incubado por 7 minutos em temperatura ambiente.

As lâminas foram então levemente contracoradas com Hematoxilina de Mayer`s por 1 minuto, desidratadas em concentrações crescentes de etanol e diafanizadas em xilol.

O meio de montagem permanente utilizado foi o Ervmount (Erviagas).

As lâminas foram observadas em um microscópio Leica sob aumento de 400x e iluminação entre 9 e 10. A análise das imagens foi obtida através da porcentagem de área corada com programa Image J, realizada por um observador que desconhecia a identidade de cada lâmina.

#### 4.9.6 Imunohistoquímica para quantificação de VEGF na retina

Foi utilizado anticorpo “mouse” monoclonal Anti-VEGF (VG-1) da Abcam (ab 1316). Tal anticorpo é específico para detectar as isoformas 121,165 e 189 do VEGF.

Primeiramente foi realizada desparafinização dos cortes de olho com xilol, re-hidratação com passagens por concentrações decrescentes de etanol. A recuperação antigênica foi realizada com aquecimento em panela de pressão (DAKO), as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio pH 6,0 por 30 minutos sob pressão e em seguida as mesmas ficaram em descanso em temperatura ambiente por 20 minutos.

A seguir as lâminas foram lavadas três vezes por 7 minutos em PBS 1X, depois realizado bloqueio de peroxidase endógena H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 vol) através de três lavagens de 7 minutos em temperatura ambiente. Em seguida realizada duas lavagens em água corrente, uma vez em água deionizada e uma vez em PBS 1X. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com solução de caseína 2% PBS por 60 minutos em temperatura ambiente. Cada corte foi circundado com caneta Pap Pen (DAKO) e o anticorpo “mouse” monoclonal para VEGF (Abcam) diluído em solução de caseína 1% foi incubado “overnight” em 4 graus Celsius.

O anticorpo Anti-VEGF foi diluído em 1/100.

Após três lavagens em PBS 1X, o polímero antimouse foi aplicado por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas três vezes com PBS 1X seguido pela adição de diaminobenzidina

tetrahydroclorido (DAB Sigma). Na sequência as lâminas foram lavadas mais duas vezes em água corrente.

Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harry por 1 minuto em temperatura ambiente, desidratados em concentrações crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e montados em meio permanente (historesina).

O controle negativo foi obtido omitindo-se o anticorpo primário para o controle da reação. Foram realizadas avaliações de 8 cortes não consecutivos de retina de um olho para cada animal.

As lâminas foram observadas em um microscópio Leica sob aumento de 400x e iluminação entre 9 e 10. A análise das imagens foi obtida através da porcentagem de área corada com programa Image J, realizada por um observador que desconhecia a identidade de cada lâmina.

#### **4.10 Análise Estatística**

Para elaboração deste estudo foram analisados ratos normotensos (controle) e hipertensos (SHR), separados em dois subgrupos, sem DSA e com DSA. Os animais foram avaliados relativamente às medidas de pressão, estresse oxidativo, angiotensina e VEGF retinianos, sendo os ratos avaliados em 12h (agudo), 24h (agudo) e após 10 semanas (crônico). A cada momento de avaliação os ratos foram sacrificados para realização das mensurações.

Os parâmetros avaliados foram descritos segundo grupos, DSA e momento de avaliação, com uso de medidas resumo (média, desvio padrão) e comparados os valores dentre os fatores avaliados (grupo, DSA e momento)

com uso de análises de variâncias (ANOVA) com 2 fatores, seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni, para saber entre quais grupos, presença de DSA ou momentos, ocorrem as diferenças nos parâmetros.

A cada momento de avaliação, foram calculadas as correlações de Pearson entre os parâmetros avaliados para verificar a existência de correlação entre eles.

Os resultados foram ilustrados com uso de gráficos de barras representando as médias dos parâmetros com os respectivos erros padrões segundo grupos, presença de DSA e momentos de avaliação. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

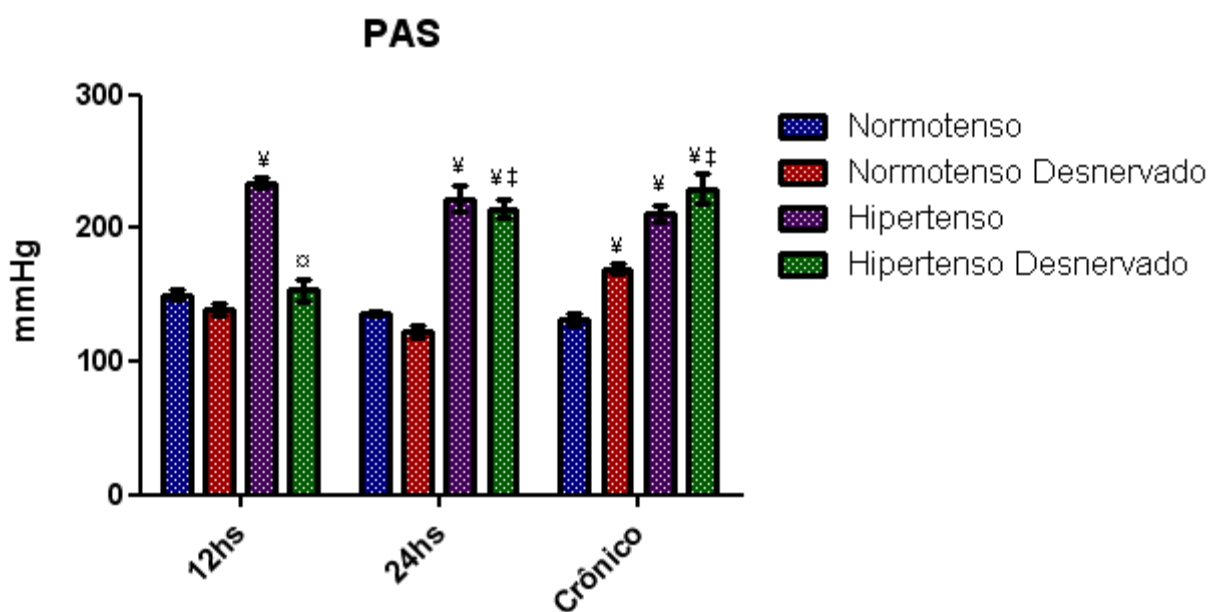
## **5. Resultados**

---

## 5.1 Pressão arterial sistólica

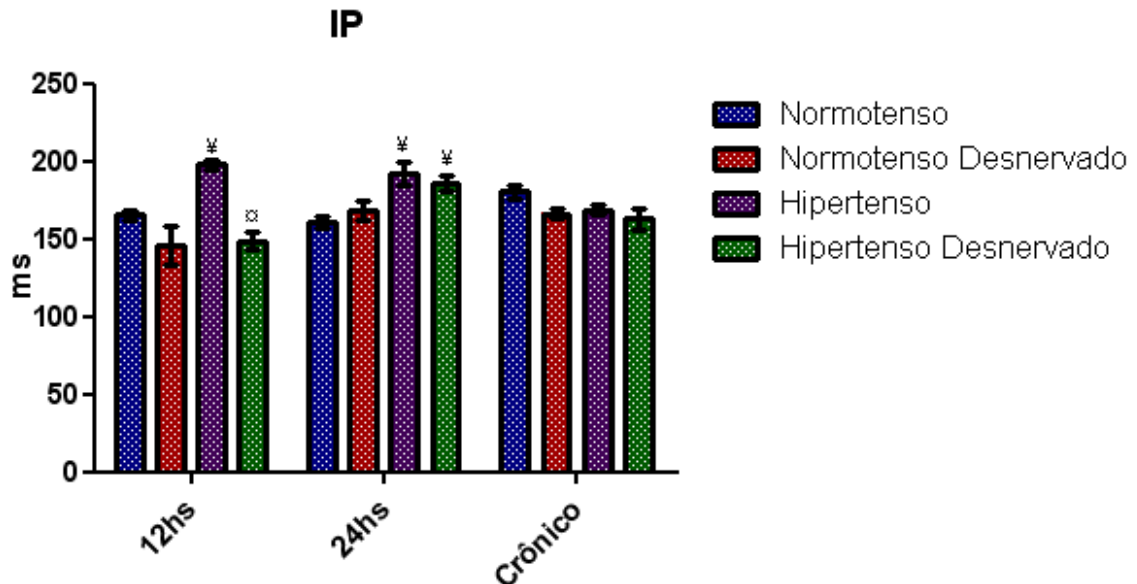
Na Figura 8 pudemos observar que conforme esperado, a PAS dos grupos hipertensos encontrava-se maior que os normotensos. A DSA não afetou os valores da PA, exceto nos animais HD 12h e discretamente nos ND crônicos.

## 5.2 Intervalo de pulso (IP)



**Figura 8-** Pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. ¥  $p < 0,05$  vs N, ‡  $p < 0,05$  vs ND, ♂  $p < 0,05$  vs H.

Foram observadas discretas variações no IP nos diferentes momentos analisados em todos os grupos (Figura 9).

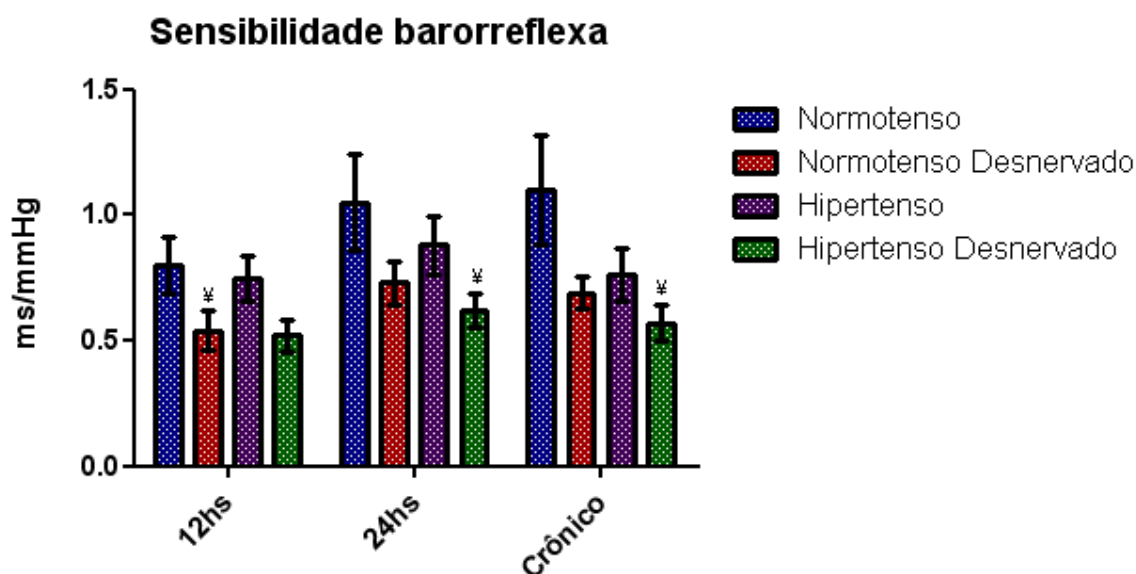


**Figura 9-** Intervalo de Pulso (IP) dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. ¥  $p < 0,05$  vs N,  $\alpha$   $p < 0,05$  vs H.

### 5.3 Sensibilidade barorreflexa

Conforme esperado, os animais hipertensos desnervados apresentaram sensibilidade barorreflexa espontânea diminuída em relação aos normotensos. Os animais desnervados (ND e HD) tiveram uma diminuição importante na sensibilidade barorreflexa quando comparados aos intactos (N e H), confirmando o comprometimento do mecanismo barorreflexo pela DSA. (Figura 10)

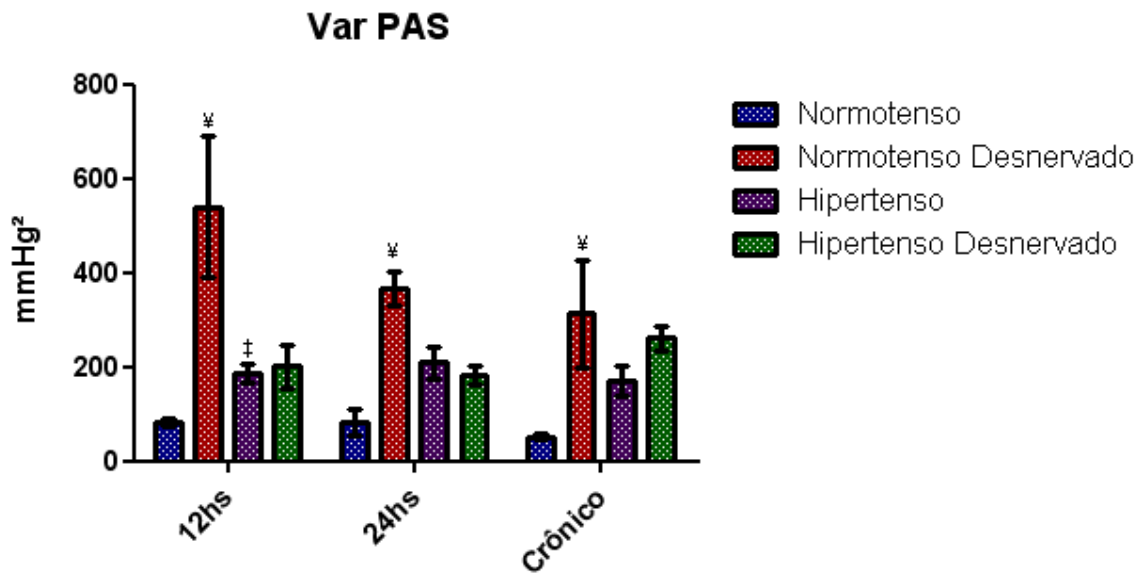




**Figura 10-** Sensibilidade barorreflexa (alfa índice) dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. ¥  $p < 0,05$  vs N.

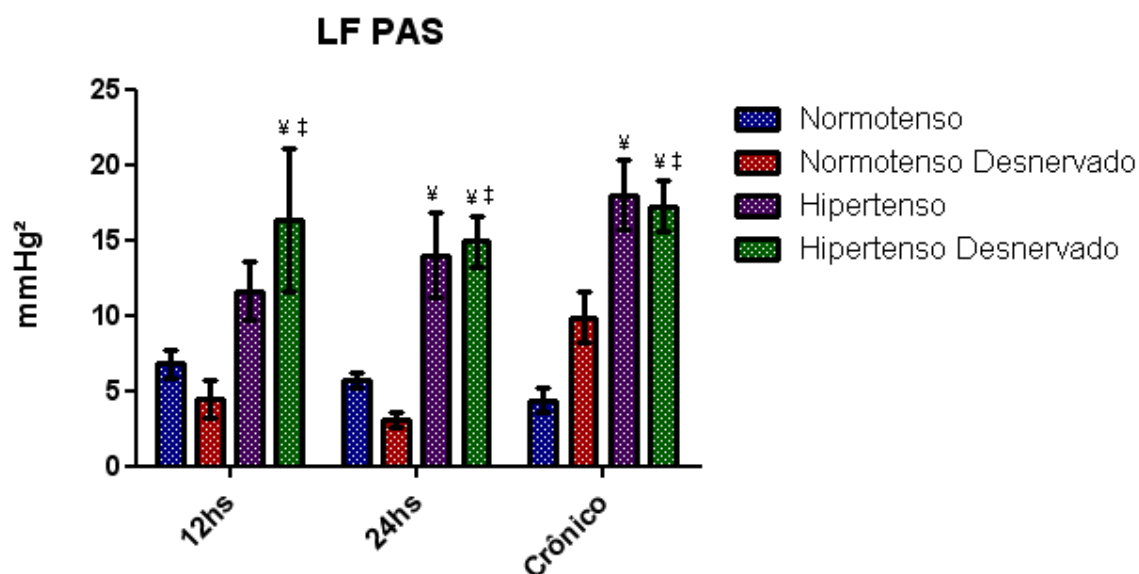
#### 5.4 Variância da pressão arterial no domínio do tempo e da frequência (Análise espectral FFT)

Tanto a hipertensão arterial como a DSA provocaram alterações na variância. Os ratos hipertensos apresentaram variância total da PAS (expressa em  $\text{mmHg}^2$ ) aumentada comparados aos normotensos. Essa variável sofreu uma alteração ainda maior nos animais normotensos submetidos à DSA, confirmando a importante ação deste modelo animal (DSA) sobre a variabilidade da PA. (Figura 11).



**Figura 11-** Variância da PAS dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. ¥  $p < 0,05$  vs N, ‡  $p < 0,05$  vs ND.

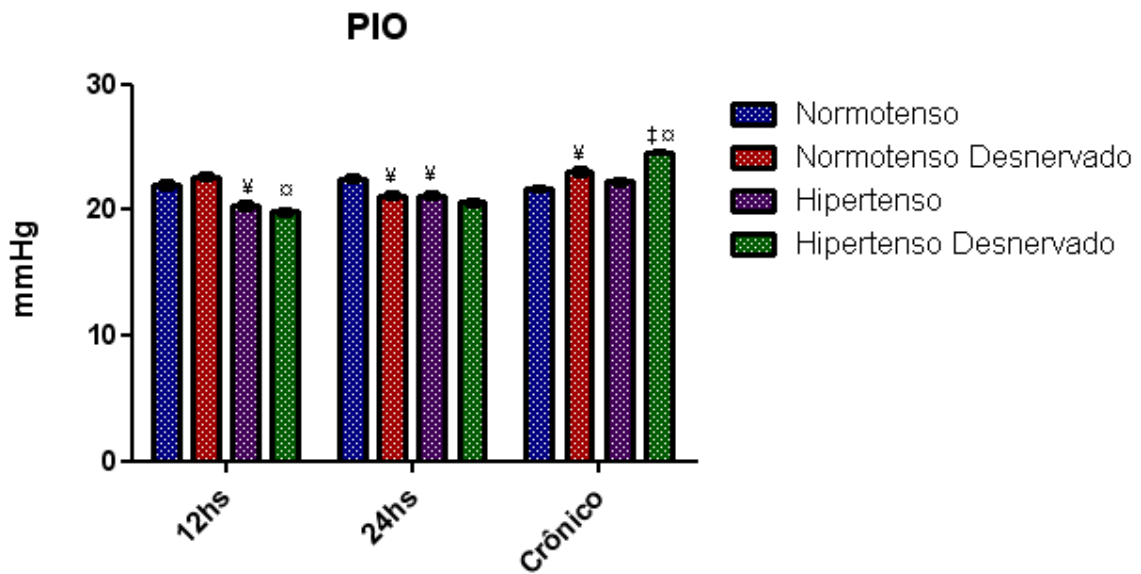
Na figura abaixo vemos que mais uma vez a hipertensão arterial “per se” induziu prejuízo sobre o sistema nervoso autônomo, uma vez que os animais do grupo hipertenso (H e HD) apresentaram maiores valores do componente LF da PAS (Figura 12) quando comparados aos normotensos (N e ND). A DSA, por sua vez, acentuou tal disfunção autonômica apenas nos animais normotensos crônicos (ND).



**Figura 12**—Índice de baixa frequência da PAS (LF PAS) dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. †  $p < 0,05$  vs N, ‡  $p < 0,05$  vs ND.

### 5.5 Pressão intraocular (PIO)

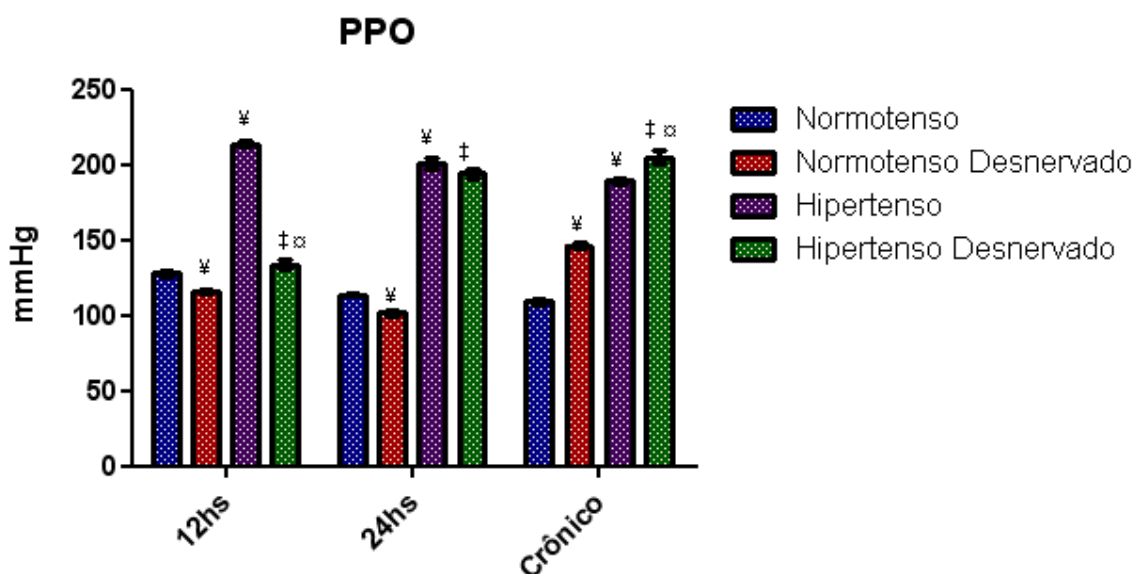
Observou-se que o comportamento da pressão intraocular tanto dos animais controles como desnervados, apresentou pouca flutuação nos diferentes tempos. Figura 13. Cronicamente observou-se aumento da PIO nos animais desnervados em relação aos seus controles, sugerindo que a disfunção barorreflexa pode relacionar-se com o aumento da PIO.



**Figura 13-** Pressão intraocular dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. ‡  $p < 0,05$  vs N, †  $p < 0,05$  vs ND, ‡  $p < 0,05$  vs H.

### 5.6 Pressão de perfusão ocular (PPO)

Observou-se maior PPO nos ratos hipertensos quando comparados aos normotensos. Cronicamente observou-se aumento da PPO nos animais desnervados em relação aos seus controles sugerindo que o aumento da PPO pode estar relacionado à disfunção baroreflexa (Figura 14).



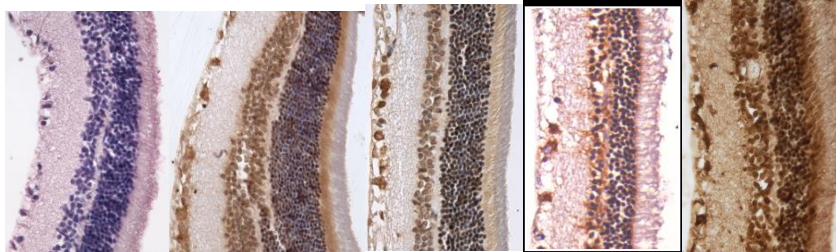
**Figura 14-** Pressão de perfusão (em mmHg) dos grupos Normotenso (N), Normotenso desnervado (ND), Hipertenso (H) e Hipertenso desnervado (HD). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni.  $\neq$   $p < 0,05$  vs N,  $\ddagger$   $p < 0,05$  vs ND,  $\alpha$   $p < 0,05$  vs H.

## 5.7 Aspectos Morfológicos e Histológicos

### 5.7.1 Imunohistoquímica para detecção de 8-OHdG na retina

A Figura 15A mostra uma lâmina ilustrando os resultados dos experimentos de localização do radical 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) em cortes de retina. O 8-OHdG identifica o dano dos ácidos nucleicos do DNA causados pela reação do ânion hidroxil com a estrutura cíclica da guanina resultando em estresse oxidativo. Observa-se que a porcentagem de células 8-OHdG foi maior nos animais hipertensos desnervados agudos (24h) e crônicos sugerindo haver ação da variabilidade da PA sobre o estresse oxidativo retiniano (figura 15 B)..

A)



CTR-

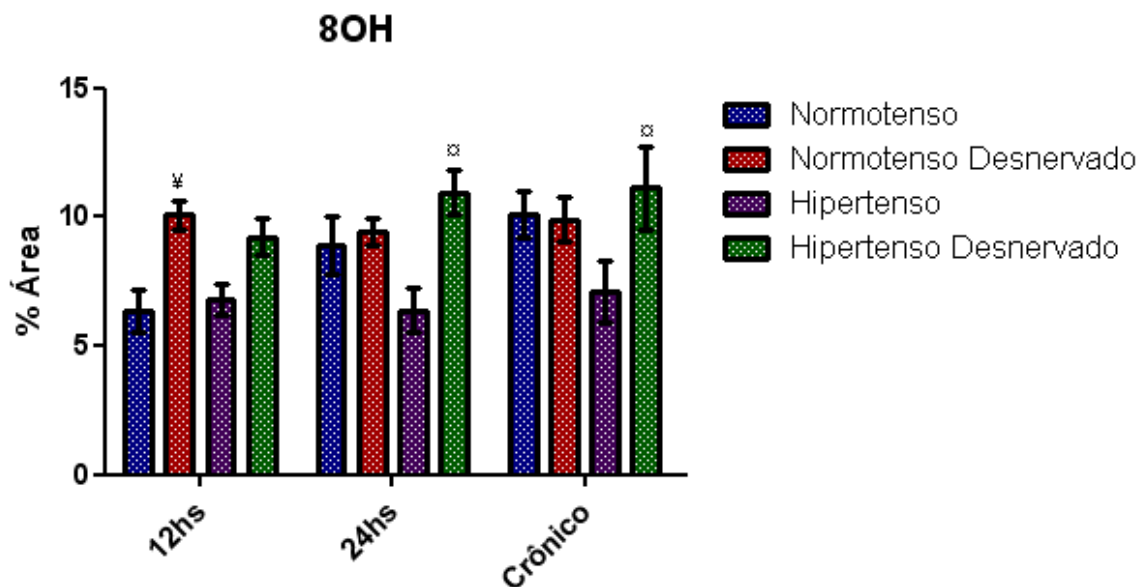
N

ND

H

HD

B)

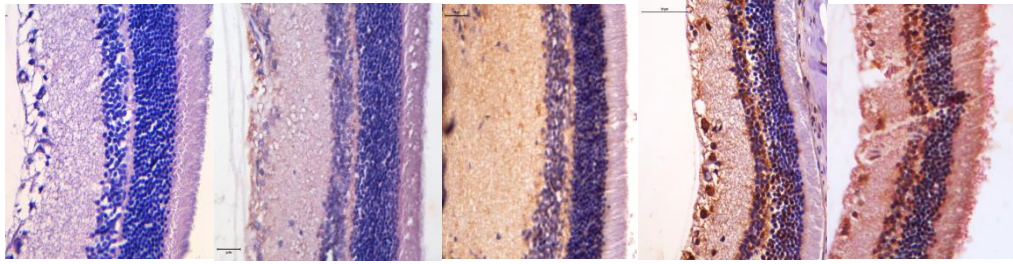


**Figura 15-** A) Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica para quantificação tecidual de 8-OHdG retiniano do grupo crônico nos animais Normotensos (N), Normotensos desnervados (ND), Hipertensos (H), Hipertensos desnervados (HD) e Controles negativos (CTR-). A presença de 8-OHdG apresenta tonalidade marrom escuro. B) Porcentagem de área com 8-OHdG na retina dos grupos Normotenso, Normotenso desnervado, Hipertenso e Hipertenso desnervado. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. ‡  $p < 0,05$  vs N, †  $p < 0,05$  vs H.

### **5.7.2 Imunohistoquímica para imunolocalização do receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1) na retina**

Observou-se maior percentagem de receptores AT1 (Figura 16) nos animais desnervados agudamente em 12h (ND e HD) em relação aos intactos (N e H), com redução importante desta percentagem nos animais agudos 24 horas e novo aumento destes níveis cronicamente. Importante ressaltar que cronicamente, os animais hipertensos tiveram aumento importante da presença deste receptor, sugerindo possível participação da HAS.

A)



CTR-

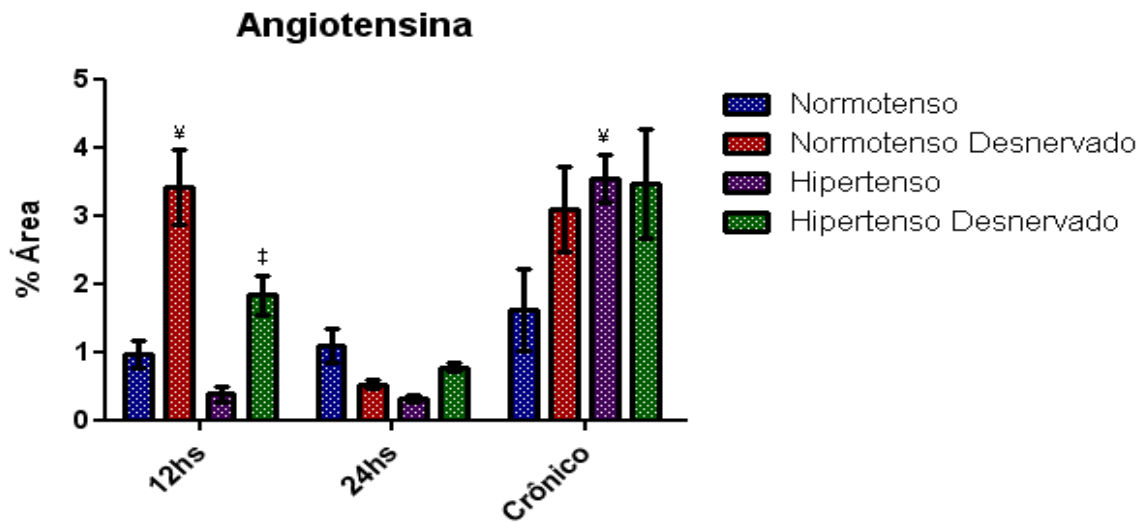
N

ND

H

HD

B)



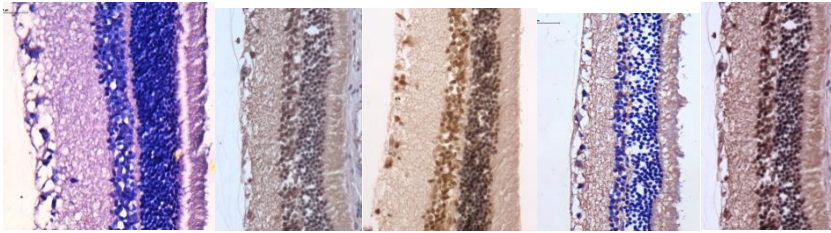
**Figura 16-** A) Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica para quantificação de receptores AT1 da AngII retiniana do grupo crônico nos animais Normotensos (N), Normotensos desnervados (ND), Hipertensos (H), Hipertensos desnervados (HD) e Controles negativos (CTR-). A presença de receptores AT1 apresenta tonalidade marrom escuro. B) Porcentagem de área com receptores AT1 na retina dos grupos Normotenso, Normotenso desnervado, Hipertenso e Hipertenso desnervado. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni.  $\text{†}$   $p < 0,05$  vs N,  $\text{‡}$   $p < 0,05$  vs ND.



### **5.7.3 Imunohistoquímica para detecção de Nitrotirosina na retina**

Observou-se importante ação da disfunção baroreflexa sobre os níveis de nitrotirosina retinianos especialmente nos animais agudos (ND e HD). Cronicamente mesmo com a redução destes níveis, sugerindo uma possível ação antioxidante do organismo, os animais HD permaneceram com maior estresse oxidativo retiniano. ( Figura 17)

A)



CTR-

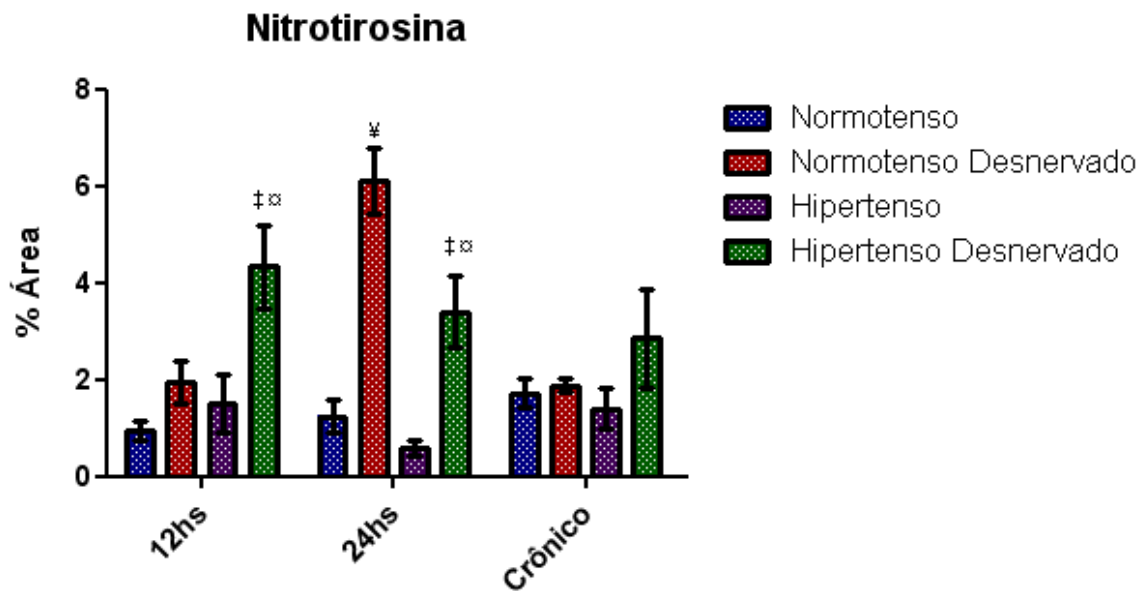
N

ND

H

HD

B)



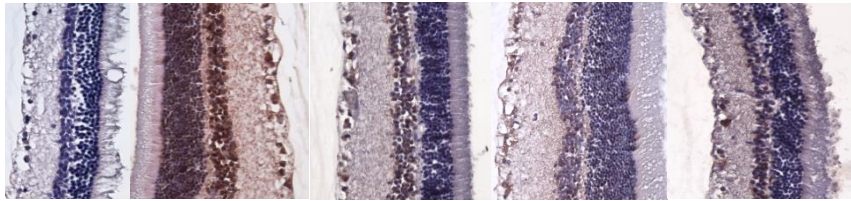
**Figura 17-** A) Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica para quantificação de nitrotirosina retiniana do grupo crônico nos animais Normotensos (N), Normotensos desnervados (ND), Hipertensos (H), Hipertensos desnervados (HD) e Controles negativos (CTR-). A presença de nitrotirosina apresenta tonalidade marrom escuro.

B) Porcentagem de área com nitrotirosina na retina dos grupos Normotenso, Normotenso desnervado, Hipertenso e Hipertenso desnervado. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni.  $\text{¶}$   $p < 0,05$  vs N,  $\text{‡}$   $p < 0,05$  vs ND,  $\text{¶}$   $p < 0,05$  vs H.

#### **5.7.4 Imunohistoquímica para detecção de Caspase-3 na retina**

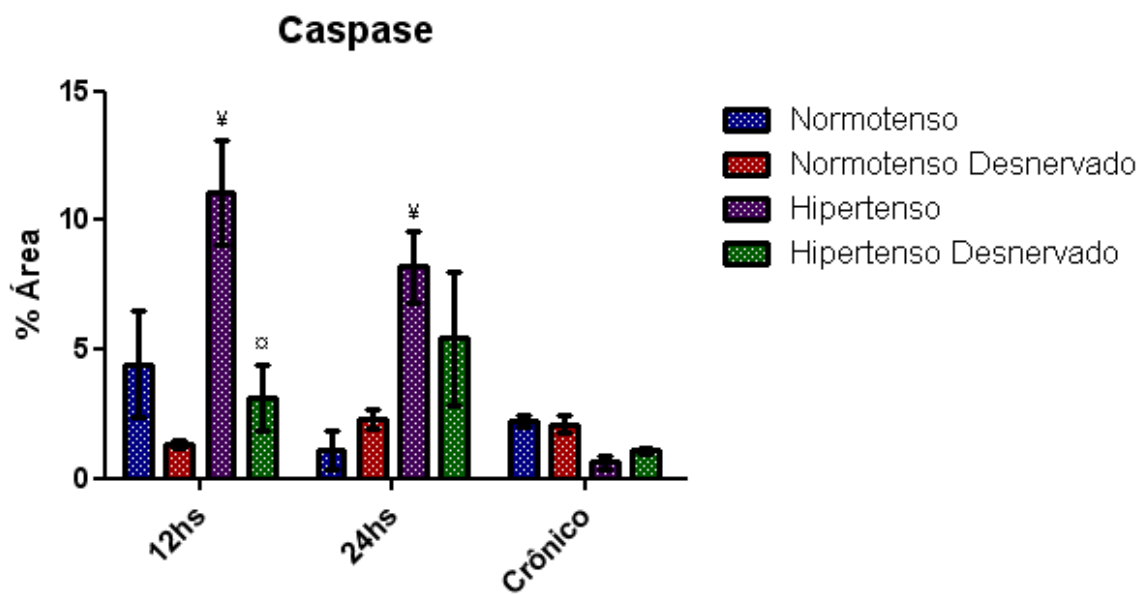
Observou-se maior apoptose retiniana agudamente (12 e 24 h) nos animais hipertensos (H) com redução importante cronicamente. Aparentemente a DSA não apresentou interferência neste parâmetro (Figura 18).

A)



CTR-      N                      ND                      H                      HD

B)



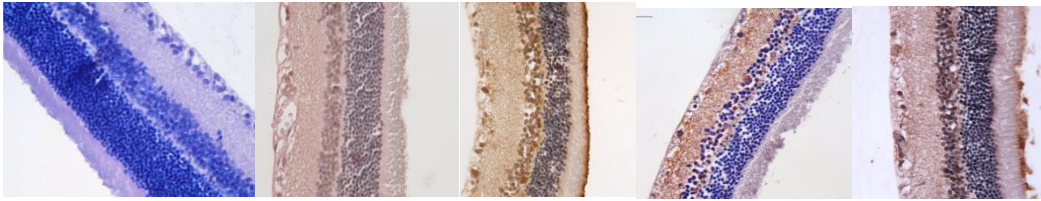
**Figura 18-A)** Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica para quantificação de Caspase-3 retiniana do grupo crônico nos animais Normotensos (N), Normotensos desnervados (ND), Hipertensos (H), Hipertensos desnervados (HD) e Controles negativos (CTR-). A presença de Caspase-3 apresenta tonalidade marrom escuro.

B) Porcentagem de área com Caspase-3 na retina dos grupos Normotenso, Normotenso desnervado, Hipertenso e Hipertenso desnervado. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni. ¥  $p < 0,05$  vs N,  $\alpha$   $p < 0,05$  vs H.

#### **5.7.5 Imunohistoquímica para detecção de VEGF na retina**

Observou-se importante relação da disfunção barorreflexa com os níveis de VEGF retinianos em todos os momentos (ND e HD). Interessante ressaltar que os níveis de VEGF foram aumentando com o tempo, atingindo maiores percentuais nos animais desnervados crônicos. A HAS isoladamente, não apresentou interferência neste marcador (figura 19).

A)



CTR-

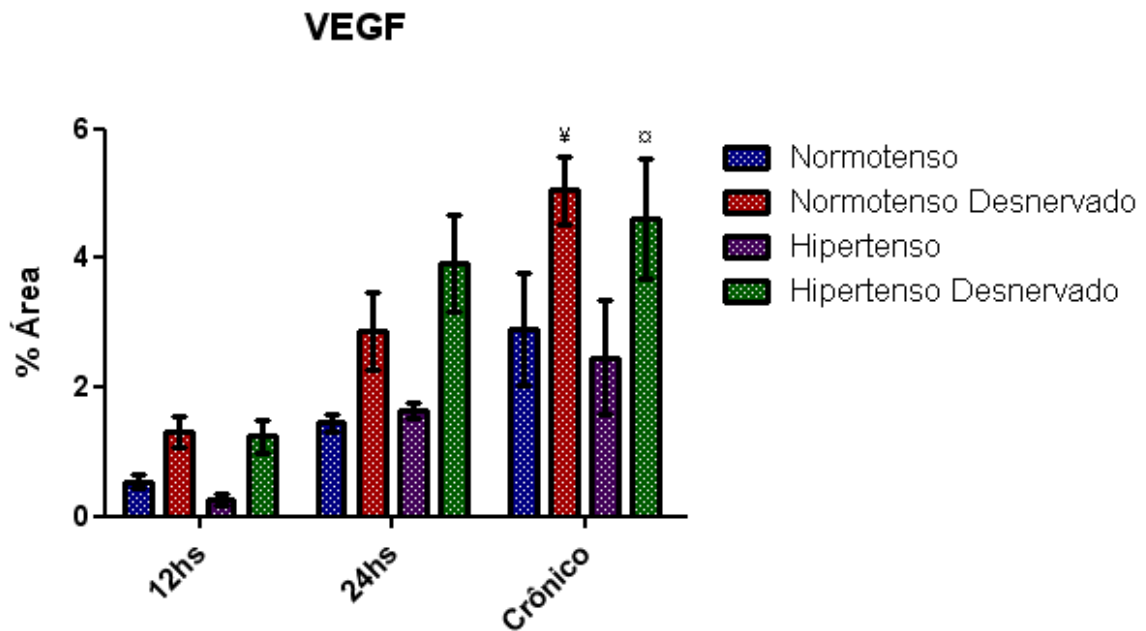
N

ND

H

HD

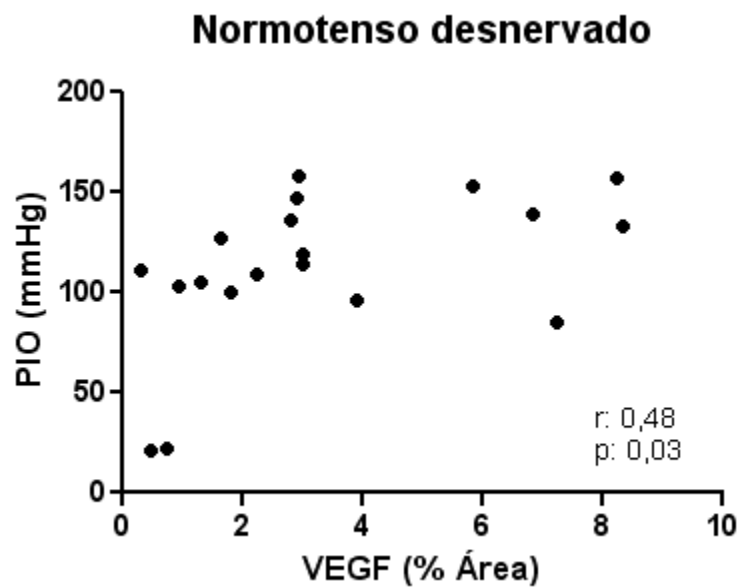
B)



**Figura 19:** A) Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica para quantificação de VEGF retiniano do grupo crônico nos animais Normotensos (N), Normotensos desnervados (ND), Hipertensos (H), Hipertensos desnervados (HD) e Controles negativos (CTR-). A presença de VEGF apresenta tonalidade marrom escuro. B) Porcentagem de área com VEGF na retina dos grupos Normotenso, Normotenso desnervado, Hipertenso e Hipertenso desnervado. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA – 2 fatores com teste complementar de Bonferroni.  $\dagger$   $p < 0,05$  vs N,  $\ddagger$   $p < 0,05$  vs. H.

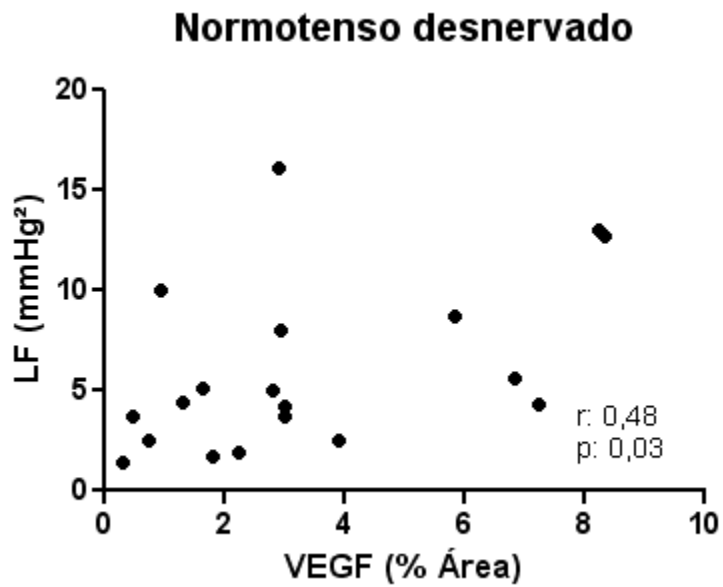
## 5.8 Correlações entre variáveis

Na figura 20 observa-se relação positiva entre PIO e VEGF ( $r: 0,48$  e  $p:0,03$ ). O VEGF muitas vezes é produzido em resposta a situações de “agressão” tecidual, o que faz sentido nesta situação.

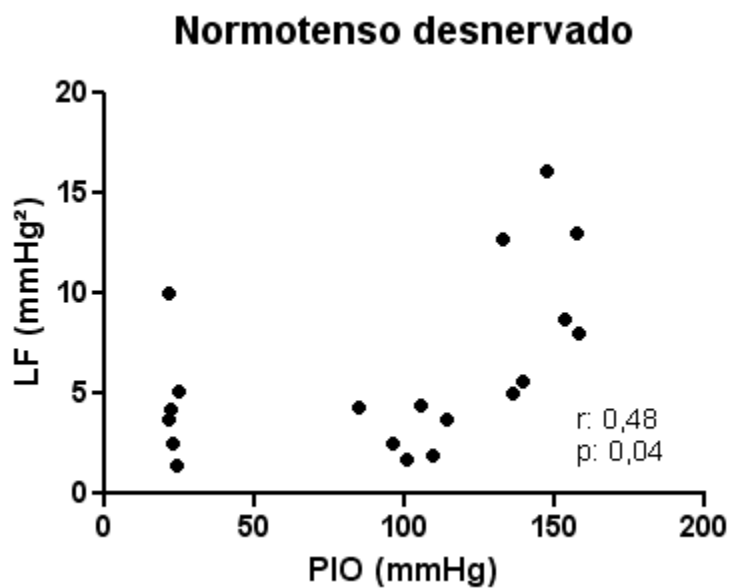


**Figura 20-** Correlação entre porcentagem de área de VEGF e pressão intraocular em normotensos desnervados

Nas figuras abaixo (Figura 21 e Figura 22) observamos relação do componente simpático da PA com VEGF e PIO.



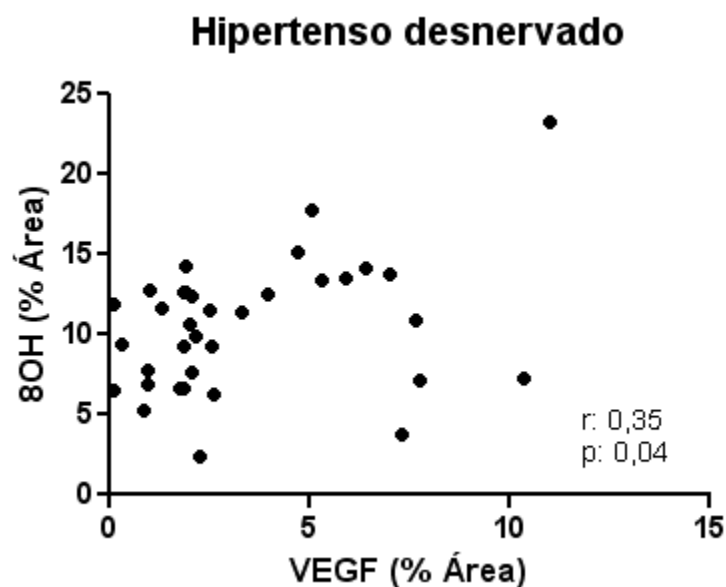
**Figura 21-** Correlação entre porcentagem de área de VEGF e LF da pressão em normotensos desnervados



**Figura 22-** Correlação entre pressão intraocular e LF da pressão em normotensos desnervados

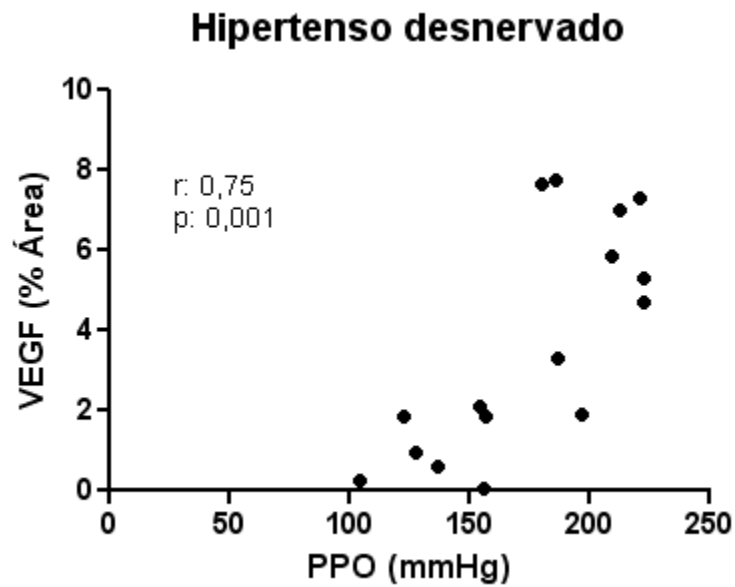


Na Figura 23 observa-se importante relação entre estresse oxidativo retiniano e VEGF, nos animais hipertensos desnervados. Tal associação tem sido descrita em doenças como retinopatia diabética, DMRI e oclusões vasculares retinianas (Kowluru RA, 2003).



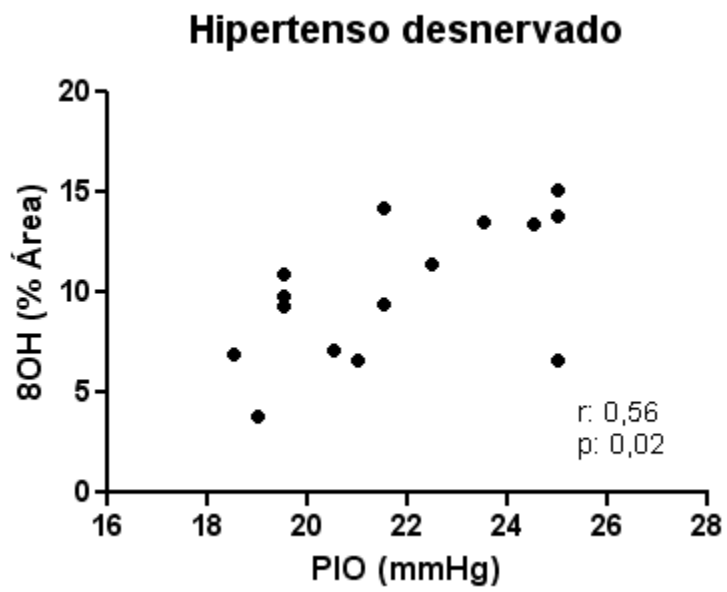
**Figura 23-** Correlação entre porcentagem de área de VEGF e porcentagem de área de 8OH em hipertensos desnervados

O aumento da PPO associado a maior produção de VEGF retiniano nos animais HD, corrobora a ideia de que quando a perfusão ocular atinge níveis muito elevados, pode haver dano tecidual com consequente liberação de “fatores de proteção” como o VEGF (Figura 24)



**Figura 24-** Correlação entre pressão de perfusão ocular e porcentagem de área de VEGF em hipertensos desnervados

A Figura 25 mostra correlação estatisticamente significativa entre a PIO e a positividade de células 8-OHdG na retina ( $p=0,01$  e  $R= 0,55$ ), sugerindo que quanto maior for a PIO maior pode ser o dano oxidativo retiniano. PIO (mmHg), 8OH (% de área).



**Figura 25-** Correlação entre pressão intraocular e porcentagem de área de 8OH em hipertensos desnervados

## **6. Discussão**

---

Os principais achados observados foram:

### **Avaliações hemodinâmicas**

- Aumento da variabilidade da PA nos animais normotensos desnervados e nos hipertensos desnervados crônicos, sem modificar a PA eo IPbasais.

### **Avaliações autonômicas**

- Redução da sensibilidade do barorreflexo nos animais desnervados;
- Aumento da modulação simpática vascular nos animais hipertensos.

### **Avaliação da pressão de perfusão ocular e pressão intraocular**

- Aumento da PPO nos animais hipertensos com aumento adicional nos hipertensos desnervados crônicos;
- Aumento da PIO nos animais com desnervação crônica.

### **Avaliações morfométricas**

- Aumento do dano oxidativo ao DNA das células retinianas nos animais hipertensos desnervados (24 h e crônicos);
- Aumento agudo (12 e 24h) do dano celular retiniano pela nitrotirosina nos animais desnervados com diminuição destedano cronicamente;

- Aumento agudo (12h DSA) da expressão de receptores AT1 da Ang II no tecido retiniano, com diminuição após 24 horas e novo aumento dos níveis de AT1 cronicamente, especialmente nos animais hipertensos não desnervados;
- Níveis de VEGF retiniano diminuídos na DSA precoce (12 e 24 h) e aumentados nos animais desnervados cronicamente;
- Aumento agudo da apoptose especialmente nos animais hipertensos (24 h) com diminuição importante destes níveis cronicamente.

### **6.1 Avaliações Hemodinâmicas e Autonômicas**

A DSA nos ratos descrita originalmente por Krieger, 1964, é uma forma de se avaliar o papel do barorreflexo em situações patológicas e fisiológicas (Alexander et al., 1980; Osborn e England, 1990; Irigoyen et al., 1988; Miao et al., 2006 e Moraes e Silva, 2010.). Tal procedimento cirúrgico determina agudamente elevação da PA e o aumento da sua variabilidade (Krieger, 1970, 1984). Na fase crônica ocorre normalização da PA e persistência da variabilidade (Barres et al., 1992; Miao et al., 2006; Piratello et al., 2010). A manutenção do aumento da variabilidade da PA na DSA crônica (Irigoyen et al., 1995) tem confirmado o uso da DSA como modelo de variabilidade da PA.

No presente trabalho utilizaram-se dois grupos “agudos” isto é, animais avaliados 12 e 24 horas após a desnervação sino aórtica e um grupo crônico com 10 semanas de desnervação, isto permitiu entender melhor ou eliminar a suposição de alguns mecanismos nas respostas crônicas.

Os animais hipertensos desnervados (HD 24 e HDC) e os normotensos, não apresentaram mudanças na PA basal (exceto NDC) e mantiveram a variabilidade da PA cronicamente aumentada ao fim do período de estudo, confirmando trabalhos prévios com animais desnervados cronicamente (Irigoyen et al., 1995). Conforme o esperado, no presente estudo detectaram-se valores elevados de PAS nos ratos hipertensos quando comparados aos normotensos. Além disso, houve aumento da variabilidade da PA nos animais normotensos desnervados e nos hipertensos desnervados crônicos, sem modificar a PA e o IP basais, semelhantes ao estudo de Piratello et al., 2010.

O controle reflexo da PA é determinado por inúmeros mecanismos, porém o controle exercido pelos barorreceptores arteriais é considerado o mais importante mecanismo de controle reflexo da PA, momento a momento.

Neste trabalho, foi utilizado o modelo desenvolvido por Okamoto e Aoki, (1963); de hipertensão primária (SHR) por se tratar de um modelo experimental universalmente utilizado no estudo da HA. Esse modelo apresenta características semelhantes com as encontradas em humanos, como alterações neurais, vasculares e lesões de órgãos-alvo. A pressão arterial desses ratos eleva-se a partir de 5-6 semanas de idade podendo atingir valores sistólicos de 180- 200 mmHg quando adultos (Trippodo e Frohlich 1981). Nossos achados corroboram com a literatura em relação aos valores de PAS, PAD e PAM do grupo SHR (Hayward, Johnson et al. 1999; Moraes-Silva, De La Fuente et al. 2010; Piratello, Moraes-Silva et al. 2010).

Após observar as respostas hemodinâmicas, avaliamos a sensibilidade barorreflexados diferentes grupos pelo chamado índice alfa, que analisa as

variações espontâneas da PA e as respostas associadas da FC. Observou-se que os animais desnervados apresentaram menor sensibilidade barorreflexa comparados aos seus controles, confirmando em parte, achados prévios do nosso laboratório (Moraes-Silva, De La Fuente et al. 2010; Piratello, Moraes-Silva et al. 2010; Flues, Moraes-Silva et al. 2012) que encontraram redução da sensibilidade barorreflexa também nos animais hipertensos.

Adicionalmente observou-se que os animais hipertensos apresentaram aumento da modulação simpática vascular em relação aos normotensos independentemente da variabilidade da PA. Esse achado sugere que a hipertensão arterial, independente da DSA, pode estar associada a um aumento da modulação simpática cardíaca. Demonstrou-se também, que o aumento da variabilidade da PA, induzida pela DSA em ratos geneticamente hipertensos, causou dano oxidativo retiniano. Tais observações sugerem que a variabilidade da PA pode ser um dos mecanismos que determinam ou exacerbam lesões retinianas (órgão-alvo). De maneira análoga, Miao et al, 2006 demonstraram que a variabilidade da PA pode determinar lesões em outros órgãos como coração, rins e aorta, independentemente dos valores da PA. Recentemente, Lattanzi et al, 2014, observaram que a variabilidade da PA pode ser considerada um fator de risco (vascular) para declínio cognitivo em pacientes com doença de Alzheimer.



## 6.2 Avaliações da pressão de perfusão ocular e pressão intraocular

No presente estudo, observou-se aumento da PPO em ratos geneticamente hipertensos (24 h e crônicos) com aumento adicional nos hipertensos desnervados crônicos.

Pressão de perfusão de um órgão é definida como a diferença das pressões arterial e venosa e é a força motora para o fluxo sanguíneo. Considerando que a pressão venosa ocular é igual ou levemente maior que a PIO (Glukberg and Dunn. 1993; Maepea, 1992), a PPO pode ser estimada como a diferença entre a pressão arterial e a PIO. As medidas da PPO em seres humanos podem ter muita variação, dependendo da posição do paciente, isto porque especialmente na posição ereta, a pressão da artéria braquial é diferente da artéria oftálmica, que é a base da medida da PPO. Em ratos, esta medida é mais consistente pela posição supina e pelo fato da metodologia de medidas da PA utilizada no presente estudo ser direta, portanto com resultados mais fidedignos.

No presente estudo, observamos pouca variação da PIO nos diferentes grupos, exceto nos desnervados crônicos. Leske et al, 2003, demonstraram a HAS estava associada a uma leve elevação da PIO em seres humanos. De maneira similar, no Blue Mountains Eye Study (Mitchell et al.,1996), a PIO média aumentou 0,28 mmHg para cada 10 mmHg de aumento na PA sistólica ou 0,52 mmHg para cada 10 mmHg de aumento na PA diastólica. A correlação entre HAS e aumento da PIO foi também observada em ratos (Vaajanen A. et al, 2008) e em coelhos ( Harrison et al, 1997). A base fisiológica da relação PA x PIO permanece obscura. Tem sido postulado que tanto a PIO quanto a PA

podem ser dirigidas por um fator extrínseco comum como o tônus simpático. (Harrison et al, 1997), Observamos correlação entre estas variáveis no presente estudo ( $r:0,48$   $p:0,04$ ) . Outro fato interessante encontrado no presente estudo foi a correlação existente entre PIO e marcador de estresse oxidativo retiniano (8OH -dG) apenas nos animais hipertensos desnervados crônicos ( $r: 0,56$  e  $p:0,02$ ). Esta relação não foi observada nos animais normotensos nem nos hipertensos intactos, sugerindo que a HAS associada à disfunção barorreflexa pode ter algum papel sobre os efeitos deletérios da PIO sobre o tecido retiniano.

A HAS tende a incrementar a pressão das artérias ciliares, desta forma aumentando o componente de ultrafiltração para produção do humor aquoso e, portanto aumentando a PIO (Carel et al., 1984 ; Pederson et al, 1973). Além disso, o aumento da PA pode produzir uma pequena elevação na pressão venosa com diminuição do “clearance” do humor aquoso e consequente aumento da PIO. Apesar da correlação existente entre PIO e PA, a relação entre a hipertensão arterial e o glaucoma é controversa, tendo sido observada por alguns autores e contestada por outros.

Recentemente o estudo “Los Angeles Latino Eye Study” (Memarzadeh et al, 2010), demonstrou que pacientes com maior pressão arterial diastólica apresentaram três vezes mais quadro de degeneração macular relacionada à idade. Neste estudo não foi avaliada variabilidade da PA. Este mesmo trabalho demonstrou que tanto as pressões diastólicas baixas e sistólicas altas estavam associadas à maior prevalência de glaucoma de ângulo aberto. Este aparente paradoxo pode ser explicado por dois fatores: pacientes com hipotensão arterial apresentam baixa PPO levando a diminuição da perfusão da cabeça do

nervo óptico e conseqüente estresse oxidativo (isquemia-reperfusão) e segundo, os pacientes com HAS crônica podem ter comprometimento da autorregulação do fluxo sanguíneo da cabeça do nervo óptico provavelmente por fatores como arteriosclerose. (Mozaffarieh M et al, 2013).

Vários trabalhos avaliam estresse oxidativo retiniano relacionado com a diminuição da pressão de perfusão ocular, processo de isquemia – reperfusão, especialmente no glaucoma (Flammer et al.,2002,Kaiser et al., 1993, Mozaffarieh et al., 2013) .Por outro lado, Varma et al.,2004, demonstraram que pacientes com maior pressão de perfusão ocular apresentaram maior chance de desenvolver degeneração macular relacionada à idade ( DMRI), mostrando que também a maior PPO pode estar associada a doenças degenerativas vasculares oculares. No presente estudo observou-se correlação positiva entre aumento daPPO e VEGF, sugerindo uma possível ação deletéria do aumento da PPO ao tecido retiniano. Doenças vasculares retinianas graves como trombozes venosas retinianas, frequentemente associam-se a níveis elevados de VEGF retiniano e HAS (Rosa, 2003).

No presente estudo, observou-se que animais hipertensos com DSA crônica, apresentaram maior PPO, sugerindo um possível efeito deletério do aumento crônico da PPO não apenas relacionado à HAS, mas também associado à disfunção barorreflexa.

Outros estudos têm associado glaucoma à disfunção autonômica (Riccadonna M et al, 2003; Wierzbowska et al,2012) e à apneia obstrutiva do sono (Lin et al,2011), doença que também tem relação com maior VPA(Fletcher ,2013). Apesar de bastante conhecida a relação entre glaucoma e oclusões vasculares retinianas, e do papel do estresse oxidativo na

fisiopatologia destas doenças, não existem estudos avaliando a participação da VPA como fator comum destas afecções.

Diante de evidências clínicas relacionando doenças oculares a disfunção autonômica, e o fato de haver estresse oxidativo no glaucoma, degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e oclusões vasculares, os achados do nosso trabalho relacionando VPA e estresse oxidativo retiniano, podem abrir horizontes para futuras pesquisas estabelecendo a VPA como elo entre estas doenças.

### **6.3 Sistema renina - angiotensina**

Nos últimos anos, estudos demonstraram que o sistema renina angiotensina (SRA) que outrora acreditava restringir-se às ações na regulação da pressão arterial e homeostase dos eletrólitos, tem também atuação parácrina/autócrina em diversos tecidos, incluindo ações nos olhos (de Gooyer et al., 2004 e Re, 1984). O presente estudo confirmou a presença de tal sistema em tecidos oculares (retina).

A hipertensão arterial sistêmica tem sido implicada na gênese de lesões de órgãos-alvo, assim como o SRA e a variabilidade da PA (Miao, 2002 e 2006 et al., Schmieder et al., 2006). No presente estudo observamos que animais submetidos à DSA apresentaram agudamente (12 horas após DSA), maior expressão de receptores AT1 da Ang II no tecido retiniano, com diminuição após 24 horas e novo aumento dos níveis de AT1 cronicamente, especialmente nos animais hipertensos não desnervados. Tal comportamento pode ser justificado pelo fato dos animais com desnervação precoce

apresentarem, além de maior variabilidade da PA, um forte componente hipertensivo. Irigoyen et al, 1995 demonstraram que na DSA aguda (6 horas), o componente hipertensivo é maior que nos animais com DSA mais tardia (20 dias). Amenor atuação deste componente, cronicamente, poderia explicar tal comportamento. Portanto, o aumento da expressão dos receptores AT1 retinianos parece estar mais relacionado à própria HAS e menos relacionado com sua maior variabilidade.

Sabe-se que os receptores AT1 têm importante papel na patologia celular incluindo apoptose, hipertrofia, neovascularização, inflamação e fibrose, que podem ser dependentes ou não dos efeitos da pressão arterial (Benigni et al., 2010; Moravski et al., 2003; Savoia et al., 2011; Stegbauer et al., 2011; Willis et al., 2010).

Zamo et al, 2009, sugerem que a disfunção autonômica e a modulação do SRA são fatores que contribuem para lesões em órgãos-alvo na hipertensão arterial sistêmica e estes podem interagir.

Shan et al., 2003, observaram aumento dos níveis de Ang II em tecidos cardíacos e renais de ratos submetidos a DSA crônica, e estes níveis de Ang II tinham um maior incremento quando estes animais eram submetidos a estresse crônico, sugerindo que o aumento da variabilidade da PA e a liberação de Ang II poderia estar relacionada ao desenvolvimento de lesão de órgão alvo induzida por disfunção barorreflexa. De maneira análoga observamos em nosso estudo, fenômeno muito semelhante em retina de ratos (agudamente).

O estudo EURODIAB EUCLID (Chatuverdi et al., 1998) demonstrou que o Lisinopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina 1 (ECA1)

reduziu o risco da progressão da retinopatia diabética. Entretanto, não ficou claro se estes resultados foram mais dependentes da diminuição da pressão arterial ou de mecanismos de bloqueio local (ocular) do SRA. Mais recentemente, o estudo DIRECT -Diabetic Retinopathy Candesartan Trial (Chatuverdi et al., 1998 e Sjolie et al., 2008) onde foi utilizado Candesartan, um bloqueador dos receptores AT1 da angiotensina II, mostrou que tal droga reduziu a incidência de retinopatia diabética em 35% em pacientes diabéticos tipo I e reduziu a progressão da retinopatia diabética em pacientes tipo II, em 34% (pacientes com retinopatia não proliferativa inicial), sugerindo um papel do SRA na fisiopatologia da retinopatia diabética.

O estudo RASS (Mauer et al, 2009) comparou a progressão da retinopatia diabética sob o uso de duas classes de inibidores do SRA, um inibidor da ECA1 e um bloqueador dos receptores AT1. Ambos reduziram a progressão da retinopatia diabética em 60 e 65% de pacientes com retinopatia diabética não proliferativa ou sem retinopatia. Tratamento com bloqueador dos receptores AT1 (Losartana), em estudo envolvendo modelo animal de diabetes e hipertensão arterial demonstrou pela primeira vez, efeitos de neuro proteção na retinopatia diabética ao restabelecer as funções redox oxidativas e mitocondriais (Silva et al., 2009).

Yang et al, 2009, mostraram que a PIO cronicamente elevada em um modelo de glaucoma em ratos, determinava aumento da expressão de receptores AT1 na retina e o tratamento com Candesartan (bloqueador de receptor AT1) foi efetivo em prevenir a morte celular. A maior expressão destes receptores poderia também ser explicada pelo estímulo “mecânico” excessivo no modelo de glaucoma utilizado. Há muitas críticas a estes modelos

de glaucoma visto que uma porcentagem alta de pacientes com glaucoma não apresentam aumento da PIO.

De qualquer forma, futuros estudos podem ser realizados para validação da DSA como possível modelo indutor de doença vascular retiniana sem “agredir” o globo ocular. Vale lembrar que em modelos animais atualmente utilizados para avaliar glaucoma (Chen et al., 2011; Cone et al., 2010; Pease et al., 2011; Sappington et al., 2010), observam-se na retina, altas taxas de apoptose e estresse oxidativo, sendo estes dados muitas vezes superestimados, pelo fato da maioria destes modelos determinarem grande traumatismo ocular mecânico com injeções intraoculares repetidas ou extensas cauterizações (Husain et al, 2012).

Uma limitação do presente estudo foi a impossibilidade de avaliar os efeitos de um antagonista do SRA sobre o estresse oxidativo retiniano nestes animais. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que se observa em um modelo de variabilidade da pressão arterial sistêmica, a expressão destes receptores na retina.

#### **6.4 Estresse oxidativo retiniano (dano oxidativo)**

No presente estudo, observou-se aumento do dano oxidativo ao DNA nos animais hipertensos desnervados e aumento dos níveis de nitrotirosina retiniano, especialmente nos animais desnervados agudamente, mostrando pela primeira vez em modelo animal, correlação não apenas da HAS com lesão de órgão-alvo (ocular), mas principalmente, o papel do aumento da variabilidade da PA associado a estresse oxidativo retiniano.

O termo radical livre envolve várias moléculas reativas como, por exemplo, as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. O aumento da nitração de proteína retiniana (nitrotirosina), presumidamente pelo peroxinitrito e maior dano ao DNA retiniano (8OHdG) induzidos pela HAS e especialmente, pelo aumento da variabilidade da PA, sugerem que tanto o óxido nítrico e superóxido estão presentes em quantidade excessiva na retina. Du et al,2002 observaram o mesmo em animais diabéticos. A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) tem sido implicada na morte celular retiniana e sua formação é via final comum para neurotoxicidade em uma variedade de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas. (Dani et al., 2004 e Baskol et al., 2006).

O dano oxidativo tem sido implicado na patogênese de diversas doenças oculares graves como glaucoma, retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade, oclusões vasculares retinianas, dentre outras (Bastianetto e Quirion,2004). O entendimento da fisiopatologia e o tratamento de tais afecções ainda não são totalmente compreendidos. A Hipertensão Arterial Sistêmica tem sido implicada na gênese de lesões de órgão-alvo, assim como o SRA e a variabilidade da PA (Miao, 2002 e 2006 et al., Schmieder et al., 2006).

Pinto et al., 2007 observaram que a hipertensão arterial sistêmica exacerbou o estresse oxidativo em retina de ratos experimentalmente diabéticos. Observaram também, aumento da expressão de 8-OHdG na retina dos ratos normotensos com diabetes e em ratos hipertensos com diabetes , com maior expressão de 8-OHdG nas retinas dosanimais com HAS e diabetes, demonstrando que a HAS pode ter papel no dano oxidativo retiniano.



Encontramos maior dano oxidativo nos animais hipertensos com maior variabilidade da PA. Vale lembrar, que em animais que foram submetidos a DSA, especialmente cronicamente, há aumento da variabilidade da PA sem, no entanto apresentar aumento da PA basal. Logo, pode-se concluir que a disfunção baroreflexa pode ser fator que independente da PA, é capaz de causar dano oxidativo retiniano levando à lesão de órgão-alvo.

O comportamento do marcador de estresse oxidativo 8-OHdG foi bastante peculiar em relação aos animais SHR. Observou-se que nestes animais, houve uma diminuição paradoxal dos níveis deste marcador em relação até aos controles normotensos. Uma possível explicação poderia ser pelo efeito Hormese, isto é, a hipertensão arterial possivelmente determinou dano oxidativo que foi “compensado” pela ação antioxidativa retiniana, já com a HAS associada à disfunção barorreflexa, o mesmo não ocorreu, houve maior estresse oxidativo, evidenciando que possivelmente, a variabilidade de PA associada à HAS foi capaz de exceder a capacidade antioxidante tecidual retiniana. Outros autores observaram que baixas concentrações de radicais livres gerados por estresse oxidativo leve, poderiam ativar vias de sinalização que aumentam a resistência dos neurônios a estresses mais severos (Otani et al, 2004; Juhaszova et al. 2004, Wang, 2013).

A reoxigenação dos tecidos retinianos durante um período de reperfusão determina excesso de produção de ERO e de espécies reativas de nitrogênio em ratos. Estes radicais livres podem contribuir diretamente para o dano de estruturas celulares ou indiretamente através da modulação de vias de sinalização no processo de morte celular (Kuriyama et al., 2001).

Raros são os dados da literatura correlacionando disfunção barorreflexa e doenças vasculares oculares.

Outro dado marcante foi o comportamento temporal dos níveis de VEGF retinianos. Observou-se aumento gradual destes níveis com o passar do tempo de desnervação, especialmente nos animais com maior variabilidade da PA. Sugerindo relação entre disfunção barorreflexa e VEGF. Tal constatação pode ter extrema relevância científica futura, visto que as terapias Anti-VEGF são praticamente a única alternativa para doenças oculares retinianas graves na atualidade, além da sua importância, cada vez maior no controle de certos tipos de neoplasias como coloretal, cerebral e mama (Blankenberg et al,2010).

O VEGF é produzido em resposta a vários estímulos como isquemia-reperfusão e condicionamento isquêmico. Trata-se de substância que aumenta permeabilidade vascular e promove angiogênese. Embora os tratamentos Anti-VEGF estejam bastante difundidos e eficazes, especialmente no tratamento da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) onde a inibição da angiogênese é o alvo da terapia, começa-se a observar que pacientes tratados cronicamente com múltiplas injeções de anti-VEGF, vem desenvolvendo atrofia retiniana em longo prazo, com consequente cegueira (Martinez-de-la-Casa et al,2012; Park et al, 2014).

Recentemente, em modelo experimental, (Xue et al, 2014; Falk et al, 2011) observou-se que o VEGF é potencial agente neuroprotetor para doença de Parkinson. De maneira análoga, Foxton et al, 2013, demonstraram efeito neuroprotetor do VEGF em células retinianas.

Uma grande quantidade de estudos que avaliam doenças degenerativas retinianas, relaciona estresse oxidativo com maior taxa de

apoptose (Kerrigan et al, 1997). No presente estudo, ao avaliar as características da apoptose retiniana em seu contexto temporal, observamos que inicialmente, especialmente os animais hipertensos, tiveram tendência a maior apoptose retiniana (12 e 24 horas) com paradoxal diminuição dos níveis de Caspase-3 cronicamente. Se observarmos o comportamento temporal dos níveis de VEGF retiniano nos mesmos animais, observamos o oposto, níveis diminuídos inicialmente e aumentados cronicamente. Uma possível explicação seria pelo maior estresse oxidativo induzido pela disfunção barorreflexa crônica, observada nos animais hipertensos desnervados, resultarem maior produção de VEGF, cuja ação neuroprotetora determinou menores concentrações de Caspase-3 retiniana, um marcador de apoptose. Alguns estudos relacionam o inverso do que encontramos, maior estresse oxidativo com maiores taxas de apoptose, isto pode ocorrer por vieses metodológicos, ao utilizarem, por exemplo, o método TUNEL para avaliar apoptose retiniana (Kerrigan et al, 1997). Tal técnica além de marcar células apoptóticas pode também marcar células necróticas, muitas vezes superestimando resultados (Gasl-Kraupp et al, 1995).

Outra limitação do presente estudo, foi não podermos observar a resposta funcional e celular retiniana após terapia anti VEGF nestes animais. Isto acabou não sendo realizado pelo fato de não esperarmos este comportamento inesperado, de aumento de estresse oxidativo retiniano com menor apoptose.

## **7. Conclusão**

---

Concluimos a partir deste estudo, que além da própria HAS, a variabilidade da PA pode não apenas determinar variações na pressão de perfusão ocular, mas também induzir dano oxidativo às células retinianas.

Tais achados podem dar suporte a estudos populacionais, especialmente em doenças como glaucoma, degeneração macular relacionada à idade e oclusões vasculares retinianas.

## **8. Referências Bibliográficas**

1. Alcazar O, Cousins SW, Striker GE, Marin-Castano ME. (Pro)renin receptor is expressed in human retinal pigment epithelium and participates in extracellular matrix remodeling. *Exp Eye Res.* 2009; 89(5): 638–647.
2. Alexander N, Velasquez MT, Decuir M, Maronde RF. Indices of sympathetic activity in the sinoaortic-denervated hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1980; 238(4): H521-6.
3. Alm A. Negative consequences of blood pressure reduction. Systemic blood pressure and the eye. *Acta Med Scand Suppl.* 1979; 628: 81-3.
4. Anderson RE, Rapp LM, Wiegand RD. Lipid peroxidation and retinal degeneration. *Current Eye Research.* 1984; 1(3): 223–227.
5. Argon Laser Photocoagulation for macula edema in branch vein occlusion. Branch Vein Occlusion Study Group *Am J Ophthalmol.* 1984; 98(3): 271-82.
6. Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med.* 2000; 86(6): 615– 621.
7. Banday A.A., Lokhandwala M.F. Oxidative stress-induced renal angiotensin AT1 receptor upregulation causes increased stimulation of sodium transporters and hypertension. *Am. J Physiol. Renal Physiol.* 2008; 295(3): 698–706.
8. Barres C, Lewis SJ, Jacob HJ, Brody MJ. Arterial pressure lability and renal sympathetic nerve activity are dissociated in SAD rats. *Am J Physiol.* 1992; 263(3 pt 2): R 639-46.
9. Baskol G, Karakucuk S, Oner AO, et al. Serum paraoxonase 1 activity and lipid peroxidation levels in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmologica.* 2006; 220(1):12–16.
10. Bastianetto, S, Quirion, R.. Natural antioxidants and neurodegenerative diseases. *Front. Biosci.* 2004; 9: 3447-3452.

11. Bayliss, WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J. Physiol.* 1902; 28(3): 220-231.
12. Beatty S, Koh H, Henson D, Boulton, M. *Surv. Ophthalmol.* 2000; 45(2):115–134.
13. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271(5 pt 1): C1424-C1437.
14. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med.* 2010; 2(7): 247–57.
15. Beutler E, Durono, Mikus B. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963; 16: 882-888.
16. Billet S, Aguillar F, Baudry C, Clauser E. Role of angiotensin II AT1 receptor activation in cardiovascular diseases. *Kidney Int.* 2008; 74(11): 1379– 1384.
17. Biswas SK, Lopes de Faria JB. Does peroxynitrite sustain nuclear factor- $\kappa$ B? *Cardiovasc Res.* 2005; 67(4): 745-746.
18. Blankenberg FG, Levashova Z, Sarkar SK, Pizzonia J, Backer MV, and Backer JM. Noninvasive assessment of tumor VEGF receptors in response to treatment with pazopanib: a molecular imaging study. *Transl Oncol.* 2010; 3(1): 56-64.
19. Bosco A, Lerário AC, Soriano D, Santos RF, Massote P, Galvão D, Franco ACHM, Purisch S, Ferreira AR. Retinopatia diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005; 49(2): 217-227.
20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254.



21. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Frncke M, Wiedmann P, Skatchkov S, Osborne N, Reichenbach A. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Retinal and Eye Research*. 2006; 25(4):397-424.
22. Bui BV, Armitage JA, Tolcos M, Cooper ME, Vingrys AJ. ACE inhibition salvages the visual loss caused by diabetes. *Diabetologia*. 2003;46(3):401-408.
23. Burlacu, A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med*. 2003; 7(3):249-57 .
24. Bulpitt CJ, Hodes C, Everitt MG. Intraocular pressure and systemic blood pressure in the elderly. *Br J Ophthalmol*. 1975; 59(12):717-20.
25. Burrell, L. M., Johnston, C. I., Tikellis, C., & Cooper, M. E.. ACE2, a new regulator of the renin–angiotensin system. *Trends Endocrinol. Metab* 2004; 15(4):166-169.
26. Bursell SE, Clermont AC, Shiba T, King GL. Evaluating retinal circulation using video fluorescein angiography in control and diabetic rats. *Current Eye Res*. 1992; 11(4):287–295.
27. Bursell SE, Clermont AC, Aiello LP, Aiello LM, SchlosmannN DK, Feener EP, Laffel L, King GL High-dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*.1999; 22(8):1245-1251.
28. Butt Z, Mc Kilopp G, O Brien C, Allan P, Aspinall P. Measurement of ocular blood velocity using colour Doppler imaging in low-tension glaucoma. *Eye (Lond)* 1995; 9(pt1):29-33.
29. Caldwell RB, El-Remessy AB, Abou-Mohamed G, Caldwell RW. High glucose-induced tyrosine nitration in endothelial cells: role of eNOS uncoupling and aldose reductase activation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2003; 44(7): 3135-43.
30. Carel RS, Korczyn AD, Rock M, Goya I. Association between ocular pressure and certain health parameters. *Ophthalmology*. 1984; 91(4): 311-314.

31. Chaturvedi, N., Sjolie, A. K., Stephenson, J. M., Abrahamian, H., Keipes, M., Castellarin, A., Roguija-Pepeonik, Z., Fuller, J.H. and the EUCLID Study Group. (1998) Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet*. 351(9095): 28-31.
32. Chaturvedi N, Porta M, Klein R, Orchard T, Fuller J, Parving HH, Bilous R, Sjølie AK; DIRECT Programme Study Group. Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials. *Lancet*. 2008; 372(9647):1394–1402.
33. Chen H, Wei X, Cho KS, Chen G, Sappington RM, Calkins D, Chen DF. Optic neuropathy due to microbead-induced elevated intraocular pressure in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2011; 52(1):36–44.
34. Cheng X.W., Murohara T., Kuzuya M. et al. Superoxide-dependent cathepsin activation is associated with hypertensive myocardial remodeling and represents a target for angiotensin II type 1 receptor blocker treatment. *Am. J. Pathol*. 2008; 173(2): 358–369.
35. Chou P., Lu, D.W., Chen, J.T. Bilateral superior cervical ganglionectomy increases choroidal blood flow in the rabbit. *Ophthalmologica*. 2000; 214(6): 421-425.
36. Chou, P.I., Lu, D.W., Chen, J.T. Effect of sympathetic denervation on rabbit choroidal blood flow. *Ophthalmologica*. 2002; 216 (1): 60-4.
37. Chowdhury, I.; Tharakan, B.; Ganapathy, K. B. Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett*. 2006; 11(4): 506-25.
38. Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1401(2):187–194.
39. Cioffi, G.A., Granstam, E., Alm, A., 2003. Ocular circulation. In: Kaufman, P.L., Alm, A. (Eds.), *Adler's Physiology of the Eye*. Mosby, Missouri, pp. 747-776.

40. Collaborative normal tension glaucoma study group.. Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressure. *Am J Ophthalmol* 1998;126:487-497
41. Cone FE, Gelman SE, Son JL, Pease ME, Quigley HA. Differential susceptibility to experimental glaucoma among 3 mouse strains using bead and viscoelastic injection. *Exp. Eye Res.* 2010; 91(32): 415–424.
42. Congdon N, Friedman DS, Lietman T. Important causes of visual impairment in the world today. *JAMA.* 2003; 290(15):2057–60.
43. Consolim-Colombo FM, Filho JÁ, Lopes HF, Sobrinho CR, Otto ME, Riccio GM, Mady C, Krieger EM. Decreased cardiopulmonary baroreflex sensitivity in Chagas' heart disease. *Hypertension.* 2000; 36(6):1035-9.
44. Cowley, AW Jr. Long-term control of arterial pressure. *Physiological Reviews* 1992; 72(1):231-300.
45. Dallago P., Fernandes T.G., Machado U.F., Bello A.A., Irigoyen M.C. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1997; 30(1):119-24.
46. Dani C, Cecchi A, Bertini G. Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant. *Minerva Pediatr.* 2004; 56(4):381–394.
47. Danser AH, van-den-Dorpel MA, Deinum J, et al. Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989; 68(1):160-167.
48. Danser AH, Derkx FH, Admiraal PJ, Deinum J, de Jong PT, Schalekamp MA. Angiotensin levels in the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35(3):1008–1018.
49. Della Croce JT, Vitale AT. Hypertension and eye. *Curr Opin Ophthalmol.* 2008; 19(6):493-8.

50. Dequattro V, Feng M. The sympathetic nervous system: the muse of primary hypertension. *J Hum Hypertens*.2002; 16:suppl 1:s64-9.
51. Ding C, Wang P, Tian N. Effect of general anesthetics on IOP in elevated IOP mouse model. *Exp Eye Res*. 2011; 92(6): 512–520
52. Du Y, Miller CM, Kern TS. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35(11): 1491-1499.
53. Ellis E.A., Grant M.B., Murray F.T. et al. Increased NADH oxidase activity in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat. *Free Rad. Biol. Med*. 1998; 24(1): 111–201.
54. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*. 2004; 567(1): 1-61.
55. Falk T, Yue X., Zhang S.,. McCourt A D, Yee B J, Gonzalez R T., Sherman S J. Vascular endothelial growth factor-B is neuroprotective in an in vivo rat model of Parkinson's disease *Neurosci Lett*. 2011; 496(1): 43–47
56. Fekete GT, Bunzey SM, Ogasawara H, Fujio N, Goger DG, Spack NP, Gabbay KH. Retinal circulatory abnormalities in type 1 diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994; 35(7): 2968–2975.
57. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol*. 2001; 280(6): C1358–C1366.
58. Flammer, J., Orgul, S., Costa, V.P., Orzalesi, N., Kriegelstein, G.K., Serra, L.M., Renard, J.P., Stefansson. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res*. 2002; 21(4): 359-393.
59. Flammer J, Mozaffarieh M: Autoregulation, a balancing act between supply and demand. *Can J Ophthalmol*. 2008; 43(3):317-321.

60. Fletcher EC. Sympathetic overactivity in the etiology of hypertension of obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2003; 26(1): 15–19.
61. Floras JS, HassanMO, Jones JV, Osikowbska BA, Sever PS, Sleight P. Consequences of impaired arterial baroreflexes in essential hypertension: effects on pressor responses, plasma noradrenaline and blood pressure variability. *J Hypertens*. 1988; 6(7): 525-35.
62. Flues, K., I. C. Moraes-Silva, et al. Cardiac and pulmonary arterial remodeling after sinoaortic denervation in normotensive rats. *Auton Neurosci*. 2012; 166(1-2): 47-53.
63. Franchini KG, Krieger, EM. Neurogenic hypertension in the rat. *Handbook of Hypertension. Genetic and Experimental Models of Hypertension (II)*. D. Gantem (Ed.). Elsevier Publisher Co., Amsterdam. 1995.
64. Franchini KG. Ativação da quinase de adesão focal por estímulos mecânicos: função na mecano-transdução e hipertrofia de cardiomiócitos. (Tese de Livre Docência), Universidade Estadual de Campinas, 2003.
65. Fujita T, Hirooka K, Nakamura T, et al. Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor (AT1-R) blocker via modulating AT1-R signaling and decreased extracellular glutamate levels. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2012;53(7): 4099-4110.
66. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*. 1995; 21(5): 1465–1468.
67. Glucksberg, M.R., Dunn, R. Direct measurement of retinal microvascular pressures in the live, anesthetized cat. *Microvasc. Res*. 1993; 45(2): 158-165.
68. de Gooyer TE, Skinner SL, Wlodek ME, Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL. Angiotensin II influences ovarian follicle development in the transgenic (mRen-2)<sup>27</sup> and Sprague-Dawley rat. *J Endocrinol*. 2004;180(2):311–324.

69. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med.* 1989; 82(12): 747-752.
70. Halliwell B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett.* 1997; 411(2-3): 157-160.
71. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141(25): 312-322.
72. Harrison JM, Kiel JW, Smith S. Effect of ocular perfusion pressure on retinal function in the rabbit. *Vision Res.* 1997; 37(17): 2339–2347.
73. Harthmann AD, DE Angelis K, Costa LP, Senador D, Sschaan BD, Krieger EM, Irigoyen MC. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. *Auton Neurosci.* 2007; 133(2): 115-20.
74. Hayreh SS, Zimmerman MB, Podhajski P, Alward WLM. Nocturnal arterial hypotension and its role in optic nerve head and ocular ischemic disorders. *Am J Ophthalmol.* 1994;117(5): 603-24.
75. Hayward, L. F., A. K. Johnson, Felder RB. Arterial chemoreflex in conscious normotensive and hypertensive adult rats. *Am J Physiol.* 1999; 276(4 Pt 2): H1215-22.
76. Husain S, Abdul Y, Crosson CE. Preservation of retina ganglion cell function by morphine in a chronic ocular-hypertensive rat model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53(7): 4289–4298.
77. Irigoyen MC, Cestari IA; Moreira ED; Oshiro, MS; Krieger EM. Measurements of renal sympathetic nerve activity in conscious sinoartical denervated rats. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 21(4): 869-872.
78. Irigoyen MC, Krieger EM. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998; 31(9):1213-1220.

79. Irigoyen, MC, Moreira ED, Ida F, Pires M; Cestari IA; Krieger EM. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. 1995; *Hypertension*; 26(6:2): 1111- 1116.
80. Irigoyen MC, Consolim-Colombo FM, Krieger EM. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Rev Bras Hipertensão* 2001; 8: 55-62.
81. Iwai, M.; Horiuchi, M. Devil and angel in the renin angiotensin system: ACE angiotensin II-AT(1) receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens. Res.* 2009; 32(7): 533-6.
82. Jacobi PC, Osswald H, Jurklies B, Zrenner E. Neuromodulatory effects of the renin-angiotensin system on the cat electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35(3):973–980.
83. Janka HU, Ziegler AG, Valsania P, WarramJH, Krolewski AS. Impact of blood pressure on diabetic retinopathy. *Diabete Metab* 1989; 15(5 pt 2): 333-7.
84. Jing G, Wang JJ, Zhang SX. ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012: 589589. Epub 2011 dec 14.
85. Jones DP: Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chem Biol Interact.*2006; 163(1-2): 38-53.
86. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(9-10): 1865-1879.
87. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, AntosCL, Olson EN and Sollott SJ. Glycogen synthase kinase-3b mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest.* 2004; 113(11): 1535-49.
88. Jurklies B, Eckstein A, Jacobi P, Kohler K, Risler T, Zrenner E. The renin-angiotensin system: a possible neuromodulator in the human retina? *Ger J Ophthalmol.* 1995; 4(3): 144 -150.

89. Kaiser HJ, Flammer J: Systemic hypotension: a risk factor for glaucomatous damage? *Ophthalmologica*. 1991; 203(3):105-108.
90. Kaiser HJ, Flammer J, Graf T, Stumpfig D: Systemic blood pressure in glaucoma patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1993; 231(12): 677-680.
91. Kannel, WB. Hypertension as a risk for cardiac events – epidemiological results of long-term studies. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 21 (Suppl 2): S27-S37.
92. Kannel, WB. Elevated systolic blood pressure as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*. 2000; 85(2):251-5.
93. Kaplan, NM. Primary Hypertension: Pathogenesis. In: *Clinical Hypertension*, Kaplan NM. Baltimore: Williams e Wilkins, 1998. pp. 41-99.
94. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2002;120(6):701-13; discussion 829-30. Comment in: *Arch Ophthalmol*. 2003;121(7):1070; author reply 1070. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(7):1088-9; author reply 1089.
95. Kawagishi T, Nishizawa Y, Emoto M, Konishi T, Maekawa K, Hagiwara S, Okuno Y, Inada H, Ishiki G, Mori H. Impaired retinal artery blood flow in IDDM patients before clinical manifestations of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1995; 18(12):1544-1549.
96. Kerrigan, A, Zack D.J, Quigley H.A, Smith S.D, Pease M.E. TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol*. 1997;115(8): 1031-1035.
97. Kiel, J.W.. Choroidal myogenic autoregulation and intraocular pressure. *Exp. Eye Res*. 1994;58(5): 529-543.



98. Kiel JW, van Heuven WA. Ocular perfusion pressure and choroidal blood flow in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36(3): 579–585.
99. Klein R, Klein B, Davis MD. Is cigarette smoking associated with diabetic retinopathy? *Am J Epidemiol.* 1983; 118(2): 228-38.
100. Kohler K W-ST, Jurlikes B, Guenther E, Zrenner E. Angiotensin II in the rabbit retina. *Vis Neurosci.* 1997;14(2):63–71.
101. Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and galactosemia. VII. Effects of long-term administration of antioxidants on retinal oxidative stress and the development of retinopathy. *Diabetes.* 2001; 50(8): 1938-1942.
102. Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats, *Diabetes*, 2003; 52(3): 818–823.
103. Krieger EM, Marseillan, RF. Aortic depressor fibers in the rat: and electrophysiological study. *Am J Physiol.* 1963; 205:771-774.
104. Krieger EM. Neurogenic hypertension in the rat. *Circ Res.* 1964; 15: 511-521.
105. Krieger EM. Neurogenic Hypertension in the rat, capítulo 19. In: *Handbook of Hypertension, Vol. 4: Experimental and Genetic models of Hypertension*, W de Jong Ed. Elsevier Science, 1984.
106. Krieger EM. Arterial baroreceptor resetting in hypertension (the J. W. McCubbin memorial lecture). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol Suppl.* 1989; 15: 3-17.
107. Krieger EM; Michelini L.C. Dados básicos sobre a manutenção da pressão arterial. *Rev. Cardiol. Estado de São Paulo.* 1992; 2(4): 9-17.

108. Kuriyama, H., Waki, M., Nakagawa, M., Tsuda, M. Involvement of oxygen free radicals in experimental retinal ischemia and the selective vulnerability of retinal damage. *Ophthalmic. Res.* 2001; 33(4): 196-202.
109. Kyhn MV, Klassen H, Johansson UE, Warfvinge K, Lavik E, et al. Delayed administration of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) protects retinal ganglion cells in a pig model of acute retinal ischemia. *Exp Eye Res.* 2009; 89(6): 1012–1020.
110. Lacerda JE, Consolim-Colombo FM, Moreira ED, Ida F, Silva GJ, Irigoyen MC, Krieger EM. Influence of cardiopulmonary reflex on the sympathetic activity during myocardial infarction. *Auton Neurosci.* 2007; 133(2):128-35.
111. La Rovere, MT; Pinna, GD; Hohnloser, SH; Marcus, FI; Mortara, A; Nohara, R; Bigger, JT; Camm, AJ; Schwartz, PJ. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the identification of patients at risk for life-threatening arrhythmias: implications for clinical trials. *Circulation.* 2001; 103(16): 2072-7.
112. Lattanzi S, Luzzi S, Provinciali L, Silvestrini M. Blood pressure variability predicts cognitive decline in Alzheimer's disease patients 2014; S0197-4580(14)00325-X. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.04.023. [Epub ahead of print]
113. Leske MC, Heijl A, Hussein M, Bengtsson B, Hyman L, Komaroff E; Early Manifest Glaucoma Trial Group. Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol.* 2003; 121(1):48-56.
114. Lin PW, Friedman MW, Lin HC, Chang HW, Wilson M, Lin MC. Normal tension glaucoma in patients with obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *J Glaucoma* 2011; 20(9): 553–8.
115. Lutjen-Drecoll, E., 2006. Choroidal innervation in primate eyes. *Exp. Eye Res.* 2006; 82(3): 357-361.

116. Maepea, O. Pressures in the anterior ciliary arteries, choroidal veins and choriocapillaris. *Exp. Eye Res.* 1992; 54 (5): 731-6.
117. Mancia, G; di Rienzo, M; Parati, G; Grassi, G. Sympathetic activity, blood pressure variability and end organ damage in hypertension. *J Hum Hypertens*, 11 (Suppl 1):S3-S8, 1997. Margalit E, Sadda SR. Retinal and optic nerve diseases. *Artificial Organs* 2003; 27(11): 963-974.
118. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003; 17(1): 24-38.
119. Martinez-de-la-Casa J.M., Ruiz-Calvo A., Saenz-Frances F., Reche-Frutos J., Calvo-Gonzalez C., Donate-Lopez J., Garcia-Feijoo J. Retinal nerve fiber layer thickness changes in patients with age-related macular degeneration treated with intravitreal ranibizumab. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*2012;53(10): 6214–6218.
120. Mauer M, Zinman B, Gardiner R, Suissa S, Sinaiko A, Strand T et al. Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2009; 361(1): 40–51.
121. Mayes PA, Botham KM. Biologic oxidation. In: Harper's Illustrated Biochemistry, edited by Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. McGraw-Hill: India 2003; 86-91.
122. McDonald, PM; Sanfilippo, AJ; Savard, GK. Baroreflex function and cardiac structure with moderate endurance training in normotensive men. *J of Appl Physiol.* 1993;74(5): 2469-2477.
123. Memarzadeh F, Ying-Lai M, Chung J, Azen SP, Varma R. Blood pressure, perfusion pressure, and open-angle glaucoma: the Los Angeles Latino Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(6): 2872-2877.
124. Mey, J, Thanos, S. Development of the visual system of the chick I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Research Reviews.* 2000; 32(2-3): 343-79.

125. Meyer, P., Flammer, J., Luscher, T.F. Local action of the renin angiotensin system in the porcine ophthalmic circulation: effects of ACE-inhibitors and angiotensin receptor antagonists. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995; 36(3): 555-62.
126. Miao CY; Su DF. The importance of blood pressure variability in rat aortic and left ventricular hypertrophy produced by sinoaortic denervation. *J Hypertens.* 2002; 20(9):1–8
127. Miao, C. Y., H. H. Xie, et al. Blood pressure variability is more important than blood pressure level in determination of end-organ damage in rats. *J Hypertens.* 2006;24(6): 1125-1135.
128. Michelini, LC. Regulação neuro-humoral da pressão arterial. In: *Fisiologia*. Aires, MM, Guanabara Koogan: São Paulo, 1999.
129. Mitchell P, Smith W, Attebo K, et al. Prevalence of open-angle glaucoma in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 1996;103(10):1661–9.
130. Mitchell P, Lee AJ, Rochtchina E, et al. Open-angle glaucoma and systemic hypertension: The Blue Mountains Eye Study. *J Glaucoma* 2004;13(4): 319–26.
131. Moore, CG, Epley, D, Milne, ST, Morrison, JC. Long-term non-invasive measurement of intraocular pressure in the rat eye *Curr Eye Res.* 1995; 14(8): 711-717.
132. Moravski CJ, Kelly DJ, Cooper ME, Gilbert RE, Bertram JF, Shahinfar S, et al. Retinal neovascularization is prevented by blockade of the renin–angiotensin system. *Hypertension* 2000;36(6):1099–104.
133. Moraes-Silva, I. C., R. N. De La Fuente, et al. "Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010; 37(3): 114-120.

134. Moroi EM, Lichter PR. Ocular pharmacology. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, editors. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 9.ed. Minneapolis: McGraw Hill; 1996. 1619-45.
135. Mozaffarieh M , Flammer J. New insights in the pathogenesis and treatment of normal tension glaucoma. *Curr Opin Pharmacol*. 2013; 13(1): 43-9.
136. Munzel T, Afanas IB, Kleschyov AL, Harrison DG. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(11): 1761-68.
137. Nagisa Y, Shintani A, Nakagawa S. The angiotensin II receptor antagonist candesartan cilexetil (TCV-116) ameliorates retinal disorders in rats. *Diabetologia*. 2001;44(7): 883–8.
138. Okamoto, K. and K. Aoki. "Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ*. 1963; 27: 282-293.
139. Osborn JW, England SK. Normalization of arterial pressure after barodenervation: role of pressure natriureses. *Am J Physiol*.1990;.259(6pt2): 1172-80.
140. Otani A, Takagi H, Suzuma K, Honda Y. Angiotensin II potentiates endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circ Res*. 1998;82(5): 619–28.
141. Otani H. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning. *Antioxid Redox Signal*. 2004; 6(2): 449-69.
142. Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, et al. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation*. 1999;100(15):1646–52.
143. Park HY, Kim J H, Park CK. Neuronal cell death in the inner retina and the influence of vascular endothelial growth factor inhibition in a diabetic rat model. *Am J Pathol* 2014; 184(6): 1752-62.

144. Pease ME, Cone FE, Gelman S, Son JL, Quigley HA. Calibration of the TonoLab Tonometer in Mice with Spontaneous or Experimental Glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52(2): 858–864.
145. Pederson JE, Green K. Aqueous humor dynamics: experimental studies. *Exp Eye Res* 1973; 15(3): 277–97.
146. Pinto CC, Silva KC, Biswas SK, Martins N, Lopes de faria JB, Lopes de Faria JM. *Free Radic Research.* 2007;41(10):1151-58.
147. Piratello, A. C., I. Moraes-Silva, et al. "Renin angiotensin system and cardiac hypertrophy after sinoaortic denervation in rats." *Clinics.* 2010; 65(12): 1345-50.
148. Quigley H.A., Broman A. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90(3): 151–56.
149. Re RN: Cellular biology of the renin-angiotensin systems. *Arch Intern Med.* 1984; 144 (10):2037.
150. Resch, H., Zawinka, C., Weigert, G., Schmetterer, L., Garhofer, G. Inhaled carbon monoxide increases retinal and choroidal blood flow in healthy humans. *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* 2005; 46(11): 4275-80.
151. Riccadonna M, Covi G, Pancera P, et al. Autonomic system activity and 24-hour blood pressure variations in subjects with normal- and high-tension glaucoma. *J Glaucoma* 2003;12(2):156-63.
152. Riva CE, Grunwald JE, Sinclair SH, Petrig BL. Blood velocity and volumetric flow rate in human retinal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1985;26:1124–32.
153. Riva CE, Cranstoun SD, Mann RM, Barnes GE. Local choroidal blood flow in the cat by laser Doppler flowmetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35(2): 608–18.
154. Riva, C.E., Schmetterer, L. Microcirculation of the ocular fundus. In: Tuma, R.F., Durán, W.N., Ley, K. (Eds.), *Handbook of Physiology: Microcirculation.* Academic Press. 2008; 735-765.

155. Rocha R, Funder JW. The pathophysiology of aldosterone in the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;970: 89 –100.
156. Rockwood EJ, Fantes F, Davis EB, Anderson DR. The response of retinal vasculature to angiotensin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28(4): 676–682.
157. Rojanapongpun P, Drance SM, Morrison BJ. Ophthalmic artery flow velocity in glaucomatous and normal subjects. *Br J Ophthalmol* 1993;77(1): 25-9.
158. Rosa AA. Oclusão de ramo da veia central da retina. *Arq Bras Oftalmol.* 2003; 66(6): 897-900.
159. Rosa RM, Roehrs R, Saffi J, Henriques JAP: "O papel da reparação de lesões oxidativas induzidas no DNA na redução do risco de desenvolvimento de câncer". In: Salvador M, Henriques JAP. (Orgs.). *Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo.* 1.ed. Canoas: Editora da Ulbra, 2004.
160. Rosa, KT. Importância do barorreflexo nas alterações estruturais e funcionais cardíacas induzidas pela hipertensão experimental em ratos: avaliações hemodinâmicas e ecocardiográficas. São Paulo; (Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo), 2005.
161. Sampaio, WO, Pinheiro SV, Santos RA. Aspectos fisiológicos e fisiopatológicos do sistema renina angiotensina: ênfase na função vascular. *Hipertensão* 2009; 12(2): 44–50.
162. Santos, RA, Ferreira, A.J.; Simões e Silva, A.C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2 angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp. Physiol.* 2008;93(5): 519–527.
163. Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ. The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51(1): 207–16.

164. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, et al. (Pro)renin receptor promotes choroidal neovascularization by activating its signal transduction and tissue reninangiotensin system. *Am J Pathol.* 2008; 173(6):1911–8.
165. Savoia C, Burger D, Nishigaki N, Montezano A, Touyz RM. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Rev Mol Med.* 2011;30;13e11. doi: 10.1017/S1462399411001815.
166. Schanachenberg CG. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2002; 2(2): 121-25.
167. Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. Renin-angiotensinsystem and cardiovascular risk. *Lancet.* 2007; 369(9568):1208–19.
168. Schmidl, D., Garhofer, G a, Schmetterer L. The complex interaction between ocular perfusion pressure and ocular blood flow - Relevance for glaucoma. *Exp Eye Res* 2011; 93(2): 141-55.
169. Schubert, R., Mulvany, M.J. The myogenic response: established facts and attractive hypotheses. *Clin. Sci. (Lond).* 1999; 96(4): 313-26.
170. Shan ZZ, Dai SM, Fang F, Su DF, Sheng L, Xue B. Angiotensin II contents in plasma, and cardiac and renal tissues of sinoaortic denervated rats. *Sheng Li Xue Bao.*2003; 55(1): 75–8.
171. Sies H: *Oxidative Stress: Introductory remarks.* v.1. London: Academic Press, 1985. 8.
172. Silva, GJJ; Brum, PC; Negrão, CE; Krieger, EM. Acute and chronic effect of exercise or baroreflexes im spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1997; 30: 714-719.
173. Silva KC et al. Diabetic retinal neurodegeneration is associated with mitochondrial oxidative stress and is improved by an angiotensin receptor blocker in a model combining hypertension and diabetes. *Diabetes.* 2009;58(6): 1382-90.



174. Silva, ICM; Mostarda, C; De La Fuente, RN; De Angelis, K; Krieger, EM; Irigoyen, MC. Role of baroreflex impairment and blood pressure variability in cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. XVII Interamerican Society of Hypertension Scientific Meeting, 2007, Miami, EUA.
175. Sjølie AK, Klein R, Porta M, Orchard T, Fuller J, Parving HH, Bilous R, Chaturvedi N; DIRECT Programme Study Group. Effect of candesartan on progression and regression of retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT Protect 2): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008;372: 1385–1393.
176. Sommer A. Intraocular pressure and glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1989;107:186-8.
177. Staurenghi G, Lonati C, Aschero M, Orzalesi N. Arteriovenous crossing as a risk factor in branch retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol*. 1994;117(2):211-3. Comment in: *Am J Ophthalmol*. 1994;118(2): 263-5.
178. Steckelings U. M., Rompe F., Kaschina E., Unger T. The evolving story of the RAAS in hypertension, diabetes and CV disease: moving from macrovascular to microvascular targets. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2009; 23(6): 693-703.
179. Stegbauer J, Coffman TM. New insights into angiotensin receptor actions: from blood pressure to aging. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20:84–8.
180. Steinle, J.J., Krizsan-Agbas, D., Smith, P.G., 2000. Regional regulation of choroidal blood flow by autonomic innervation in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1, R202-R209.
181. Steinle, J.J., Pierce, J.D., Clancy, R.L., Smith, P.G. Increased ocular blood vessel numbers and sizes following chronic sympathectomy in rat. *Exp. Eye Res.* 2002; 6: 761-768.
182. Strain WD, Chaturvedi N. Review: The renin-angiotensin-aldosterone system and the eye in diabetes. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System.* 2002 3: 243

183. Su, DF; Miao, CY. Reduction of blood pressure variability: a new strategy for the treatment of hypertension. *Trends Pharm Sci.* 2005;26(8): 388-90.
184. Tamarat R, Silvestre JS, Durie M, Levy BI. Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. *Lab Invest.* 2002;82:747–756.
185. Tielsch JM, Katz J, Sommer A, Quigley HA, Javitt JC. Hypertension, perfusion pressure, and primary open-angle glaucoma. A population based assessment. *Arch Ophthalmol.* 1995; 113:216-21.
186. Tipton, CM. Exercise training and hypertension, an update. *Exercise and Sport Science Review.* 1991; (4):447-505.
187. Touyz, RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cell – implications in cardiovascular disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004; 37(8):1263–1273.
188. Trapanil, AJ; Barron, KW; Brody, MJ. Analysis of hemodynamic variability after sinoaortic denervation in the conscious rat. *Am J Physiol.* 1986; 251: 1163-9.
189. Hamet P, Richard L, Dam TV, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension.* 1995;26(4):642-8.
190. Trippodo, N. C. and E. D. Frohlich. Similarities of genetic spontaneous hypertension. Man and rat. *Circ Res.* 1981;48(3): 309-319.
191. UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-853.

192. Vaajanen A, Mervaala E, Oksala O, Vapaatalo H. Is there a relationship between blood pressure and intraocular pressure? An experimental study in hypertensive rats. *Curr Eye Res.* 2008; 33: 325-332.
193. Van Wijn Gaarden P, Qureshi S H. Inhibitors of vascular endothelial growth factor(VEGF) in the management of neovascular age-related macular degeneration: a review of current practice. *Clin Exp Optom.*2008;91:427–437.
194. Varma R, Ying-Lai M, Francis BA, et al, Los Angeles Latino Eye Study Group. Prevalence of open-angle glaucoma and hypertension in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study. *Ophthalmology* 2004;111:1439–48.
195. Vasquez, EC; Krieger, EM. Sequence of tachycardia following baroreceptor denervation in the rat. In: Sleight, P. *Arterial Baroreceptor and Hypertension*, Oxford University Press. 1980; Oxford, pp. 413-417.
196. Wagner J, Danser AHJ, Derkx FHM, et al. Demonstration of rennin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye: evidence for an intraocular renin-angiotensin system. *Br J Ophthalmol.* 1996; 80:159–163.
197. Wang, G. Hormesis, cell death, and regenerative medicine for neurodegenerative diseases. *Dose-Response.* 2013; 11: 238–254.
198. Wassle, H; Boycott, B.B. Functional architecture of mammalian retina. *Physiol. Rev.* 1991; (71): 447-480.
199. Weinberg D, Dodwell DG, Fern SA. Anatomy of arteriovenous crossings in branch retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol.* 1990;109(3):298-302. Comment in: *Am J Ophthalmol.* 1990; 110(1): 97-8.
200. Whiteman M, Armstrong JS, Cheung NS, Siau JL, Rose P, Schantz JT, et al. Peroxynitrite mediates calcium-dependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpains. *FASEB J.* 2004; 18: 1395-1397.

201. Wierzbowska J, Wierzbowski R, Stankiewicz A, Siesky B, Harris A. Cardiac autonomic dysfunction in patients with normal tension glaucoma: 24-h heart rate and blood pressure variability analysis. *Br J Ophthalmol.* 2012; 96:624-628.
202. Willis LM, El-Remessy AB, Somanath PR, Deremer DL, Fagan SC. Angiotensin receptor blockers and angiogenesis: clinical and experimental evidence. *Clin Sci (Lond)* 2010; 120:307–19.
203. Wilkinson-Berka JL. Prorenin and the (pro)renin receptor in ocular pathology. *Am J Pathol.* 2008; 173:1591–1594.
204. Wilkinson-Berka JL, Tan G, Jaworski K, Miller AG. Identification of a retinal aldosterone system and the protective effects of mineralocorticoid receptor antagonism on retinal vascular pathology. *Circ Res.* 2009;104: 124–133.
205. Wu J, Seregard S, Algvere PV. Photochemical damage of the retina. *Survey of Ophthalmology.* 2006; 51: 461-481.
206. Yancey CM, Linsenmeier RA. The electroretinogram and choroidal PO<sub>2</sub> in the cat during elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 29: 700–707.
207. Yang H, Hirookja K, Fukuda K, Shiraga F. Neuroprotective Effects of Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker in a Rat Model of Chronic Glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009; 50( 12): 5800-5804.
208. Zamo FS, Lacchini S, Mostarda C, Chiavegatto S, Silva IC, Oliveira EM, et al. Hemodynamic, morphometric and autonomic patterns in hypertensive rats: renin-angiotensin system modulation. *Clinics.* 2010; 65(1): 85-92.
209. Zhang LC, Li ZZ, Yu YS, Wang ZB, Wei X, Su DF, Li L. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme 2 are involved in sinoaortic denervation-induced cardiovascular hypertrophy in rats. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34(9):1398-403.