

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

KAMYLLLE SILVA FERRAZ

**ANÁLISE DO FENÓTIPO CARDIOVASCULAR DE RATAS TRANSGÊNICAS
(TG7371) QUE EXPRESSAM UMA PROTEÍNA DE FUSÃO
PRODUTORA DE ANGIOTENSINA-(1-7)**

BELO HORIZONTE – MG
2023

KAMYLLLE SILVA FERRAZ

**ANÁLISE DO FENÓTIPO CARDIOVASCULAR DE RATAS TRANSGÊNICAS
(TG7371) QUE EXPRESSAM UMA PROTEÍNA DE FUSÃO PRODUTORA DE
ANGIOTENSINA-(1-7)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Maria José Campagnole-Santos

Co-Orientadora: Profa. Andrea S Haibara

Área de concentração: Fisiologia

BELO HORIZONTE - MG

2023

043

Ferraz, Kamylle Silva.

Análise do fenótipo cardiovascular de ratas transgênicas (TG7371) que expressam uma proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) [manuscrito] / Kamylle Silva Ferraz. – 2023.

84 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Maria José Campagnole-Santos. Co-Orientadora: Profa. Andrea S Haibara.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Angiotensinas. 3. Animais Geneticamente Modificados. 4. Doenças Cardiovasculares. I. Santos, Maria José Campagnole dos. II. Haibara, Andrea S. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado N° 574 DE **KAMYLLE SILVA FERAZ**

Às 14:00 horas do dia 21 do mês de agosto de 2023, na Sala Wilson Beraldo - Bloco A4 175, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Kamylle Silva Ferraz**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Daniella Bonaventura**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Cibele Rocha Resende**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e orientadora. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Análise do Fenótipo Cardiovascular de Ratas Transgênicas (tg7371) Que Expressam Uma Proteína de Fusão Produtora de Angiotensina-(1-7)**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, considerou a aluna aprovada.

Belo Horizonte, 21 de agosto de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura**, Professora do Magistério Superior, em 24/08/2023, às 16:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cibele Rocha Resende**, Professora do Magistério Superior, em 24/08/2023, às 17:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose Campagnole dos Santos**, Professora do Magistério Superior, em 20/09/2023, às 14:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2572186** e o código CRC **81425EC8**.

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Hipertensão, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o suporte financeiro das agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em NanobioFarmacêutica (INCT).

RESUMO

A Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um componente importante do sistema renina-angiotensina (SRA) especialmente por suas propriedades vasodilatadoras, anti-inflamatórias e antiproliferativas. É considerada um peptídeo contrarregulador endógeno dos efeitos vasoconstritores e proliferativos da Angiotensina II (Ang II). Em decorrência do papel fisiológico no controle da pressão arterial (PA) e equilíbrio hidroeletrólítico, bem como a sua participação na fisiopatologia das doenças cardiovasculares, os componentes do SRA tem sido alvo para o desenvolvimento de animais transgênicos. No presente estudo, comparamos o fenótipo cardiovascular de ratas de uma nova linhagem transgênica, TG(A-7)-L7371 (TG), com machos da mesma linhagem. Essa linhagem TG expressa um gene que codifica uma proteína de fusão contendo a sequência de Ang-(1-7), e que está associado a um promotor específico, ao da proteína fibrilar acídica glial humana (hGFAP). Para o estudo, foram utilizados ratos Sprague-Dawley (SD; grupo controle) e ratos TG, tanto machos quanto fêmeas. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida de forma não invasiva por pletismografia de cauda. Nas fêmeas a medida da PAS foi associada à avaliação das diferentes fases do ciclo estral. A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) também foram avaliadas também por medida direta através de canulação da artéria femoral acoplada ao sistema de registro *Biopac System®*. Foi avaliada a sensibilidade do controle barorreflexo do componente bradicárdico, através da variação reflexa de FC decorrente de aumento de PAM induzido por injeção endovenosa de fenilefrina. O tônus autonômico cardíaco foi determinado através de bloqueio sequencial e alternado de receptores β -adrenérgicos, com propranolol e muscarínicos, com metil-atropina. Os níveis de angiotensinas circulantes foram medidos no plasma por espectrometria de massa. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que: 1) Ratos TG fêmeas, bem como TG machos apresentaram níveis mais baixos de PA em relação aos SD, tanto avaliado por pletismografia

da cauda quanto pelo registro direto de curto prazo; 2) As fêmeas, tanto SD quanto TG, apresentaram níveis de PA mais baixos do que os machos de suas respectivas linhagens; 3) Não foram observadas diferenças significativas na PAS durante as diferentes fases do ciclo estral; 4) As fêmeas TG mostraram um aumento na FC em comparação com as fêmeas SD e machos TG; 5) As fêmeas TG apresentaram sensibilidade do controle barorreflexo da FC idêntica às fêmeas SD, no entanto, maior em comparação aos machos TG; 6) Tanto fêmeas quanto machos TG apresentaram concentração plasmática de Ang-(1-7) semelhante aos respectivos controles SD; 7) As fêmeas TG e SD apresentaram níveis aumentados de Ang-(1-7) em comparação com os machos de suas respectivas linhagens; 8) As fêmeas SD apresentaram ainda níveis aumentados de Ang I e Ang II em relação aos machos SD. Esses resultados sugerem que a superexpressão de Ang-(1-7) tecidual pode induzir efeitos benéficos no sistema cardiovascular, como a redução da PA. Considerando que o “background” genético é de um animal normotenso, este é um resultado bastante relevante e torna este animal um modelo interessante para se estudar o efeito do aumento tecidual de longo prazo da Ang-(1-7) na fisiopatologia e tratamento de doenças cardiovasculares, especialmente em fêmeas.

PALAVRAS-CHAVE: Sistema renina-angiotensina, Angiotensina-(1-7), Fêmea, Animais transgênicos, Fenótipo hipotensivo

ABSTRACT

Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] is an important component of the renin-angiotensin system (RAS) especially for its vasodilator, anti-inflammatory, and anti-proliferative properties. It is considered an endogenous counterregulatory peptide of the vasoconstrictor and proliferative effects of Angiotensin II (Ang II). As a result of their physiological role in controlling blood pressure (BP) and hydroelectrolytic balance, as well as their participation in the pathophysiology of cardiovascular diseases, RAS components have been targets for the development of transgenic animals. In the present study, we compared the cardiovascular phenotype of females of a new strain of transgenic rats, the TG(A-7)-L7371 (TG), with males of same strain. This TG express a gene that encodes a fusion protein containing the Ang-(1-7) sequence, and which is associated with a specific promoter, the human glial acidic fibrillar protein (hGFAP). For this study, male and female Sprague-Dawley rats (SD; control group) and TG rats were used. Systolic blood pressure (SBP) was measured non-invasively by tail plethysmography. In females, the SBP measurement was associated with the assessment of the different phases of the estrous cycle. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were also evaluated by direct measurement through cannulation of the femoral artery coupled to the Biopac System recording system. The sensitivity of the baroreflex control for the bradycardic component was evaluated, through HR variations resulting from increases in MAP induced by intravenous injection of phenylephrine. Cardiac autonomic tone was determined through sequential and alternating blockade of β -adrenergic receptors, with propranolol and muscarinics, with methyl-atropine. Circulating angiotensin levels were measured in plasma by mass spectrometry. Results obtained in the present study showed: 1) Female and male TG rats showed lower levels of BP than SD, both by tail plethysmography and by direct short-term recordings; 2) Females, both SD and TG, had lower BP levels than males of their respective lineages; 3) No

significant differences were observed in SBP during the different phases of the estrous cycle; 4) TG females showed an increase in HR compared to SD females and TG males; 5) TG females showed baroreflex HR control sensitivity identical to SD females, however, higher compared to TG males; 6) Both TG females and males showed plasma concentrations of Ang-(1-7) similar to the respective SD controls; 8) TG and SD females showed increased levels of Ang-(1-7) compared to males of their respective strains; 9) SD females also showed increased levels of Ang I and Ang II compared to SD males. These results suggest that overexpression of tissue Ang-(1-7) can induce beneficial effects on the cardiovascular system, such as BP reduction. Considering that the genetic background is from a normotensive animal, this is a very relevant result and makes this animal an interesting model to study the effect of long-term tissue increase of Ang-(1-7) on the pathophysiology and treatment of cardiovascular disease, especially in females.

KEYWORDS: Renin-angiotensin system, Angiotensin-(1-7), Female, Transgenic animals, Hypotensive phenotype

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Aminopeptidases
Ang	Angiotensina
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
AOGEN	Angiotensinogênio
AVP	Vasopressina
AT1	Receptor de Angiotensina I
AT2	Receptor de Angiotensina II
AVE	Acidente Vascular Encefálico
DCV	Doenças Cardiovasculares
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
FC	Frequência Cardíaca
GFAP	Proteína Acídica Fibrilar Glial
HA	Hipertensão Arterial
i.v.	Endovenoso
IgG2b	Imunoglobulina 2b
IP	Intervalo de Pulso
Mas	Receptor de Angiotensina-(1-7)
NEP	Endopeptidase Neutra
NTS	Núcleo do Trato Solitário
PA	Pressão Arterial
PAM	Pressão Arterial Média
PAP	Pressão Arterial Pulsátil
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCP	Prolil-carboxipeptidase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEP	Prolil-endopeptidase
RE α	Receptor de Estrogenio do tipo α
RE β	Receptor de Estrogenio do tipo β

SBR	Sensibilidade do Controle Barorreflexo
SD	Ratos Sprague-Dawley
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SNPS	Sistema Nervoso Parassimpático
TG	Transgênico
TPS	Tônus Parassimpático
TS	Tônus Simpático

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores basais de Pressão Arterial Média (PAM, mmHg) e Frequência Cardíaca (FC, bpm) de animais SD e TG.....	39
Tabela 2. Concentração plasmática de angiotensinas (pg/ml) de animais SD e TG	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos fisiológicos desencadeados pelo eixo ECA/ Angiotensina (Ang) II/ receptor AT1 para o controle da pressão arterial.....	10
Figura 2. Esquema simplificado das vias de formação das angiotensinas e seus metabólitos.	12
Figura 3. Representação esquemática dos mecanismos fisiológicos desencadeados pelo eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ receptor MAS para o controle da pressão arterial.....	13
Figura 4. Principais ações antagonicas dos eixos ECA/AngII/AT1 e ECA2/Ang-(1-7)/MAS. Através do receptor AT1, a Ang II induz inflamação, fibrose, angiogênese, migração celular e metástase, enquanto a Ang-(1-7), através de receptor Mas, apresenta efeitos antiinflamatório, anti-fibrótico, antiproliferativo..	14
Figura 5. Esquema simplificado apresentado o efeito das interações entre esteroides gonadais e o SRA. Os esteroides gonadais podem regular a PA alterando a reabsorção de sódio através da modulação da secreção de aldosterona ou através do deslocamento da curva pressão-natriurese e/ou alterando o estado de estresse oxidativo por meio da modulação do metabolismo de espécies reativas de oxigênio.	18
Figura 6. Representação esquemática da sequência do construto (transgene) e da proteína de fusão por ele codificada que foi utilizada para a geração dos ratos [TGR(A1-7)L7371]..	21
Figura 7. Representação da imagem de um gel de agarose corado por brometo de etídio..	27
Figura 8. Representação esquemática do método de medida da pressão arterial sistólica (PAS) de forma não invasiva realizada por pletismografia de cauda (CODA High Throughput).....	28
Figura 9. Representação esquemática do método de avaliação e da característica celular nas diferentes fases do ciclo estral através de coleta do esfregaço vaginal.	30
Figura 10. Representação esquemática do método de canulação de veia e artéria femoral (Dia 1) e o protocolo de medida de PA no sistema de aquisição de dados (BIOPAC System), em animais conscientes.	32
Figura 11. Valores basais de Pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medida por pletismografia de cauda.	37
Figura 12. Valores basais de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) nas diferentes fases do ciclo de ratas SD (controle) e TG.	38
Figura 13. Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) de ratos SD e TG obtidos com registro de curta duração..	40
Figura 14. Valores basais de Frequência cardíaca (FC, bpm) de ratos SD e TG obtidos com registro de curta duração.	41
Figura 15. Sensibilidade da bradicardia barorreflexa calculada a partir da razão entre as variações de frequência cardíaca em intervalo de pulso (ms) e as variações de pressão arterial média (PAM, mmHg) induzidas por injeção endovenosa de fenilefrina.	43

Figura 16. Valores basais de PAM (mmHg) e FC (bpm) nos dois dias consecutivos (1º. e 2º.) de registro para avaliação do tônus simpático (bpm), tônus parassimpático (bpm), frequência cardíaca intrínseca (bpm) e razão entre tônus simpático (TS) e parassimpático (TPS).	45
Figura 17. Valores basais de PAM (mmHg) e FC (bpm) nos dois dias consecutivos de registro (1º. e 2º.) para avaliação do tônus simpático (bpm), tônus vagal (bpm), frequência cardíaca intrínseca (bpm) e razão entre tônus simpático (TS) e parassimpático (TPS). . . .	46
Figura 18. Valores de tônus simpático, parassimpático, frequência cardíaca (FC) intrínseca e a razão entre tônus simpático e parassimpático.	47
Figura 19. Concentração plasmática de angiotensinas (pg/ml).	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Regulação da Pressão Arterial	7
1.2. Sistema Renina Angiotensina (SRA).....	9
1.3. SRA em Fêmeas	14
1.4. Animal Transgênico [TGR(A1-7) L7371].....	18
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	23
2.2 Objetivo Geral.....	24
2.3. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Animais	25
3.2 Genotipagem dos Animais.....	25
3.3 Pletismografia de Cauda	27
3.4 Avaliação do Ciclo Estral	28
3.5 Medida Direta de Parâmetros Cardiovasculares	30
3.6 Cirurgia para Canulação da Artéria e Veia Femoral.....	30
3.7 Avaliação da Sensibilidade do Componente Bradicárdico do Barorreflexo	33
3.8 Avaliação do Controle Autonômico da Frequência Cardíaca.....	33
3.9 Determinação do nível plasmático de Angiotensinas	34
3.10 Análise Estatística.....	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Avaliação da Pressão Arterial Sistólica por Pletismografia.	36
4.2 Avaliação do Ciclo Estral	36
4.3 Avaliação de Parâmetros Cardiovasculares	38
4.4 Avaliação da Bradicardia Baroreflexa	42
4.5 Avaliação da Atividade Autonômica Cardíaca.....	44
4.6 Determinação do Nível de Angiotensinas no Plasma	47
5. DISCUSSÃO	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. Regulação da Pressão Arterial

A função da circulação é a de suprir as necessidades dos tecidos corporais, desempenhando um papel crucial na distribuição de oxigênio e nutrientes essenciais, distribuição de hormônios, e na eliminação de produtos do metabolismo intermediário. De modo geral, a função primária do sistema cardiovascular é a de manter o ambiente apropriado em todos os tecidos do organismo para que as células sobrevivam e funcionem de maneira otimizada. Para garantir o fluxo sanguíneo, é importante que a pressão arterial (PA) seja mantida dentro de valores estreitos e adequados ao estado fisiológico, seja em repouso ou atividade.

A regulação da PA é uma das funções fisiológicas mais complexas, que depende de ações integradas dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino. É o resultado da atividade de sistemas de retroalimentação que operam a curto, médio e a longo prazo (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; SHEPHERD; MANCIA, 1986). Os principais mecanismos de controle a curto prazo são desempenhados pelos reflexos que são originados nos pressorreceptores arteriais (barorreflexo), quimiorreceptores (quimiorreflexo) e nos receptores de estiramento da região cardiopulmonar. Uma série de outros reflexos participam na regulação da PA em animais e indivíduos normotensos, como, por exemplo, os reflexos originados em metaborreceptores musculares e reflexos originados na área trigeminal. No entanto, o barorreflexo é considerado o principal mecanismo de controle neural, por ser um sistema de controle de alto ganho e que mantém a PA dentro de limites estreitos em períodos de segundos a poucos minutos. A rapidez desse sistema regulatório é obtida através de uma alça de retroalimentação gatilhada por alterações da pulsatilidade

arterial que induz a estimulação de terminais barorreceptores, que são integrados ao nível bulbar e determinam alterações simultâneas na atividade do sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNPS). Assim, o barorreflexo controla a PA principalmente por modular o tônus simpático e o tônus parassimpático para coração e vasos. A estimulação dos barorreceptores arteriais, com aumento da PA, produz redução reflexa da atividade simpática e aumento da atividade vagal (parassimpática), resultando em dilatação arteriolar, venodilatação, bradicardia e redução da contratilidade miocárdica. A redução da PA causa efeitos reflexos contrários, com aumento reflexo da atividade simpática e redução da atividade vagal (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; SHEPHERD; MANCIA, 1986).

Em paralelo aos mecanismos neurais, os mecanismos humorais participam da manutenção da homeostasia cardiovascular atuando nos efetores diretos, coração e vasos, bem como ao nível renal. Catecolaminas das adrenais, vasopressina (AVP), sistema renina-angiotensina (SRA) e peptídeo natriurético atrial (ANP) são os principais mecanismos humorais envolvidos na regulação da PA à médio e longo prazos. Dentre esses mecanismos, a angiotensina (Ang) II é um dos mais potentes vasoconstrictores endógenos e potente regulador da função renal, determinando aumento da PA por, principalmente, aumentar a resistência periférica e o volume extracelular. A Figura 1 apresenta os efeitos desencadeados pela ativação do SRA, com aumento dos níveis circulantes de Ang II. Embora o SNS e o SRA sejam mecanismos cruciais para a manutenção da PA dentro de limites considerados normais, a hiperatividade de longo prazo desses sistemas, circulante e/ou tecidual, está envolvida na fisiopatologia da hipertensão arterial (HA) e doenças cardiovasculares (DCV) [Figura 4].

1.2. Sistema Renina Angiotensina (SRA)

O SRA é um sistema complexo que desempenha um papel crucial na regulação da PA e do equilíbrio hidroeletrolítico. A ativação do SRA endócrino se inicia com a liberação da enzima renina. Como mostrado na Figura 1, a renina é produzida e secretada pelas células justaglomerulares dos rins em resposta a diversos estímulos, como baixa PA, baixa volemia e baixa concentração de sódio na mácula densa. A renina atua sobre o angiotensinogênio (AOGEN), uma proteína produzida pelo fígado e secretada na circulação, formando o decapeptídeo Ang I. A Ang I é um peptídeo inativo que é rapidamente convertido em Ang II, peça chave nesse sistema, pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A Ang II é o efetor hemodinâmico dominante do SRA e atua via receptores específicos acoplados a proteína G, denominados AT1 e AT2. Esses receptores podem ser detectados em diversas áreas reguladoras da homeostase cardiovascular como vasos sanguíneos, glândulas adrenais, coração, cérebro e rins. As ações clássicas da Ang II, tais como, a vasoconstrição, estimulação da liberação de aldosterona, retenção de sódio e água e proliferação celular ocorrem pela interação com receptores do tipo AT1 (Figura 1). Os receptores AT2 têm uma distribuição mais restrita e sua função exata ainda não está completamente elucidada, no entanto, várias evidências sugerem que os receptores AT2 exerçam efeitos opostos aos receptores AT1 (DOSTAL e BAKER, 1999; SANTOS *et al.*, 2000; BERRY *et al.*, 2001; MCKINLEY *et al.*, 2003; SANTOS *et al.* 2018; BADER E GANTEN, 2008; FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008; HORIUCHI e MOGI, 2011; HORIUCHI *et al.*, 2012).

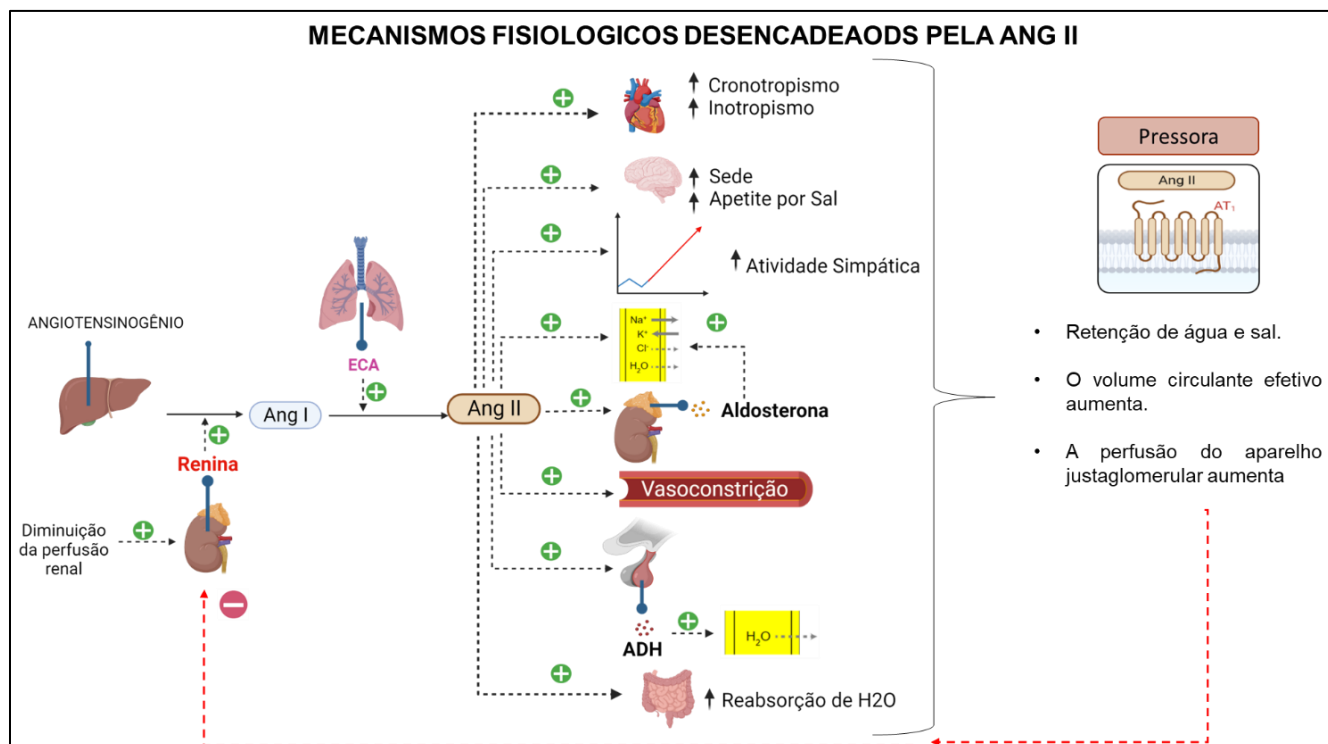


Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos fisiológicos desencadeados pelo eixo ECA/ Angiotensina (Ang) II/ receptor AT₁ para o controle da pressão arterial. ADH= hormônio antidiurético; Ang = angiotensina; ECA= enzima conversora de angiotensina.

O SRA endócrino tem grande importância para manter a homeostasia cardiovascular. No entanto, quando há hiperatividade de longo prazo do eixo ECA/ AngII/ receptor AT₁, tanto em níveis circulantes quanto tecidual, há um favorecimento do desenvolvimento das DCV (Figura 4), como a hipertrofia e insuficiência cardíaca, a doença coronariana, a insuficiência renal, a HA e o acidente vascular encefálico (PEACH, 1977; DOSTAL e BAKER, 1999; DONOGHUE *et al.*, 2000; PAUL *et al.*, 2006; CARLSON e WYSS, 2008; FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008; HORIUCHI *et al.*, 2012). Como mostrado na Figura 2, a Ang II é o principal efetor do SRA, no entanto, outros peptídeos biologicamente ativos podem ser formados, entre eles a Ang-(2-8) (Ang III), Ang-(3-8) (Ang IV), Ang-(1-7), Ang-(1-12), Ang-(1-9) e Alamandina, indicando que o SRA é também um sistema de múltiplos mediadores (SANTOS *et al.*, 2003; NAGATA *et al.*, 2006; FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008; FLORES-MUNOZ, 2012; LAUTNER *et al.*, 2013).

O heptapeptídeo Ang-(1-7) foi identificado como sendo um componente biologicamente ativo do SRA e associado à regulação central e periférica da pressão arterial a cerca de 35 anos (SANTOS *et al.*, 1988; SCHIAVONE *et al.*, 1988). A Ang-(1-7) se diferencia da Ang II apenas pela ausência da fenilalanina na posição 8 do peptídeo, e pode ser gerada por diferentes vias enzimáticas a partir da Ang I e Ang II, sofrendo ações de endopeptidases e carboxipeptidases, mas principalmente a partir da Ang II é formada por uma enzima homóloga à ECA, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2; DONOGHUE *et al.* 2000; TIPNIS 2000). A ECA2 possui diferenças em relação aos seus substratos e a atividade inalterada na presença de inibidores de ECA (DONOGHUE *et al.* 2000; TIPNIS 2000; ELASED *et al.*, 2006; SAKIMA *et al.*, 2005). Uma vez formada, a Ang-(1-7) pode ser hidrolisada pela ECA, formando Ang-(1-5) ou por aminopeptidase, originando Ang-(2-7) e Ang-(3-7) considerados peptídeos inativos. Por sua vez, a Ang-(1-7) pode ser descarboxilada, por uma enzima ainda não identificada, formando um novo membro ativo do sistema, a Alamandina (Figura 2); (LAUTNER *et al.*, 2013).

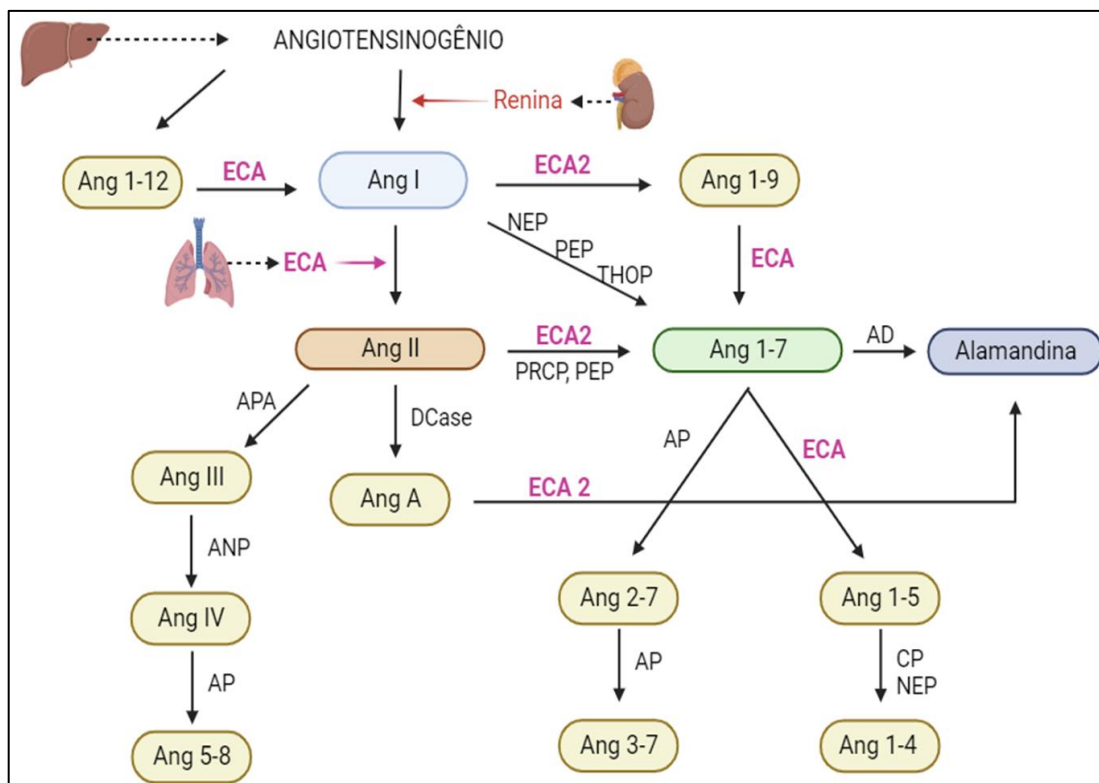


Figura 2. Esquema simplificado das vias de formação das angiotensinas e seus metabólitos. Ang= angiotensina; AP= aminopeptidase; APA= aminopeptidase A; APN= aminopeptidase N; CP= carboxipeptidase; DCase= descarboxilase desconhecida; ECA= enzima conversora de angiotensina; ECA 2= enzima homóloga a ECA; NEP= endopeptidase neutra; PEP= prolil endopeptidase; PRCP= prolil carboxipeptidase; THOP= thimet oligopeptidase. (Modificado de Santos et al., 2018)

As ações da Ang-(1-7) são mediadas por um receptor específico de membrana acoplado a proteína G, denominado receptor Mas, como foi descrito pela primeira vez em 2003 (SANTOS *et al.*, 2003). Apesar de compartilhar de uma origem comum e exercer alguns efeitos fisiológicos semelhantes à Ang II, como a liberação de vasopressina, estudos mostraram que a Ang-(1-7) possui efeitos opostos aos desempenhados pela Ang II via receptor AT1 (Figura 3 e 4; SANTOS *et al.*, 2018). Desta forma, está bem aceito na literatura que ECA2/Ang-(1-7)/ receptor MAS se constitui um eixo contrarregulatório do SRA, opondo-se à maioria das ações do eixo ECA/Ang II/ Receptor AT1, que desempenha atividade protetora em diferentes tecidos e condições fisiopatológicas. Entre as ações deste

eixo podemos citar os efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos, anti-arritmogênicos, vasodilatador, de facilitação do controle barorreflexo, anti-angiogênico, modulador da excreção de sódio, modulador da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) [Figura 3]. Além disso, a Ang-(1-7) pode potencializar o efeito vasodilatador da bradicinina e atenuar o efeito vasoconstritor da Ang II (SANTOS *et al.*, 1994; KUCHARWICZ *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2003; SANTOS E FERREIRA, 2007; BADER E GANTEN, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2000; ZISMAN *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2018).

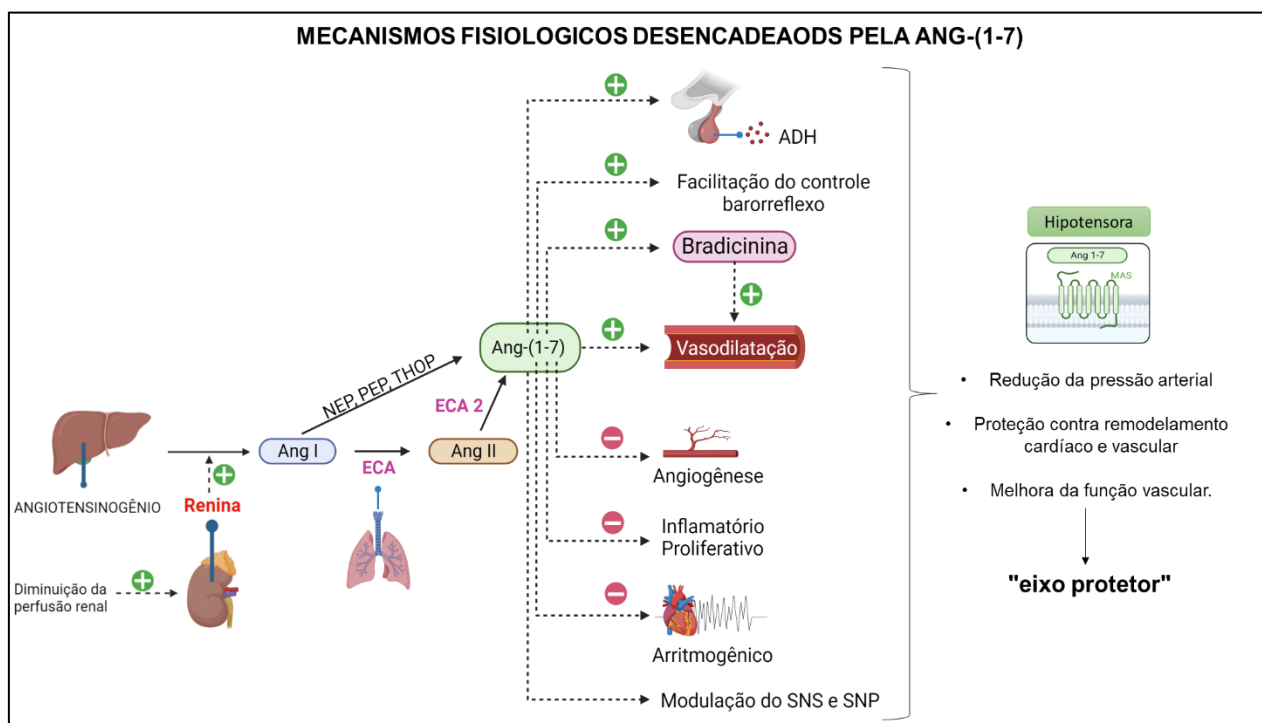


Figura 3. Representação esquemática dos mecanismos fisiológicos desencadeados pelo eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ receptor MAS para o controle da pressão arterial. ADH= hormônio antidiurético; Ang = angiotensina; ECA= enzima conversora de angiotensina; ECA 2= enzima homóloga a ECA; NEP= endopeptidase neutra; PEP= prolil endopeptidase; SNS= sistema nervoso simpático; SNP= sistema nervoso parasimpático; THOP= thimet oligopeptidase.

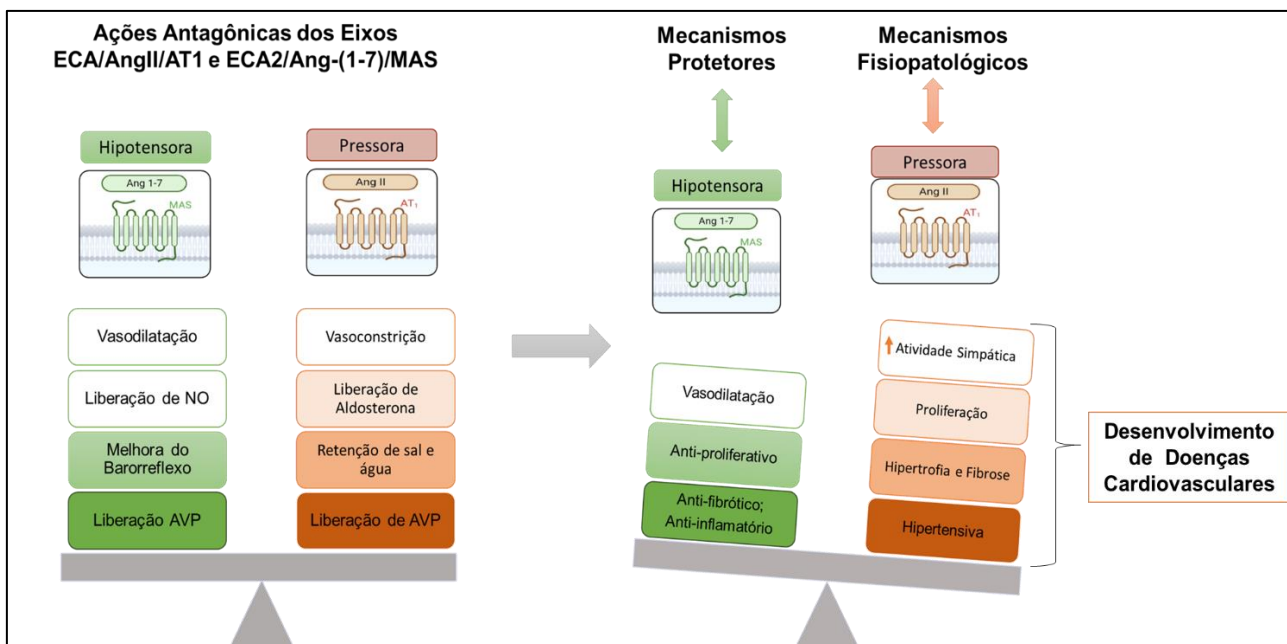


Figura 4. Principais ações antagônicas dos eixos ECA/AngII/AT1 e ECA2/Ang-(1-7)/MAS. Através do receptor AT1, a Ang II induz inflamação, fibrose, angiogênese, migração celular e metástase, enquanto a Ang-(1-7), através de receptor Mas, apresenta efeitos antiinflamatório, anti-fibrótico, antiproliferativo. AVP= vasopressina; NO= oxido nítrico.

1.3. SRA em Fêmeas

Existem importantes diferenças de sexo/gênero relacionadas aos componentes do SRA e às respostas a diferentes estímulos, por isso, estudos em fêmeas ou comparações de gêneros, com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre tratamento e controle de diferentes doenças, entre elas as DCV, são ainda muito necessários. Está bem estabelecido na literatura que em pacientes e em animais com modelos genéticos de HA, como os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), e os ratos sensíveis a sal, são os homens e machos que desenvolvem mais precocemente e de forma mais grave hipertensão arterial em relação as fêmeas (CHEN, Y.-F.; MENG, 1991; KIENITZ; QUINKLER, 2008; MILLER, J. A.; ANACTA; CATTRAN, 1999; OUCHI *et al.*, 1987). Entretanto, mecanismos envolvidos ainda não estão completamente esclarecidos (OUCHI *et al.*, 1987; WIINBERG *et al.*, 1995).

Segundo Oparil e Miller (2005), mulheres em período de pré-menopausa apresentam menor prevalência de hipertensão do que homens da mesma idade. Estudos

mostram que estrogênios, hormônios sexuais predominantemente encontrados nas mulheres, podem ter efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular, o que pode ajudar a manter a PA, em mulheres durante a fase reprodutiva, em níveis normais e menores que a dos homens (KNOWLTON; LEE, 2012; MENDELSON; KARAS, 1999; PATTEN; KARAS, 2006; RECKELHOFF, JANE F., 2018).

Em fêmeas, os hormônios gonadais circulantes sofrem oscilações durante o ciclo estral. Estudos mostraram que a ingestão de água e sódio sofrem alterações durante as fases do ciclo pela influência do estrógeno, e que a eliminação de estrógeno através da ovariectomia além de provocar mudanças comportamentais na receptividade sexual, também provoca mudanças na ingestão de fluidos (KRAUSE *et al.*, 2003; TARTTELIN; GORSKI, 1971). Os efeitos do estrógeno são tradicionalmente genômicos e mediados por dois subtipos de receptores de estrógeno (RE), o RE α e o RE β . A presença de RE em áreas cerebrais que estão envolvidas na regulação da ingestão de sal e de líquidos aponta o estrógeno como um forte influenciador no controle central de fluidos corporais (GHAZI *et al.*, 1994; GRAVES *et al.*, 2011; ROSAS-ARELLANO; SOLANO-FLORES; CIRIELLO, 1999). O estrógeno possui característica lipofílica, podendo acessar o SNC facilmente e atuar sobre os RE localizados nas áreas responsáveis pela regulação do balanço hidroeletrólítico (GRAVES *et al.*, 2011). Estudos mostraram também que em mulheres na pré-menopausa, altos níveis de estrogênio podem atenuar tonicamente a síntese de aldosterona via RE β , contribuindo assim para manter a pressão sanguínea normal (ROSSI; CAROCCIA; SECCIA, 2019).

É interessante mencionar, no entanto, que estudos também mostram que reposição hormonal não atenua de forma significativa a HA de mulheres após a menopausa (AKKAD *et al.*, 1997; PRIPP *et al.*, 1999; SCHUNKERT *et al.*, 1997). Esse resultado sugere, que a queda dos níveis de estrógeno pode não ser o único componente envolvido na pressão mais

alta das mulheres na menopausa. Estudos mostram que os níveis séricos de andrógenos podem diminuir levemente, podem não alterar, ou podem aumentar (ALA-FOSSI *et al.*, 1998; HARTMANN *et al.*, 1997; JIROUTEK *et al.*, 1998; OVERLIE *et al.*, 1999). Além disso, estudos mostram que mulheres com síndrome dos ovários policísticos e tumores virilizantes adrenais, caracterizados por níveis elevados de testosterona, sofrem de hipertensão (MATTSSON *et al.*, 1984; SORANNO *et al.*, 1999; TALBOTT *et al.*, 1995). Estudos mostram que fêmeas SHR ovariectomizadas, com 4-5 semanas de idade, não apresentam PA elevada em comparação a fêmeas intactas, com 18-20 semanas de idade (RECKELHOFF, J. F.; ZHANG; GRANGER, 1998; RECKELHOFF, J. F.; ZHANG; SRIVASTAVA, 2000). No entanto, fêmeas SHR ovariectomizadas tratadas com testosterona e machos SHR, apresentam disfunção renal relativa à atenuação da relação pressão-natriurese (RECKELHOFF, J. F.; ZHANG; GRANGER, 1998).

Recentemente, os estudos têm atribuído as diferenças em sexo/gênero com relação a regulação da PA e ao desenvolvimento de DCV a diferenças na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (ROWLAND; FREGLY, 1992), ao SRA (COLBY; SKELTON; BROWNIE, 1970; SEELY *et al.*, 1999), a diferenças na resposta inflamatória (BROWN *et al.*, 1981; KAPLAN *et al.*, 1976), na função renal (SMITHIES, 1997), na relaxina (SAMUEL *et al.*, 2007) e fatores relacionados à programação fetal (CAMBOTTI *et al.*, 1984). Com relação ao foco do nosso trabalho, algumas diferenças na expressão de componentes do SRA entre machos e fêmeas já foram descritas na literatura. Os estudos mostram que o estrógeno é capaz de regular componentes do SRA, podendo diminuir a síntese de renina e ECA, atenuar as ações de Ang II, além de promover a redução de receptores AT1 em diversos de tecidos, incluindo adrenal, rim, aorta, hipófise e cérebro e elevar a expressão de receptores AT2 (BROSNIHAN *et al.*, 1997; GALLAGHER *et al.*, 1999; SANDBERG; JI, 2003; BAIARD *et al.*, 2005). Além disso, estudos mostram que

altos níveis de estrógeno na fase lútea podem estimular a síntese de óxido nítrico endotelial (BEST *et al.*, 1998; GUETTA *et al.*, 1997; RUBANYI *et al.*, 1997), produzindo um efeito vasodilatador (MENDELSON; KARAS, 1999). O óxido nítrico pode regular negativamente o receptor AT1 no tecido vascular (ICHIKI, T. *et al.*, 1998), nas glândulas adrenais (USUI *et al.*, 1998) e atenuar as ações de Ang II. Foi observado que rins de fêmeas ovariectomizadas que receberam reposição estrogênica, expressaram maior quantidade de receptores AT2 e menor quantidade de receptores AT1, quando comparado a fêmeas que não receberam reposição (YANES; SARTORI-VALINOTTI; RECKELHOFF, 2008). Estudos mostram também que homens têm níveis de PA e aldosterona mais altos do que as mulheres (BACHMANN *et al.*, 1987; ELCARTE LÓPEZ *et al.*, 1993). Além disso, estudos realizados em humanos mostraram que mulheres tem maior concentração de Ang-(1-7) circulante que homens, no entanto, os níveis de Ang II são semelhantes entre os grupos (SULLIVAN *et al.*, 2015). O impacto do receptor MAS na hemodinâmica renal parece ser sexualmente dimórfico, com maiores efeitos em fêmeas do que machos (SAFARI *et al.*, 2012).

Sandberg *et al.* (2003) exemplificou as interações de esteroides gonadais com o SRA e mostrou que os esteroides gonadais podem regular a PA alterando a reabsorção de sódio através da modulação da secreção de aldosterona ou através do deslocamento da curva pressão-natriurese. Outros mecanismos ativados pelo SRA também poderiam regular a PA alterando o estado de estresse oxidativo por meio da modulação do metabolismo de espécies reativas de oxigênio (Figura 5).

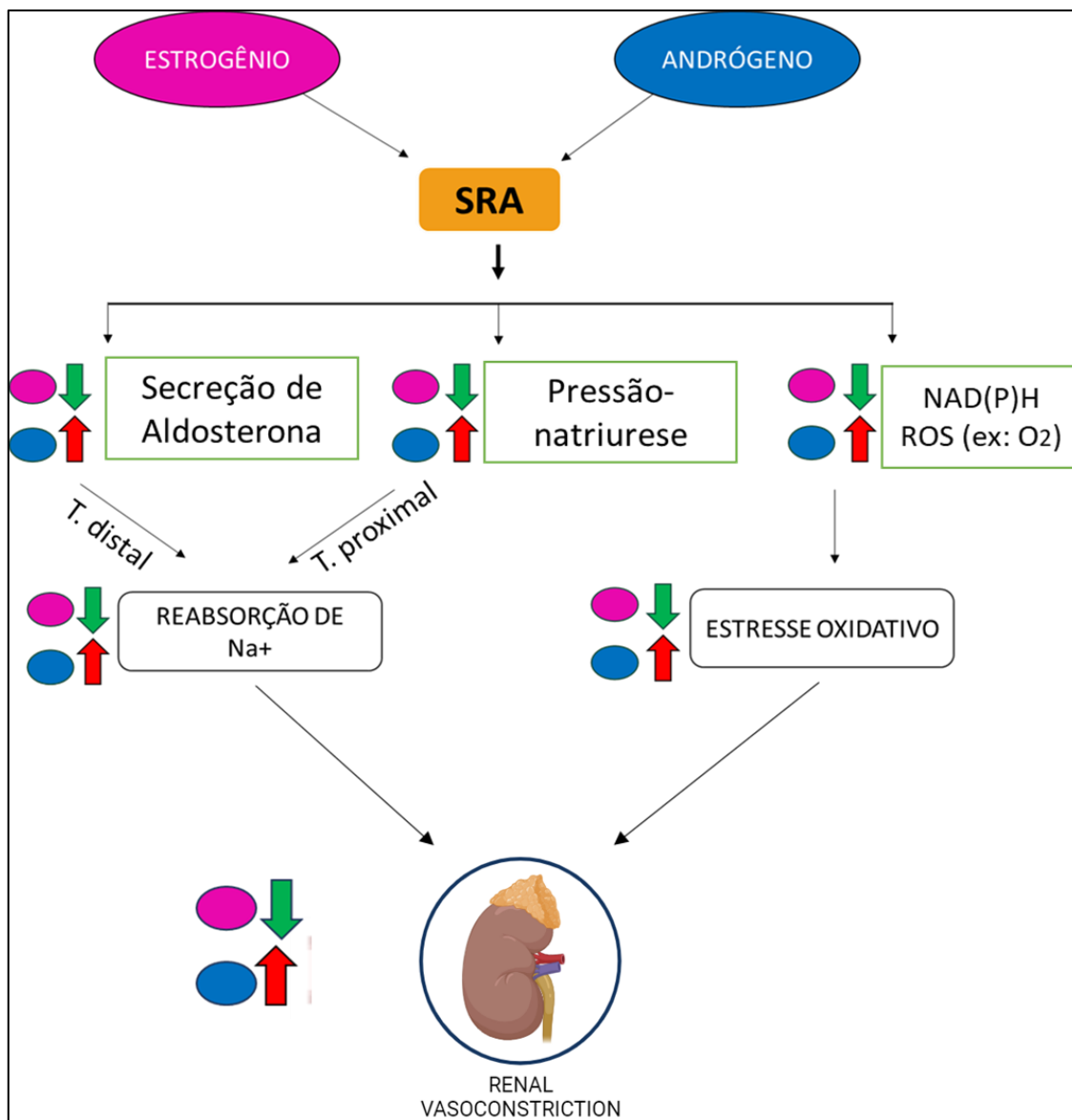


Figura 5. Esquema simplificado apresentado o efeito das interações entre esteroides gonadais e o SRA. Os esteroides gonadais podem regular a PA alterando a reabsorção de sódio através da modulação da secreção de aldosterona ou através do deslocamento da curva pressão-natriurese e/ou alterando o estado de estresse oxidativo por meio da modulação do metabolismo de espécies reativas de oxigênio. Modificado de: Sandberg et al., 2003.

1.4. Animal Transgênico [TGR(A1-7) L7371]

A utilização de modificação genética de ratos e camundongos é uma estratégia fundamental para investigar os efeitos da alteração da expressão de genes específicos e compreender o funcionamento dos sistemas de controle fisiológicos. Assim, os animais transgênicos são ferramentas de pesquisa importantes para analisar o papel de genes

específicos na regulação de processos biológicos e elucidar suas funções em diferentes sistemas e órgãos. Ao introduzir modificações genéticas, como a superexpressão de genes-alvo, é possível avaliar os efeitos dessas alterações nas características fenotípicas dos animais. A utilização de modelos de animais transgênicos que superexpressam ou que apresentam deleção (“knockouts”) de genes relacionados a componentes do SRA tem contribuído para ampliar o conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos no controle da fisiologia e fisiopatologia cardiovascular (BADER, 1998).

Em decorrência da importância do SRA para o controle da PA e sua participação na fisiopatologia das DCV, alguns modelos de animais transgênicos com alteração na atividade de algum dos componentes do SRA já foram descritos. Uma série de modelos de camundongos com deleção ou superexpressão de genes do SRA foram descritos (ALVES *et al.*, 2021; BADER, 2002; BADER; GANTEN, 2008; SANTOS, S. H. S. *et al.*, 2010). Embora em número menor, ratos transgênicos também foram desenvolvidos, entre eles, o mREN2-L27, um animal hipertenso que apresenta super-expressão de renina especialmente no cérebro e adrenais (MULLINS; PETERS; GANTEN, 1990), o AOPEN-L-680, que expressa um anti-sense para angiotensinogênio no cérebro (SCHINKE *et al.*, 1999) e o L-3292, um rato que apresenta níveis circulantes aumentados de Ang-(1-7) induzidos pela expressão testicular de uma proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) (SANTOS, *et al.*, 2004; VOIGT *et al.*, 2005).

O constructo da linhagem L3292 foi associado ao promotor inespecífico de citomegalovírus que direcionou a expressão exclusivamente para o testículo. Esta linhagem é normotensa, avaliado por medida da PA por telemetria, apesar nos níveis plasmáticos aumentados de Ang-(1-7) em cerca de 2,5 vezes (SANTOS *et al.*, 2004). Além disso, o L3292 apresenta a FC e contratilidade miocárdica mais elevada que os ratos controles, Sprague-Dawley (SANTOS, *et al.*, 2004). No entanto, os estudos mostraram que os ratos

L3292, apresentam resposta atenuada a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol ou redução da disfunção induzida por isquemia miocárdica e apresentam redução do fluxo urinário (FERREIRA *et al.*, 2006, 2010). Esses animais não apresentam alteração na liberação de vasopressina ou na expressão renal do receptor V2 de vasopressina (FERREIRA *et al.*, 2006). De forma interessante, L3292 apresentaram resposta atenuada a hipertensão arterial, bem como, proteção à disfunção diastólica induzida pelo modelo DOCA-SAL (DE ALMEIDA *et al.*, 2015; SANTIAGO *et al.*, 2010). Parte desses efeitos podem estar relacionadas a alteração no controle autonômico (DARTORA *et al.*, 2017). Além disso, estes animais apresentaram atenuação das alterações que caracterizam a síndrome metabólica induzida por dieta de cafeteria (BILMAN *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2010). Finalmente estes animais apresentaram redução do comportamento de ansiedade e depressão (KANGUSSU *et al.*, 2017) e de resposta ao estresse emocional (MOURA *et al.*, 2017).

Recentemente, uma nova linhagem de animal transgênico foi descrita, o rato TGR(A1-7)-L7371 (TG), a partir do trabalho em colaboração do nosso laboratório com o laboratório do Prof. M Bader no “Max Delbrück Center for Molecular Medicine” (MDC), em Berlim, na Alemanha. Esta linhagem foi desenvolvida baseada na metodologia descrita por Kats *et al.* (2001) e Methot *et al.* (2001), utilizando uma proteína de fusão contendo a sequência do peptídeo de interesse e que é capaz de ser expressa em um tecido específico. A partir de um constructo que é injetado em zigotos e implantado em ratas pseudo-grávidas da linhagem de ratos Sprague-Dawley (SD) O constructo, mostrado na Figura 6 foi constituído por: (1) peptídeo sinal derivado da renina humana, garantindo que a proteína entre no retículo endoplasmático e futuramente seja secretada para o meio extracelular; (2) porção da região constante da cadeia pesada da IgG2b de camundongo, que promove massa para a proteína de fusão; (3) porção do pró-segmento da pró-renina humana, que funciona

como um espaçador molecular, sendo necessário para expor o sítio de clivagem para a endoprotease furina, resultando na liberação do peptídeo; (4) sequência do sítio de clivagem na porção carboxi terminal do pró-segundo da pró-renina humana, sendo que neste sítio de clivagem a endoprotease furina atuará liberando a Ang-(1-7) nos tecidos, (5) sequência do peptídeo Ang-(1-7) e, finalmente, (6) a sequência Poly A. Para direcionar a expressão gênica para astrócitos foi adicionado na extremidade 5' do *construct* o promotor específico para a proteína fibrilar acídica humana (hGFAP). A expressão do transgene [TGR(A1-7)L7371] nesses animais, induz a liberação contínua de Ang-(1-7), promovendo aumento de sua concentração nos tecidos em que a proteína for produzida, preferencialmente em astrócitos do SNC.

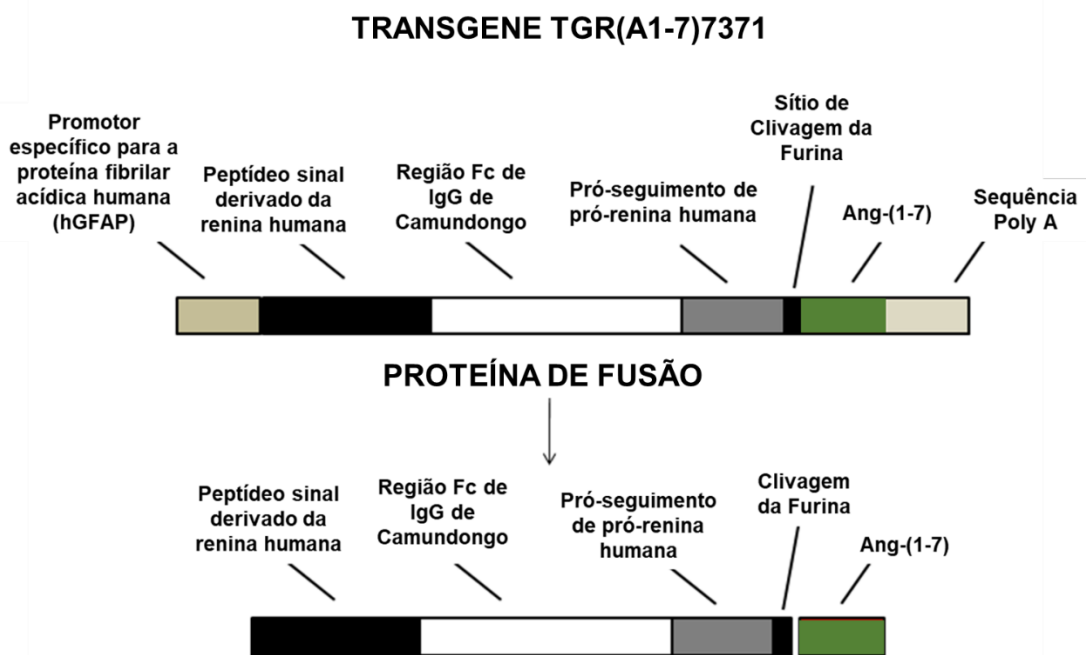


Figura 6. Representação esquemática da sequência do construto (transgene) e da proteína de fusão por ele codificada que foi utilizada para a geração dos ratos [TGR(A1-7)L7371]. Fonte: Santos et al., 2004.

Estudo recente desenvolvido em nosso laboratório (ALVES *et al.*, 2021), descreveu o fenótipo cardiovascular e hemodinâmico dos machos desta linhagem de transgênicos. Os

TG apresentaram aumento da expressão (mRNA e Western Blotting) da proteína de fusão de Ang-(1-7) em diferentes órgãos/ tecidos. Alta expressão do transgene foi observada na aorta e áreas do cérebro, tais como, bulbo, hipocampo, hipotálamo e córtex. Níveis baixos foram encontrados no pulmão, coração, rim, fígado e adrenal (ALVES *et al.*, 2021). Nos tecidos a expressão do mRNA foi observada em células gliais e nas células endoteliais, o que explica a detecção do mRNA na maioria dos órgãos analisados. Entretanto, os TG apresentaram aumento dos níveis de Ang-(1-7), determinado por radioimunoensaio, no cérebro (hipotálamo especialmente) sem alteração dos níveis plasmáticos ou dos níveis de Ang II no plasma ou cérebro (ALVES *et al.*, 2021). Os ratos TG apresentaram aumento do fluxo sanguíneo em diferentes órgãos e tecidos, o que resultou na diminuição significativa da resistência periférica total, responsável pelo fenótipo hipotensivo desses ratos. De acordo com esse fenótipo, os TG apresentaram aumento dos níveis plasmáticos do peptídeo natriurético atrial plasmático, sabidamente um peptídeo vasodilatador. No entanto, os TG também apresentaram alterações em parâmetros ou hormônios que em geral aumentam a PA, como aumento do índice cardíaco, aumento do tônus simpático global e cardíaco e aumento dos níveis plasmáticos de vasopressina. Essas alterações sugerem que a superexpressão da proteína de fusão Ang-(1-7) em tecidos desencadeia múltiplos mecanismos diretos e/ou parcialmente compensatórios que tem como resultado uma PA basal reduzida. Esse é o primeiro e o único modelo de ratos transgênicos a avaliar os efeitos induzidos por Ang-(1-7) tecidual sem alterações significativas nos níveis de peptídeo do SRA circulantes. Desta forma, o TG se torna um bom modelo animal para explorar novas contribuições da Ang-(1-7) tecidual para a fisiopatologia de diferentes doenças, entre elas, as doenças cardiovasculares.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

As DCV são as principais causas de morbimortalidade no Brasil e no resto do mundo e, apesar da ampla disponibilidade de medicamentos para o tratamento da hipertensão arterial e as DCV, o controle efetivo destas doenças ainda não foi alcançado. Além disso, a fisiopatologia das DCV e a resposta aos tratamentos em fêmeas ou mulheres são pouco estudados. Considerando, as importantes diferenças de sexo/gênero no que se refere aos mecanismos de controle da PA, é importante ampliar o conhecimento da fisiopatologia das DCV especificamente em fêmeas. Uma característica das DCV é o desequilíbrio entre os componentes do SRA, com hiperatividade do eixo ECA/ Ang II/ receptor AT1 enquanto o eixo ECA2-Ang-(1-7)-receptor Mas não apresenta alteração ou pode estar reduzido. Esse desequilíbrio favorece mecanismos hipertensivos, pró-fibróticos e inflamatórios, que contribuem para os desfechos mais importantes da DCV, o infarto do miocárdio, a insuficiência cardíaca e o acidente vascular encefálico. Embora o SRA sistêmico tenha papel estabelecido no controle da PA, há muito tempo o SRA tecidual, ou seja, a produção ou a ação dos peptídeos do SRA nos tecidos, como coração, vasos, rim e cérebro tem sido apontado como um regulador importante e independente da função cardiovascular, entre outras (SANTOS *et al.*, 2018). Mais importante, a fisiopatologia das DCV está relacionada de forma importante a desregulação do SRA tecidual (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008). O entendimento do SRA tecidual e seu papel nos processos fisiopatológicos tem importante implicações clínicas, uma vez que podem fornecer uma base para o desenvolvimento de novas e mais efetivas terapias.

Em decorrência da importância do SRA para o controle da PA e sua participação na fisiopatologia das DCV, alguns modelos de animais transgênicos com alteração na

atividade de algum dos componentes do SRA já foram descritos. Recentemente, um novo rato transgênico que expressa uma proteína de fusão produtora de Ang-(1-7), sob regulação do promotor GFAP, foi descrito. A caracterização fenotípica do macho desta linhagem mostrou uma característica interessante, esses animais apresentam aumento de Ang-(1-7) cerebral sem alteração nos níveis circulantes e são hipotensos. Assim, essa linhagem de animais transgênicos com produção tecidual aumentada de Ang-(1-7) apresenta-se como um modelo interessante para se estudar o efeito do aumento tecidual de longo prazo da Ang-(1-7) na fisiopatologia de diferentes doenças, entre elas as DCV, tanto em machos como fêmeas. No entanto, ampliar o entendimento das ações da Ang-(1-7) especificamente em fêmeas deverá contribuir para o estabelecimento de estratégias terapêuticas mais efetivas e individualizadas de acordo com sexo/ gênero.

2.2 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os parâmetros cardiovasculares de ratas transgênicas que super-expressam a proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) e comparar com machos transgênicos da mesma linhagem.

2.3. Objetivos Específicos

- 2.3.1. Avaliar os parâmetros cardiovasculares dos animais transgênicos da linhagem TG;
- 2.3.2. Avaliar o controle barorreflexo da FC dos animais transgênicos da linhagem TG;
- 2.3.3. Avaliar o controle autonômico cardíaco dos animais transgênicos da linhagem TG;

2.3.4. Avaliar os níveis plasmáticos de angiotensinas dos animais transgênicos da linhagem TG;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Nesse estudo foram utilizados ratos transgênicos, TGR(A1-7)L7371 (TG) e como grupo controle ratos Sprague-Dawley (SD). Foram utilizados ratos machos e fêmeas entre 3-4 meses de idade (350g-450g). A matriz da linhagem transgênica foi desenvolvida no “Max Delbruck Center for Molecular Medicine” (MDC), Berlim - Alemanha, em trabalho de colaboração com o Laboratório de Hipertensão ICB/UFMG. Os animais utilizados neste estudo, foram criados no biotério de animais transgênicos do Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, e mantidos em ambiente com luz e temperaturas controladas, com período de claro/escuro de 12/12 h, alimentados com ração apropriada e água filtrada *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG), e aprovados sob o protocolo n° 13/2022.

3.2 Genotipagem dos Animais

Para comprovar a matriz da linhagem transgênica, todos os animais foram identificados, antes da realização dos experimentos, utilizando a técnica de genotipagem através da amplificação de sequências repetidas de DNA, usando a reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA genômico foi extraído de pequenos fragmentos da cauda dos animais. Utilizou-se, aproximadamente, 2 mm de cauda digerido com 5 µL de proteinase K

em 100 μL de EAR buffer, por 3 horas a 55 $^{\circ}\text{C}$ em banho-maria ou termomix. Para a inativação da proteinase e interrupção da digestão das caudas, foram adicionados 750 μL de TE 1x em cada amostra seguido de incubação a 95 $^{\circ}\text{C}$, por 10 minutos.

Dois μL de cada amostra de gDNA foi utilizado na realização da PCR. Para compor as soluções, também se fez o uso de 5 μL de tampão de reação, 2 μL de MgCl_2 , 1 μL de dNTPs, foram utilizados também dois oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) sendo, 1 μL de primer HRenex (5'-GGACCAAGCCTGGCCATGTCC-3') e 1 μL de primer Ig5 (5'-CATCACCCATCGAGAGAACC-3') responsáveis pela amplificação do fragmento de DNA, 0,2 μL de Taq DNA polimerase recombinante e 37,8 μL de água milli-Q autoclavada. As soluções foram colocadas no termociclador seguindo as condições de tempo e temperatura. Posteriormente, os produtos obtidos do PCR foram diferenciados por eletroforese, 100 V, 30 min, em gel de agarose 1% acrescido de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{l/ml}$) e analisados em um sistema de fotodocumentação (“Gene Snap from SynGene). A presença de banda correspondente a 450pb indica que o animal apresenta o transgene. Como controle positivo foi utilizado tecido do animal transgênico TG(A-7)-L3292.



Figura 7. Representação da imagem de um gel de agarose corado por brometo de etídio. A banda positiva [verde] que identifica os ratos TG7371; controle positivo [azul] que identifica os ratos TG(A-7)-L3292; e controle negativo sem cDNA [alaranjado]. Primes utilizados Hrenex e IgG5.

3.3 Pletismografia de Cauda

Para avaliar a pressão arterial (PA) de forma não invasiva, foi utilizado o sistema de medida por pletismografia de cauda da CODA High Throughput (Kent Scientific®, Torrington, CT, USA). O sistema oferece os valores de PA sistólica (PAS) e está ilustrado na Figura 8. Para realizar a medida, o animal era colocado em um contensor de acrílico e posicionado em uma plataforma de aquecimento para elevar a temperatura do animal o que produz dilatação da artéria da cauda. A temperatura da cauda recomendada pelo fabricante para a medida é de 32-35°C aproximadamente. Em seguida, o animal era conectado ao pletismógrafo que consiste de um sensor (VPR, Kent Scientific) e de um manguito-esfignomanômetro, que envolve a cauda do rato. A seguir o esfignomanômetro era inflado automaticamente pelo aparelho, promovendo a compressão da artéria caudal do animal o que possibilita a medida da PA. O sistema estava configurado para a obtenção de cinco

ciclos de medidas iniciais para adaptação seguidos por cinco ciclos de medida, com intervalo de 15s entre elas. Os animais foram submetidos a um período de aclimação e familiarização ao equipamento que variou de 2 a 7 dias com a realização de todos os procedimentos diariamente no mesmo horário, entre 09-11h. Os valores de PAS obtidos no dia subsequente ao da familiarização ao aparelho foram os considerados neste estudo.

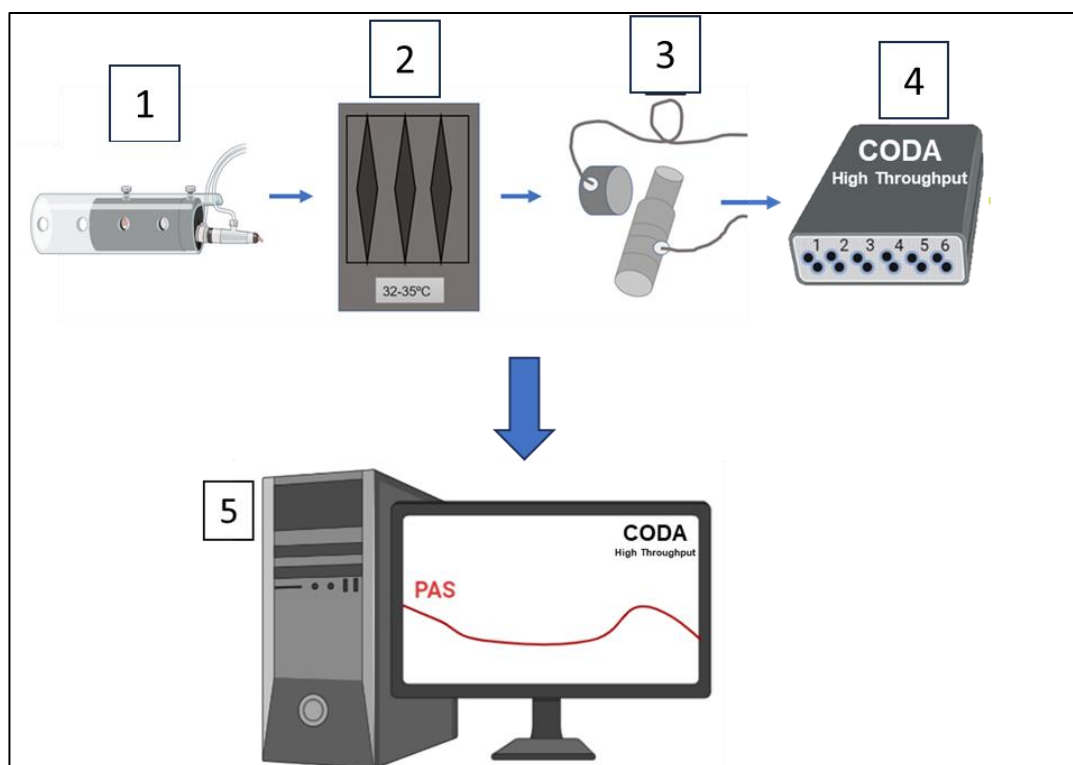


Figura 8. Representação esquemática do método de medida da pressão arterial sistólica (PAS) de forma não invasiva realizada por pletismografia de cauda (CODA High Throughput). 1- Contensor de acrílico; 2- Placa para aquecimento do animal; 3- sensor e manguito-esfigmomanometro; 4- Conversor analógico digital; 5- Computador onde está instalado software para controle, coleta, análise e armazenamento das medidas.

3.4 Avaliação do Ciclo Estral

O ciclo reprodutivo de ratas, ciclo estral, tem curta duração, de quatro a cinco dias e é caracterizado por fases denominadas proestro, estro, metaestro e diestro. As variações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral determinam alterações importantes na mucosa vaginal, podendo ser identificadas de acordo com os tipos celulares observados no esfregaço

vaginal: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos, representado na Figura 9. Na fase de proestro pode ser observado um grande número de células redondas, polinucleadas que podem estar dispersas ou agrupadas. Na fase de estro evidencia-se a presença de células queratinizadas e anucleadas, enquanto no metaestro são observados inúmeros leucócitos e filamentos de muco. No diestro a mucosa vaginal é fina com poucos leucócitos, algumas células queratinizadas e muco.

A avaliação do ciclo estral foi realizada através da coleta do esfregaço vaginal, sempre no mesmo horário, 11-12h, durante 15 dias, para assegurar a regularidade do ciclo antes da realização de experimentos. Com uso de pipeta Pasteur contendo 0,5 mL de solução de cloreto sódio a 0,9%, a ponta da pipeta era introduzida no orifício vaginal das ratas e uma gota da solução salina coletada, aspirada e gotejada em lâminas de vidro para a observação em microscópio óptico comum (Figura 9). Essa avaliação teve como objetivo avaliar se havia diferença da pressão arterial sistólica (PAS) entre as fases do ciclo estral. A PAS e a fase do ciclo foram avaliadas no mesmo dia e nos mesmos animais. Para isso, os últimos 5 dias de avaliação do ciclo e da PAS foram os considerados neste estudo.

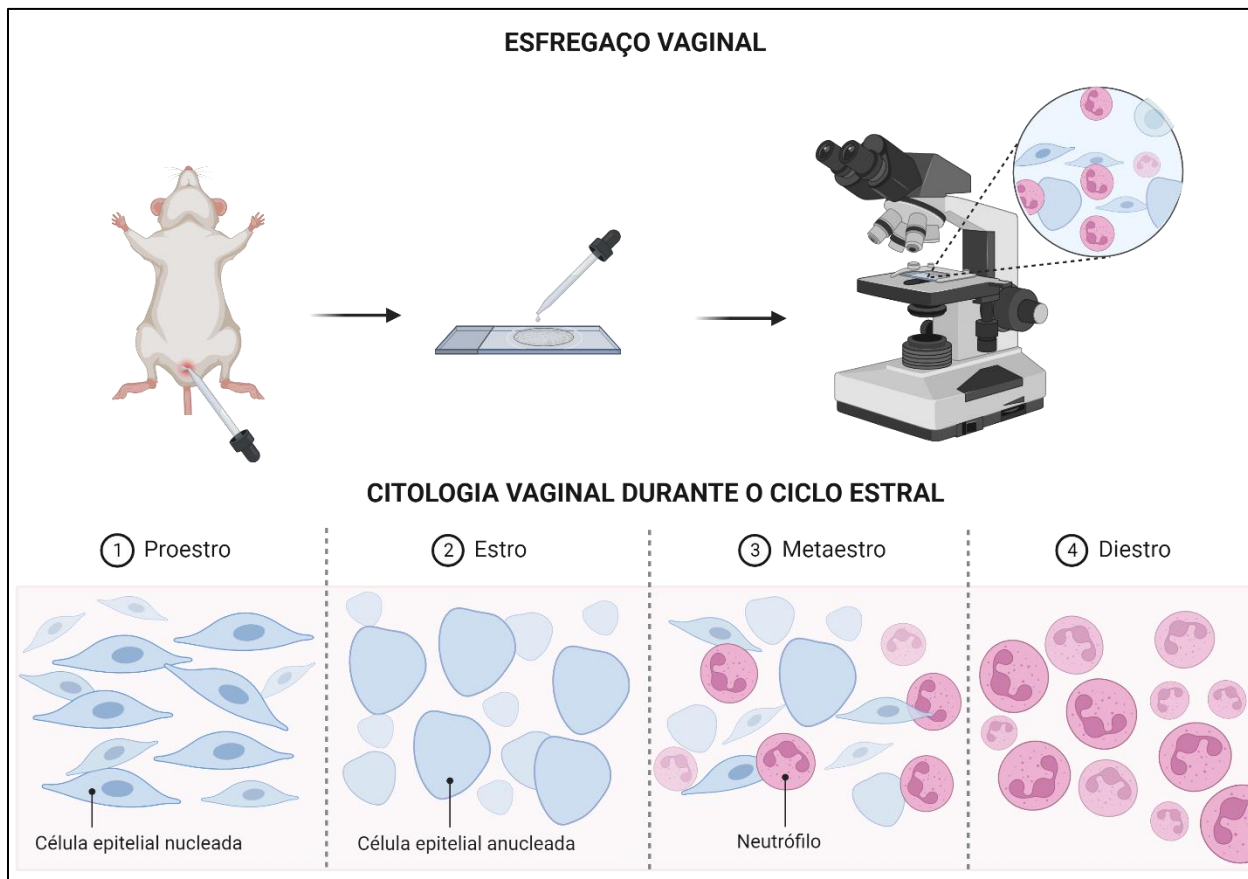


Figura 9. Representação esquemática do método de avaliação e da característica celular nas diferentes fases do ciclo estral através de coleta do esfregaço vaginal.

3.5 Medida Direta de Parâmetros Cardiovasculares

Para a avaliação dos parâmetros cardiovasculares, pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foi utilizado um transdutor de pressão acoplado a um amplificador de sinal e sistema de aquisição de dados (Biopac® Systems, CA, USA; Figura 9). Para o registro da pressão arterial e injeção de drogas, foi realizada a canulação da artéria e da veia femoral, respectivamente.

3.6 Cirurgia para Canulação da Artéria e Veia Femoral

Inicialmente os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina (80 mg/Kg) e Xilazina (8 mg/Kg) injetada por via intraperitoneal (0,1 mL/100g). As cânulas

foram preparadas a partir da polimerização por aquecimento de tubos de polietileno PE10, que era introduzido nos vasos (4 cm - artéria; 3 cm - veia), e PE50 (17 cm), que foi direcionado pelo subcutâneo até o dorso do animal. As cânulas foram preenchidas com salina estéril 0,9% contendo heparina (5000UI/ ml) com o objetivo de evitar a obstrução das cânulas. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica, a região inguinal esquerda do animal tricotomizada e uma pequena incisão na pele (~ 1,0 cm) foi realizada. O feixe vâsculo-nervoso femoral foi localizado, e a artéria e a veia femoral foram cuidadosamente isoladas. Primeiramente, a cânula foi introduzida na veia femoral para a futura administração de fármacos. Em seguida, uma segunda cânula foi introduzida na aorta abdominal, através da artéria femoral, para o registro da pressão arterial pulsátil. Após a canulação dos vasos, as cânulas foram direcionadas pelo subcutâneo para serem exteriorizadas e fixadas ao dorso do animal na região entre as escápulas com fio de sutura cirúrgico. Finalmente, as incisões cirúrgicas foram suturadas. Ao final do procedimento cirúrgico, foi realizada a injeção intramuscular de antimicrobiano de amplo espectro (Pentabiótico veterinário Ford Dodge 2.400 UI/ 0,1 ml; dose única) e os animais eram colocados em gaiolas individuais.

No dia seguinte, aproximadamente 24h após a canulação da artéria e veia femoral, os animais foram submetidos ao registro dos parâmetros cardiovasculares, e para isso, o catéter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (DT-XX-Viggo-Spectramed), que por sua vez estava conectado ao sistema de aquisição de dados (BIOPAC System), que faz a conversão do sinal analógico de pressão arterial pulsátil (PAP) em sinal digital. A pressão arterial média (PAM) e FC foram calculadas a partir da PAP pelo software “AcqKnowledge 4.1 software” (BIOPAC system; Figura 10). Para obtenção dos valores basais, a PA foi continuamente monitorada por um período de aproximadamente 60 minutos, e posteriormente foram realizados diferentes protocolos experimentais.

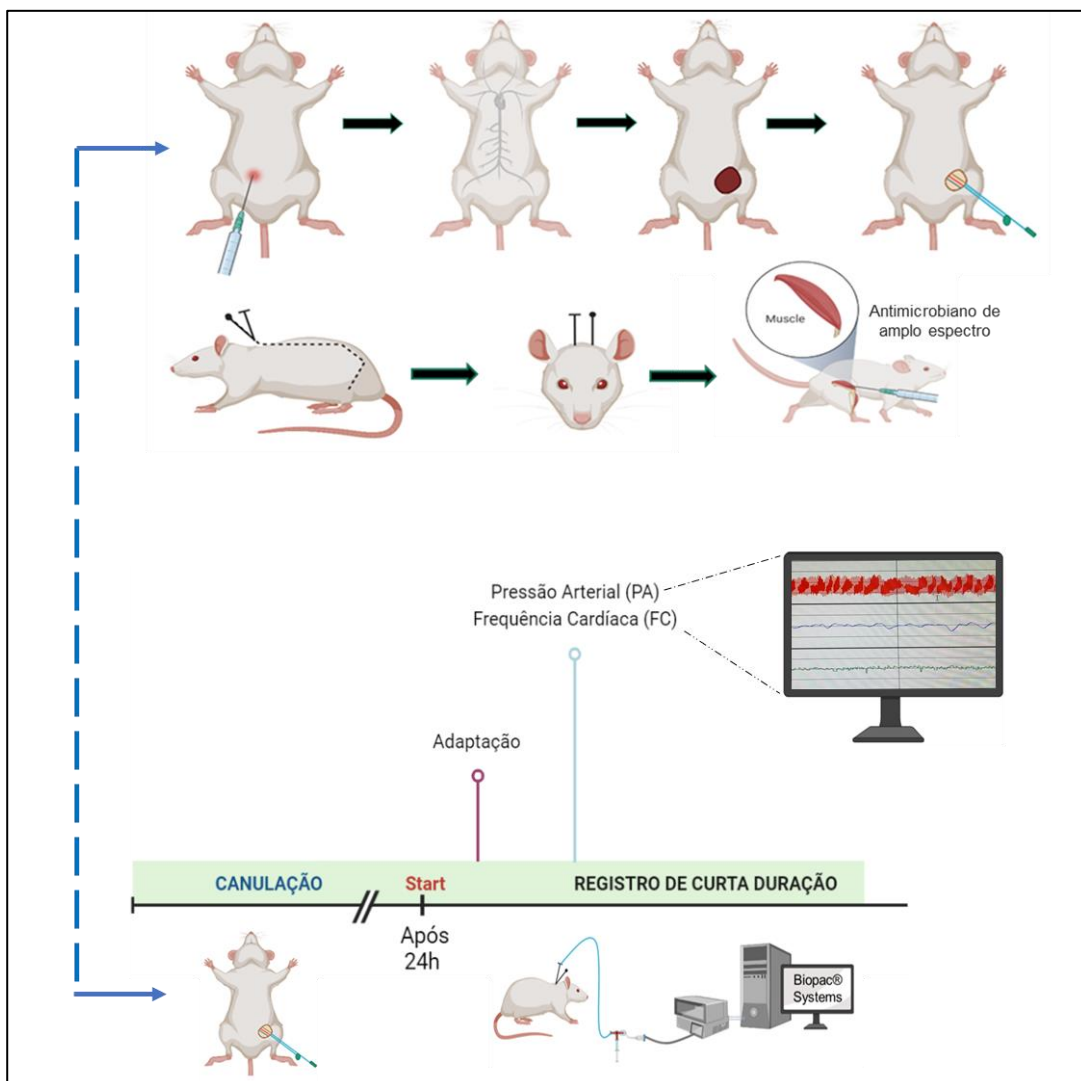


Figura 10. Representação esquemática do método de canulação de veia e artéria femoral (Dia 1) e o protocolo de medida de PA no sistema de aquisição de dados (BIOPAC System), em animais conscientes.

3.7 Avaliação da Sensibilidade do Componente Bradicárdico do Barorreflexo

Nesse método, os animais foram submetidos à injeção endovenosa (0,1 ml em bolus) de doses crescentes de fenilefrina, agonista α 1-adrenérgico, (Sigma, 0,25 μ g a 5 μ g por animal), de maneira a se obter respostas pressoras de aproximadamente 10, 20, 30, 40-50 mmHg. Um intervalo mínimo de 2-4 minutos foi adotado entre a administração de cada dose de fenilefrina para que a PAM e a FC retornassem aos seus valores basais. As soluções contendo diferentes concentrações de fenilefrina foram preparadas a partir de alíquota (mantida a -20°C) de uma solução estoque contendo 1 mg/ ml. A fenilefrina provoca aumentos transitórios da PAM e esses aumentos levam a um aumento da atividade dos barorreceptores arteriais, que reflexamente induzem redução da FC. Com isso, a finalidade desse experimento foi avaliar a sensibilidade do controle barorreflexo cardíaco através das variações barorreflexas de FC induzidas por alterações de PAM produzidas por doses crescentes de fenilefrina. As reduções máximas da FC foram convertidas em intervalo de pulso (IP) através da fórmula: IP em milissegundos (ms) = 60.000/FC. A sensibilidade do barorreflexo foi estimada pela média aritmética das razões entre as alterações de IP (ms) e alterações da PAM (mmHg) para cada dose de fenilefrina, sendo denominado Índice de Sensibilidade Barorreflexa como largamente utilizado na literatura e padronizado em nosso laboratório (GUIMARAES *et al.*, 2012, 2014; KANGUSSU *et al.*, 2015).

3.8 Avaliação do Controle Autônomo da Frequência Cardíaca

Após o teste do barorreflexo, o tônus autonômico cardíaco foi determinado nos mesmos animais, de acordo com o método de Soato e Krieger (1974) e padronizado em nosso laboratório por (GUIMARAES *et al.*, 2012.). Esse método consiste em promover o bloqueio farmacológico da atividade simpática e parassimpática para o coração de forma

sequencial em dois dias consecutivos. No primeiro dia, os ratos foram submetidos inicialmente ao bloqueio muscarínico com metil-atropina (3 mg/ kg, iv) e a variação máxima da FC em um período de 15-20 min foi coletada. Em seguida, os ratos foram submetidos ao bloqueio β -adrenérgico com propranolol (6 mg/ kg, iv) e o valor da FC após 15-20 min foi coletado. A FC observada após o segundo bloqueio correspondendo à FC intrínseca, ou seja, a frequência na ausência de modulação autonômica. A diferença entre a FC máxima, obtida após a metil-atropina, e a FC intrínseca foi considerada como sendo o tônus simpático. No dia seguinte, os bloqueadores autonômicos foram injetados na ordem inversa, ou seja, primeiro foi injetado o propranolol para obter o valor mínimo da FC e em seguida a metilatropina. A diferença entre a FC intrínseca e a FC mínima, obtida após o propranolol, foi considerada como sendo o tônus parassimpático.

3.9 Determinação do nível plasmático de Angiotensinas

Para a determinação dos níveis de angiotensinas plasmáticas, os animais foram decapitados e, em seguida, aproximadamente 2 mL de sangue cervical foram coletados em tubos de polietileno, mantidos em gelo, contendo 140 μ l de um coquetel de inibidores enzimáticos para cada ml de sangue. Os inibidores tem o objetivo de proteger as angiotensinas de hidrólise, e o coquetel incluía: Parahidroximercuriobenzoato (pOH-HgBZ, 1mM), O-fenantrolina (o-Phe, 30 mM), Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF, 1mM), EDTA (7,5%) e Pepstatina A (1mM). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 20 min à 4°C e o plasma rapidamente separado e armazenado a -80 °C até o processamento das amostras.

As angiotensinas do plasma foram isoladas em colunas SepPack C18, por pressão negativa em coletor a vácuo Visiprep™ SPE, que separam os peptídeos das proteínas totais. A resina C18 das colunas foi ativada por duas lavagens sequenciais com 10 mL de

acetonitrila (ACN, 99%)/ ácido trifluoroacético (TFA, 0,1%), seguido por 10 mL de TFA (0,1%). Em seguida, a resina foi lavada com 3 mL de TFA (0,1%) contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA), 10 mL de ACN (10%)/ TFA (0,1%) e 3 mL de TFA (0,1%). As amostras (1 ml) foram então carregadas na coluna, que em seguida foi lavada com 20 mL de TFA (0,1%) e, em seguida com 3 mL de ACN (20%)/ TFA (0,1%). Finalmente, os peptídeos foram eluídos em 3 mL de ACN (99%)/ TFA (0,1%) em tubos de polipropileno saturados com BSA (0,1%). As amostras foram então completamente secas em centrífuga evaporadora SpeedVac (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

A determinação dos peptídeos contidos nas amostras de plasma foi realizada por espectrometria de massa com a colaboração da estudante de pós-graduação Julia Resende e supervisão do Prof. Thiago Verano-Braga no Núcleo de Proteômica do ICB, UFMG. Para isso, cada amostra foi ressuspensa em 50 µL de água Milli-Q, 0,1% ácido fórmico (fator de concentração da amostra= 25 vezes) e, em seguida 10 µL desta solução foi carregado no sistema ACQUITY I-Class UPLC (Waters, Milford, MA, EUA) acoplado à ionização por eletropulverização (ESI – do inglês *electrospray ionization*) espectrometria de massa em tandem (LC-ESI-MS / MS Xevo TQ-S; Waters, Milford, MA, EUA). Os dados foram adquiridos através do software MassLynx™ (Waters, Milford, MA, EUA) e a quantificação foi realizada pela interpolação das áreas das amostras com as áreas de uma curva de calibração obtida através de uma solução contendo todos os peptídeos sintéticos a 1ng/ml.

3.10 Análise Estatística

Comparação ente 2 grupos foi feita pelo teste t-Student e a comparação de 3 ou mais grupos por Análise de Variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. Esta análise os gráficos foram feitos com o programa GraphPad Prism (v 9.01). Nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da Pressão Arterial Sistólica por Pletismografia.

Inicialmente avaliamos a PAS (mmHg) de forma não invasiva por pletismografia de cauda dos ratos SD e TG, machos e fêmeas. Como pode ser observado na figura 10, as fêmeas TG apresentaram valores basais de PAS ($96,0 \pm 2,8$ mmHg; $n=12$) menores do que os valores registrados por seus respectivos controles, animais SD ($118,3 \pm 0,8$; $n=10$). Da mesma forma, os TG machos apresentaram PAS menor ($108,9 \pm 3,0$ mmHg; $n=7$) que os SD machos ($125,8 \pm 2,3$ mmHg; $n=9$). Além disso, as fêmeas das duas linhagens apresentaram PAS menor do que a dos respectivos machos (Figura 11).

4.2 Avaliação do Ciclo Estral

Com o objetivo de avaliar se a PAS se alterava com as diferentes fases do ciclo reprodutivo, a medida de PAS foi realizada diária e juntamente com a determinação da fase do ciclo estral das ratas por esfregaço vaginal. Inicialmente, as fêmeas SD e TG passaram por um período de familiarização com os procedimentos, averiguando a regularidade ciclo, e os resultados coletados nos últimos 5 dias foram utilizados para análise. Tanto as fêmeas TG quanto as SD apresentaram ciclo estral regular. A figura 12, apresenta valores de PAS (mmHg) nas diferentes fases do ciclo estral (M= metaestro, D= diestro, P= proestro e E= estro). Quando não foi possível caracterizar uma única fase, a sigla DP e PE foram utilizadas indicando transição entre duas fases. Tanto as fêmeas SD quanto as TG não apresentaram diferenças significativas de PAS nas diferentes fases do ciclo.

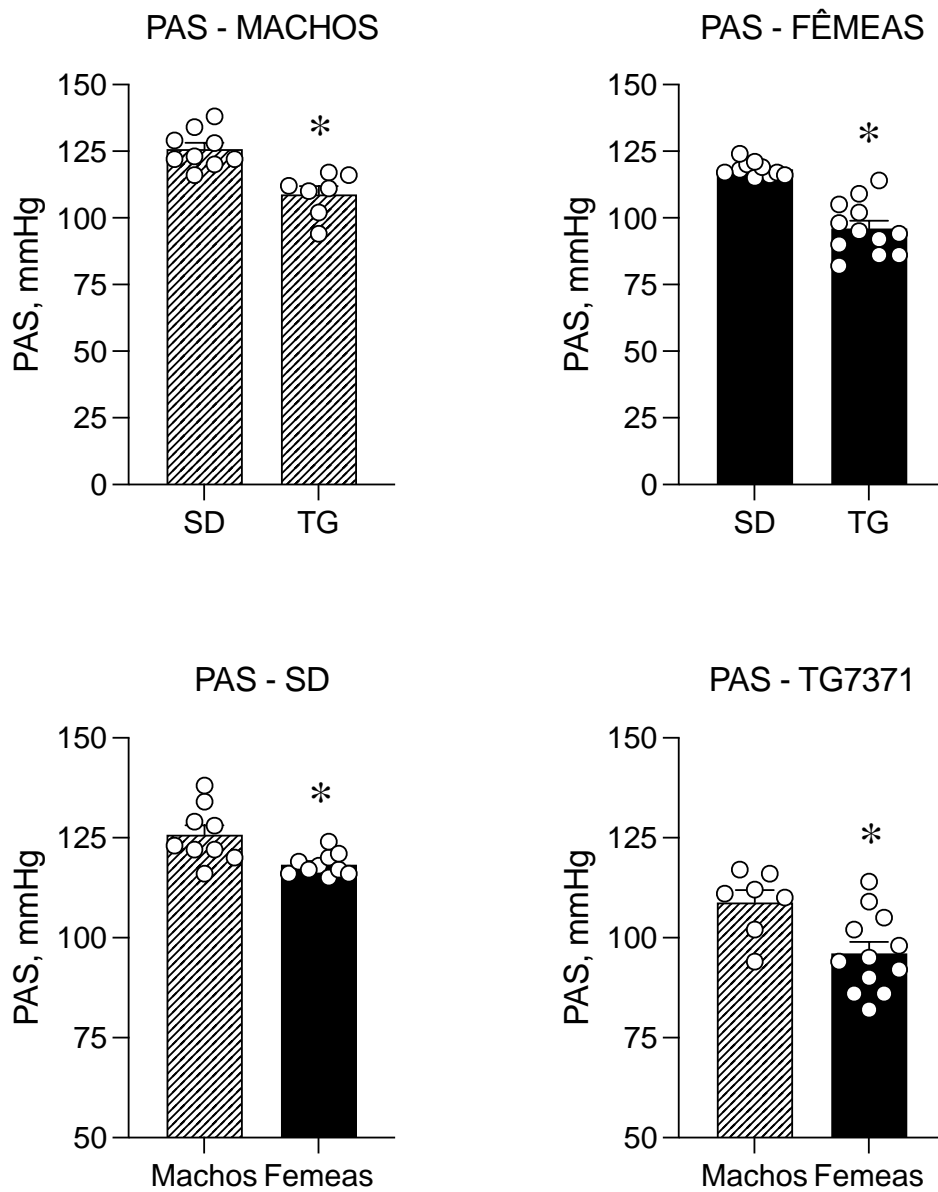


Figura 11. Valores basais de Pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medida por pletismografia de cauda. Animais SD (n=9 cada; controle) e TG (TG; n=9-15), machos e fêmeas. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao SD ou aos machos (Teste t de Student).

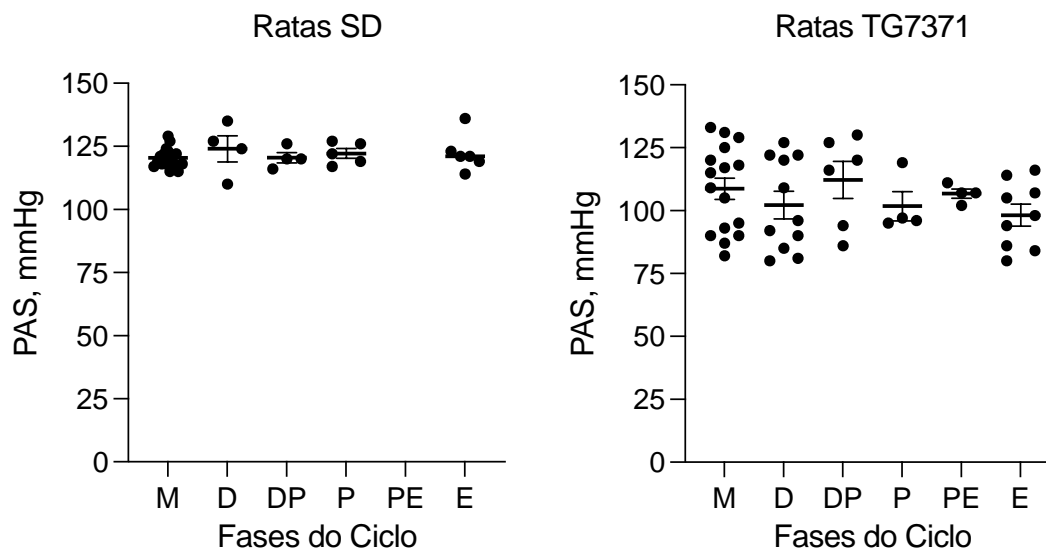


Figura 12. Valores basais de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) nas diferentes fases do ciclo de ratas SD (controle) e TG. Fêmeas SD (n= 9) e TG (n=15). M= metaestro, D= diestro, P= proestro e E= estro. Valores expressos como média EPM. One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey.

4.3 Avaliação de Parâmetros Cardiovasculares

Após a análise de PAS por pletismografia de cauda, os valores basais dos parâmetros cardiovasculares (PAM, mmHg e FC, bpm) foram obtidos, no sistema BIOPAC, de animais fêmeas SD e TG, bem como nos machos SD e TG. A Tabela 1 apresenta os valores basais de PAM e FC de ratos SD e TG após 40-60 minutos de registro. Na Figura 12 é possível observar que os animais TG apresentaram valores basais de PAM menores do que os valores registrados por seus respectivos controles, animais SD. A PAM das fêmeas SD foi estatisticamente menor que a dos machos SD (Figura 13). No entanto, não houve diferença significativa entre machos e fêmeas TG. A FC das fêmeas TG foi maior do que a das fêmeas SD e a dos machos TG (Tabela 1, Figura 14). A FC dos machos TG não foi diferente da FC dos machos SD (Tabela 1, Figura 14).

Tabela 1. Valores basais de Pressão Arterial Média (PAM, mmHg) e Frequência Cardíaca (FC, bpm) dos animais SD e TG.

Animais	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Machos SD (n=13)	121,4±0,83	344,9±5,96
Machos TG (n=18)	104,8±2,01*	333,9±6,38
Fêmeas SD (n=17)	116,3±2,11#	329,7±6,46
Fêmeas TG (n=17)	103,2±2,34*	354,2±7,25*#

Valores expressos como média ± EPM. *p< 0,05 em comparação ao SD e # p< 0,05 em comparação ao macho da mesma linhagem (teste t de Student);

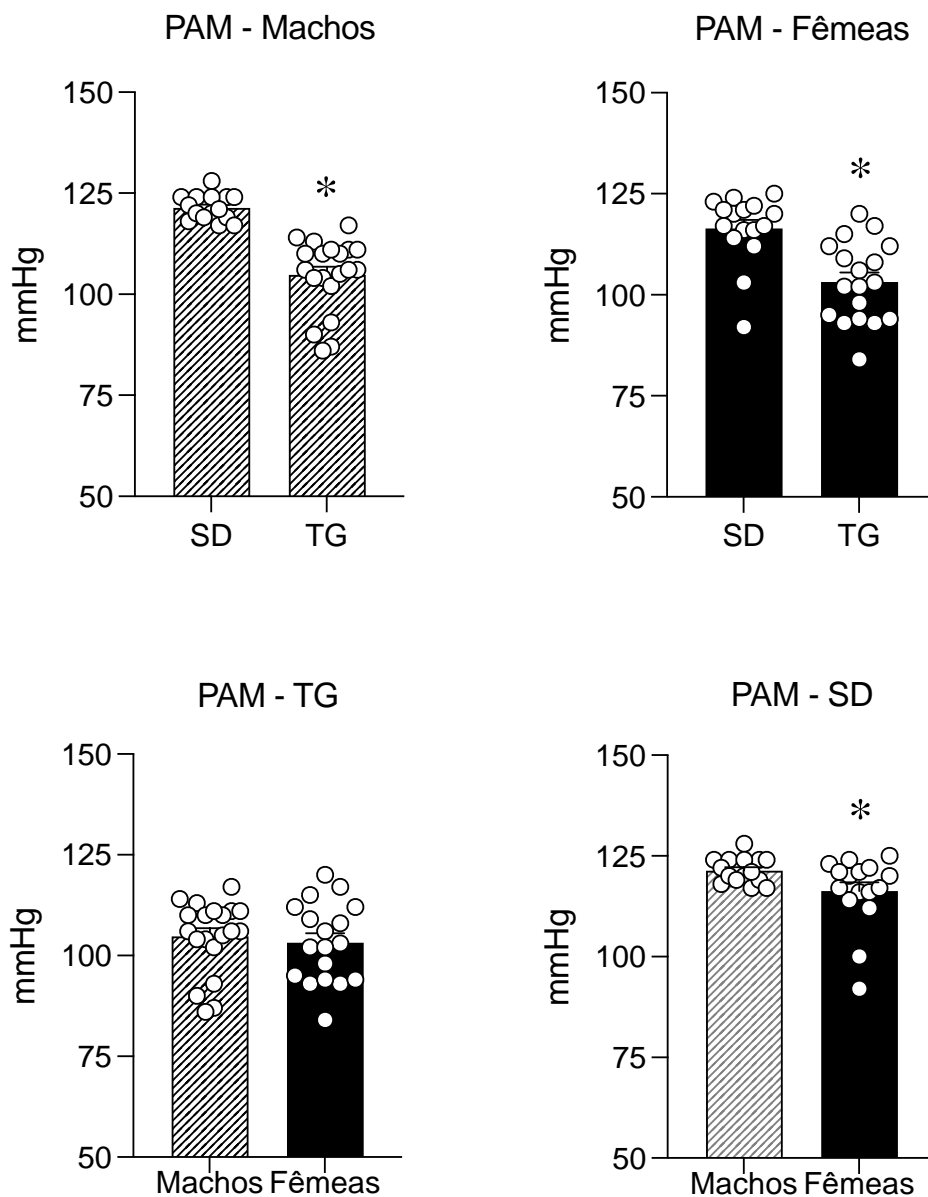


Figura 13. Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) de ratos SD e TG obtidos com registro de curta duração. Animais SD (n=20-23) e TG (n=15-20), machos e fêmeas. Valores expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos SD ou aos machos da mesma linhagem (teste t de Student).

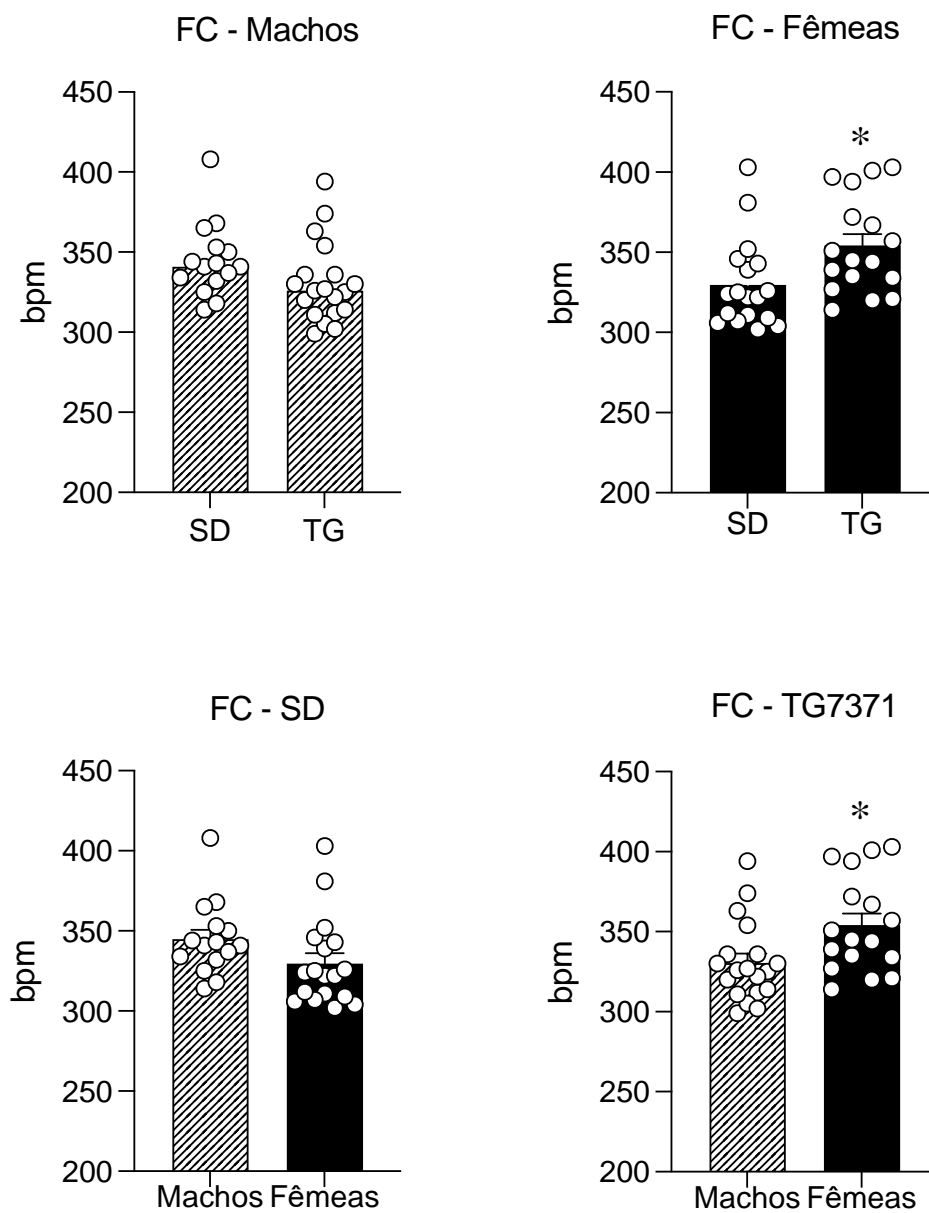


Figura 14. Valores basais de Frequência cardíaca (FC, bpm) de ratos SD e TG obtidos com registro de curta duração. Animais SD (n=20-23) e TG (n=15-20), machos e fêmeas. Valores expressos como média \pm E.P.M. Valores expressos com * $p < 0,05$ em comparação aos ratos SD ou aos machos da mesma linhagem (teste t de Student).

4.4 Avaliação da Bradicardia Baroreflexa

Após coletar os valores basais dos parâmetros cardiovasculares, foi analisado o índice da sensibilidade do controle barorreflexo da FC (SBR) para a bradicardia baroreflexa em ratos SD e TGR, machos e fêmeas. Como pode ser observado na Figura 14 não houve diferença na SBR entre as fêmeas TG ($1,1 \pm 0,05$ ms/mmHg; n=10) e fêmeas SD ($0,93 \pm 0,07$ ms/mmHg; n=8). Da mesma forma, não houve diferença na SBR entre os machos TG ($0,8 \pm 0,05$ ms/mmHg; n=8) e os ratos SD ($0,8 \pm 0,04$ ms/mmHg; n=8; Figura 14). No entanto, as fêmeas da linhagem TG apresentaram valores de SBR maiores do que a dos machos da mesma linhagem (Figura 14). O valor de SBR das fêmeas SD não foi estatisticamente diferente do valor dos machos (Figura 14).

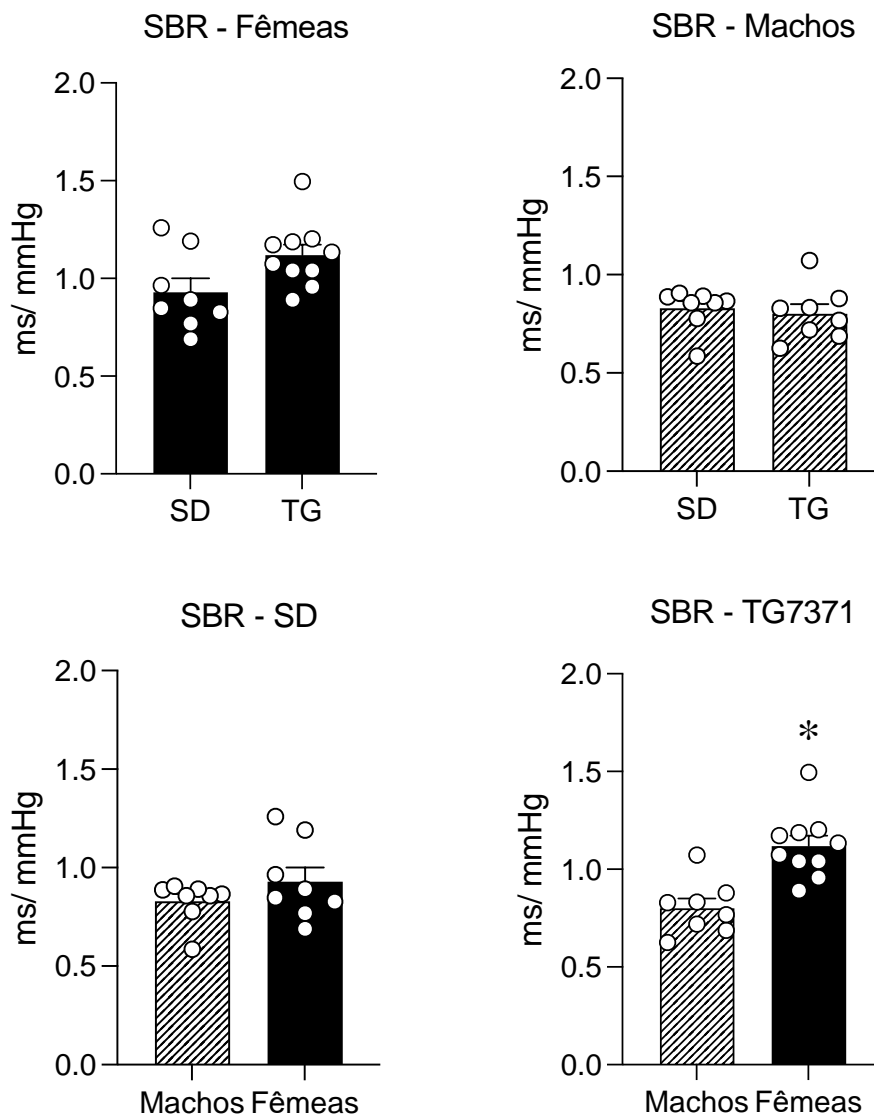


Figura 15. Sensibilidade da bradicardia barorreflexa calculada a partir da razão entre as variações de frequência cardíaca em intervalo de pulso (ms) e as variações de pressão arterial média (PAM, mmHg) induzidas por injeção endovenosa de fenilefrina. Animais SD (n=8-9 cada) e TG (n=9-10), machos e fêmeas. Valores expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em comparação aos machos da mesma linhagem (teste t de Student).

4.5 Avaliação da Atividade Autonômica Cardíaca

Considerando que as fêmeas apresentaram maior FC basal que fêmeas SD, avaliamos a seguir o controle autonômico cardíaco. O resultado da avaliação do tônus vagal e simpático cardíaco dos animais SD e TG, machos e fêmeas, está apresentado na Figura 15 e 16. Primeiramente, não foi observado diferenças significantes nos níveis basais de PAM e FC entre os dois dias consecutivos de registro dos animais de cada grupo (Figuras 15 e 16). Como pode ser observado na Figura 15, os machos TG não apresentaram diferença na FC intrínseca ou no tonus simpático em relação aos ratos SD. No entanto, os machos TG apresentaram tonus parassimpático menor (30.33 ± 2.89 bpm, $n=6$, Figura 15) que os machos SD ($51,43 \pm 3.25$ bpm, $n=7$; Figura 15). Esses resultados devem ter contribuído para a maior razão entre tônus simpático e tônus parassimpático dos machos TG (Figura 15).

As fêmeas TG, no entanto, não apresentaram diferenças estatísticas com relação a FC intrínseca, tônus simpático ou parassimpático em comparação com as fêmeas SD (Figura 16). Entretanto, as fêmeas TG apresentaram maior tonus simpático ($111,5 \pm 12.6$ bpm, $n=8$; Figura 16) que os machos TG ($72,4 \pm 9,4$ bpm, $n=7$; Figura 16) e machos SD ($72,4 \pm 4,1$ bpm; $n=7$; Figura 17). A razão tonus simpático/ tonus parassimpático das fêmeas TG, no entanto, não foi estatisticamente diferente das fêmeas SD ou dos machos SD ou TG (Figuras 16 e 17).

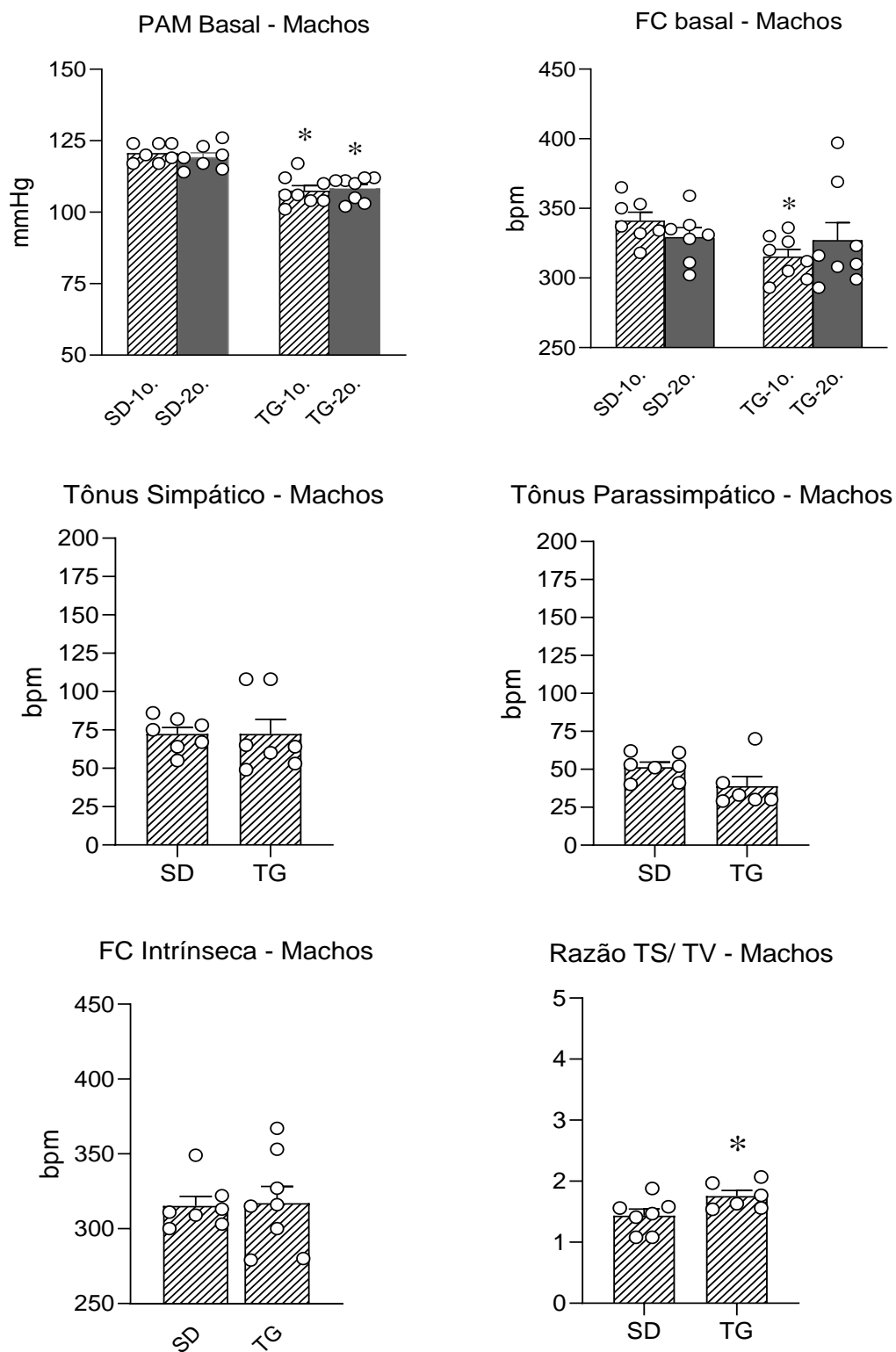


Figura 16. Valores basais de PAM (mmHg) e FC (bpm) nos dois dias consecutivos (1º. e 2º.) de registro para avaliação do tônus simpático (bpm), tônus parassimpático (bpm), frequência cardíaca intrínseca (bpm) e razão entre tônus simpático (TS) e parassimpático (TPS). Machos SD (n= 7-8) e TG (n=6-8). * $p < 0,05$ em comparação do SD (teste t de Student).

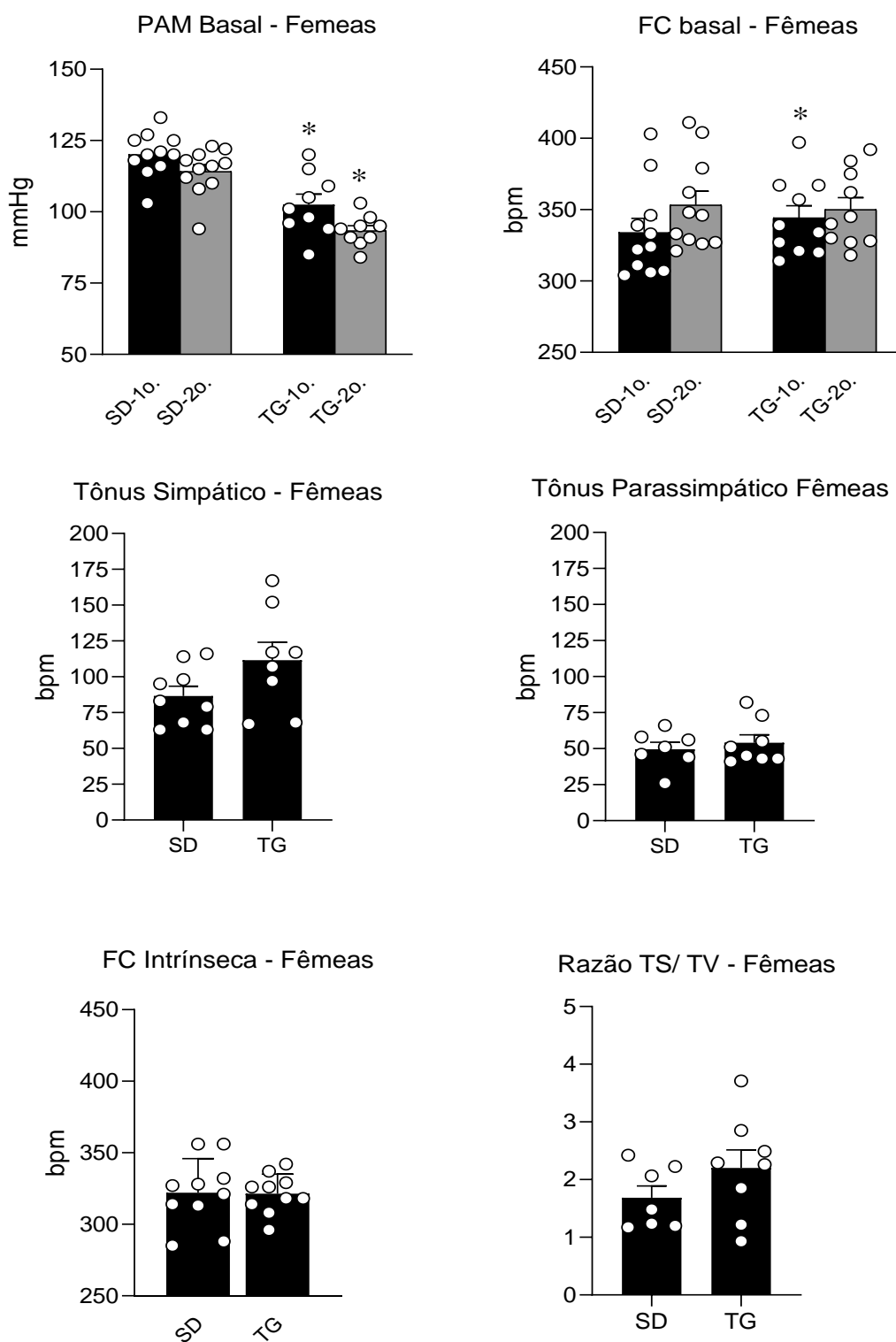


Figura 17. Valores basais de PAM (mmHg) e FC (bpm) nos dois dias consecutivos de registro (1º e 2º) para avaliação do tônus simpático (bpm), tônus vagal (bpm), frequência cardíaca intrínseca (bpm) e razão entre tônus simpático (TS) e parassimpático (TPS). Fêmeas SD (n=7-8) e TG (n=10). *p < 0,05 em comparação do SD (teste t de Student).

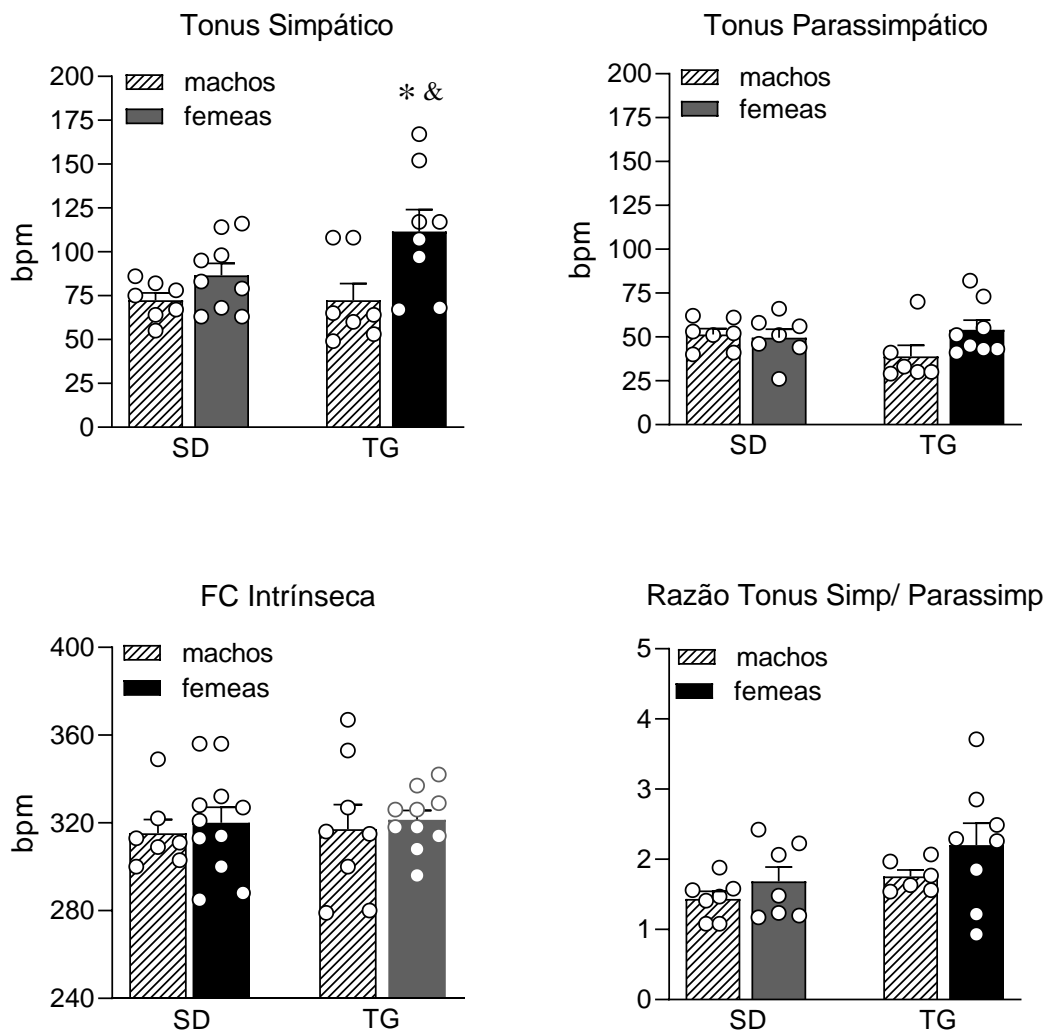


Figura 18. Valores de tônus simpático, parassimpático, frequência cardíaca (FC) intrínseca e a razão entre tônus simpático e parassimpático. Animais SD (7-10) e TG (6-10), machos e fêmeas. * $p < 0,05$ em comparação a fêmeas ou machos da mesma linhagem; & em relação ao gênero oposto da linhagem SD (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

4.6 Determinação do Nível de Angiotensinas no Plasma

A Tabela 2 e a Figura 18 mostram os resultados obtidos por espectrometria de massa com relação a concentração plasmática de angiotensinas em ratos SD e TG, machos e fêmeas. Não houve diferença nos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) entre as linhagens TG e SD, tanto machos como fêmeas. No entanto, observamos diferenças dentro das linhagens

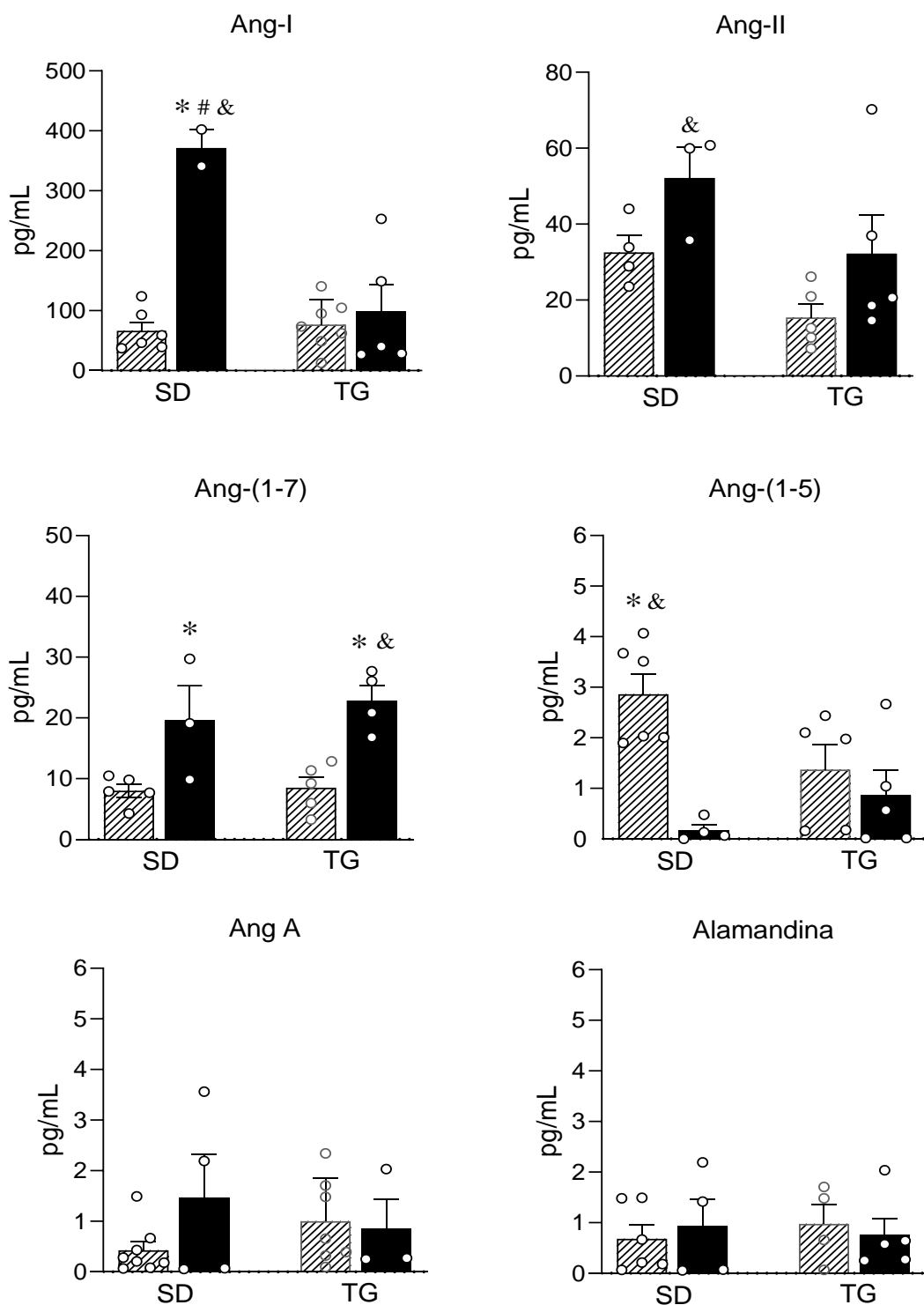
(Tabela 2 e Figura 18). As fêmeas SD apresentaram maior concentração plasmática de Ang I, Ang II e Ang-(1-7) que machos SD. As fêmeas TG apresentaram maior concentração plasmática de Ang-(1-7) em relação aos machos TG, sem apresentar alteração significativa de Ang I ou Ang II (Tabela 3 e Figura 17). Finalmente os machos SD apresentaram níveis maiores de Ang-(1-5) em relação as fêmeas SD e TG (Tabela 2 e Figura 18). Não houve diferença nos níveis plasmáticos de Ang A ou Alamandina em ratos SD e TG, machos e fêmeas.

Tabela 2. Concentração plasmática de angiotensinas (pg/ml) de animais SD e TG.

Ani-Mais	Ang I (pg/ml)	Ang II (pg/ml)	Ang-(1-7) (pg/ml)	Ang 1-5 (pg/ml)	Ang A (pg/ml)	Alamandina (pg/ml)
Machos SD	66,4±14,2 (n= 6)	32,6±4,3 (n= 4)	8,0±1,0 (n= 5)	2,8±0,4 (n= 6)	0,4±0,1 (n= 8)	0,6±0,2 (n= 8)
Fêmeas SD	371,5±30,6*#& (n= 2)	52,1±8,2& (n= 3)	19,5±5,7* (n= 3)	0,1±0,1* (n= 4)	1,4±0,8 (n= 4)	0,9±0,5 (n= 8)
Machos TG	76,8±15,6 (n= 7)	15,4±3,5 (n= 5)	8,5±1,7 (n= 5)	1,3±0,4 (n= 5)	1,0±0,3 (n= 7)	0,9±0,3 (n= 8)
Fêmeas TG	99,4±44,6 (n= 5)	32,2±10,2 (n= 5)	22,8±2,4* (n= 4)	0,8±0,4& (n= 5)	0,8±0,5 (n= 3)	0,7±0,3 (n= 8)

Valores expressos como média ± EPM. *p< 0,05 em relação aos machos da mesma linhagem; #p< 0,05 em relação a femeas de linhagem diferente; &p< 0,05 em relação aos machos de linhagem diferente (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey).

 Machos
 Femeas



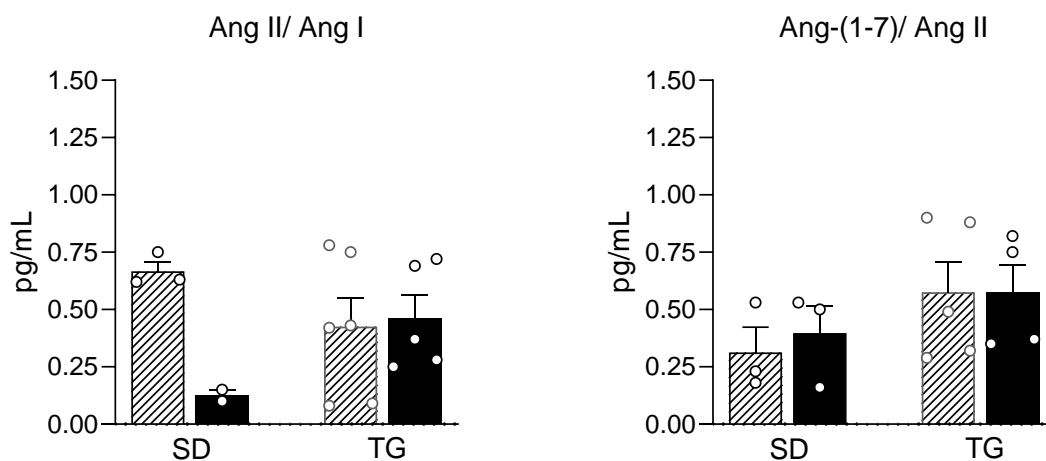


Figura 19. Concentração plasmática de angiotensinas (pg/ml). Machos SD (n= 4-6), machos TG (n= 5-7), fêmeas SD (n= 2-4) e fêmeas TG (n=4-5). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação aos machos da mesma linhagem; # $p < 0,05$ em relação a fêmeas de linhagem diferente; & $p < 0,05$ em relação aos machos de linhagem diferente (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey).

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo procuramos ampliar o conhecimento sobre o papel da Ang-(1-7) a partir da utilização de animais transgênicos, desenvolvidos com a metodologia descrita por Kats *et al.* (2001) e Methot *et al.* (2001) e utilizada anteriormente por pesquisadores do nosso laboratório para produzir o rato transgênico TGA7-L3292 (SANTOS *et al.*, 2004). O animal TG do presente estudo, expressa um gene que codifica uma proteína de fusão contendo a sequência de Ang-(1-7), e está associado a um promotor específico, o GFAP humano. De acordo com estudos anteriores, este promotor direciona a expressão do gene, deixando-o praticamente restrito às células gliais, o que resultaria na produção e liberação do peptídeo principalmente no SNC (BRENNER, 1994).

No estudo com machos desta linhagem, no entanto, foi observado a expressão do mRNA para o transgene e a proteína de fusão em quase todos os tecidos avaliados. Alta expressão do transgene foi observada na aorta e áreas do cérebro, tais como, bulbo, hipocampo, hipotálamo e córtex. Níveis baixos foram encontrados no pulmão, coração, rim, fígado e adrenal (ALVES *et al.*, 2021). Nos tecidos a expressão do mRNA estava em células gliais e nas células endoteliais, o que explica a detecção do mRNA na maioria dos órgãos analisados. O GFAP foi utilizado como promotor para se produzir camundongos com deleção de genes específicos no cérebro (SINN & SIGMUND, 2000). Além disso, foi usado para produzir o rato TG-AsAogen-L680, que expressa um gene antisense para o AOPEN no cérebro, resultando na redução da produção cerebral de AOPEN em cerca de 90% (SCHINKE *et al.*, 1999). É interessante notar que alguma expressão do transgene em células endoteliais, também foi descrito nestes ratos TG-AsAogen-L680 (SCHINKE *et al.*, 1999). Além disso, estudo recente mostrou que células progenitoras GFAP-positivas podem atuar como células-tronco para o desenvolvimento de músculo liso vascular e células endoteliais em camundongos (OSMAN *et al.*, 2020), o que pode explicar a presença do

transgene fora do cérebro. De fato, durante o desenvolvimento embrionário, GFAP é expresso em células tronco multipotentes que dão origem a neurônios e células da glia no cérebro e medula espinhal (BAJENARU *et al.*, 2002; ZHUO *et al.*, 2001). Desta forma, apenas com a dosagem dos peptídeos no cérebro, vasos e tecidos de machos e fêmeas, uma lacuna do presente estudo, poderemos concluir em quais tecidos a Ang-(1-7) está aumentada neste animal TG. É importante mencionar que no estudo anterior (ALVES *et al.*, 2021) foi mostrado que os machos desta linhagem de transgênicos não apresentam alteração dos níveis plasmáticos Ang-(1-7), no entanto, apresentam aumento significativo dos níveis desse peptídeo no cérebro sem alteração dos níveis de Ang II. Assim esses animais transgênicos representam uma ferramenta valiosa para investigar os efeitos a longo-prazo dos níveis aumentados de Ang-(1-7) tecidual sobre o sistema cardiovascular. No presente estudo realizamos a fenotipagem cardiovascular de fêmeas desta linhagem TG, comparando com machos da mesma linhagem.

Primeiramente, mostramos que as fêmeas TG, da mesma forma que os machos, apresentam PA mais baixa que animais controle SD. Este resultado foi obtido tanto por pletismografia de cauda, que é uma técnica não invasiva de medida de PAS, quanto por registro direto pela canulação da artéria femoral. O resultado obtido nos machos confirma aqueles observados em estudo anterior realizado por Alves *et al.* (2021), que mostrou através da técnica de telemetria (registro de longa duração) que machos desta linhagem TG apresentam valores de PAM menores que machos SD, tanto durante o período do dia como o da noite. Os resultados do presente estudo complementam e salientam que o aumento de longa duração dos níveis teciduais de Ang-(1-7) promove redução da PA de forma significativa. Deve ser ressaltado que este resultado é bastante significativo considerando o background normotenso do animal do qual os transgênicos foram desenvolvidos, ratos SD.

O outro rato transgênico descrito na literatura que apresenta superexpressão de Ang-(1-7) é o TGA7-L3292 (SANTOS et al, 2004). Este animal também foi produzido pela mesma metodologia, no entanto, em seu constructo não foi adicionado um promotor específico. No TGA7-L3292 o transgene se expressou nos testículos, de maneira que a proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) é formada neste tecido e o peptídeo é liberado na circulação. De fato, os níveis plasmáticos de Ang-(1-7) são 2,5 vezes maiores nesses animais do que em controles SD (SANTOS *et al.*, 2004). Nenhuma expressão de mRNA ou aumento nos níveis de Ang-(1-7) foi detectado em outros tecidos de ratos TGA7-L3292, como rim, glândula adrenal, pulmão, átrio, ventrículo, fígado, cérebro e aorta. A diferença importante deste animal e o TG do presente estudo é que o TGA7-L3292 apresenta um fenótipo normotenso semelhante ao rato SD, sugerindo que o aumento tecidual de Ang-(1-7) que fornece fenótipo hipotenso.

Observamos também que as fêmeas SD e TG apresentaram PA menor que os machos da mesma linhagem. Estudos em animais e humanos mostraram diferenças nos mecanismos responsáveis pelo controle da PA entre os sexos (ABDEL-RAHMAN; MERRILL; WOOLLES, 1994). Estudos mostraram que estrogênios, hormônios sexuais predominantemente encontrados nas mulheres, podem ter efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular em mulheres na fase reprodutiva, o que pode ajudar a manter a PA, em níveis normais e menores que a dos homens (KNOWLTON; LEE, 2012; MENDELSON; KARAS, 1999; PATTEN; KARAS, 2006; RECKELHOFF, 2018). Estudos mostraram também que em comparação a homens da mesma idade, as mulheres na pré-menopausa são menos propensas a desenvolver HA. No entanto, após a menopausa, quando os níveis de estrogênio diminuem significativamente, a incidência de hipertensão aumenta em mulheres e até supera a observada em homens (DOUMAS *et al.*, 2013; HAY, 2016).

Estudos mostraram também que em mulheres na pré-menopausa, altos níveis de estrogênio podem atenuar tonicamente a síntese de aldosterona via receptores de estrogênio do tipo β (ER β), contribuindo assim para manter a pressão sanguínea normal (ROSSI; CAROCCIA; SECCIA, 2019). No entanto, o aumento da PA após a menopausa pode estar relacionado em parte à perda da inibição da síntese de aldosterona resultante da queda nos níveis estrogênio (ROSSI; CAROCCIA; SECCIA, 2019). Estudos mostraram que os homens têm níveis de PA e aldosterona mais altos do que as mulheres, e que existe uma correlação positiva entre os metabólitos da testosterona, os níveis de aldosterona e a PA, além disso, após o início da puberdade, quando os níveis de andrógenos começam a aumentar, os meninos tem PA mais alta que as meninas na mesma idade (BACHMANN *et al.*, 1987; ELCARTE LÓPEZ *et al.*, 1993; MILLER; ANACTA; CATTRAN, 1999). É interessante observar, por outro lado, que a reposição hormonal nas mulheres não atenua o aumento da PA pós-menopausa, e que nessa fase os androgênios não diminuem ou pouco se alteram (RECKELHOFF, 2001). Assim os estudos mostraram que não apenas a ausência de hormônios femininos, mas a presença de hormônios masculinos contribui para as diferenças de gênero observadas na PA. Estudos mais recentes com o objetivo de identificar os mecanismos envolvidos nas diferenças de gênero e HA apontam um papel importante para os rins, o SRA, a relaxina, e fatores relacionados a programação fetal e neonatal (AHMED *et al.*, 2019; RECKELHOFF, 2018). No entanto, estudos adicionais são ainda serão necessários para estabelecer as melhores estratégias para se reduzir o risco de HA e as subsequentes doenças cardiovasculares em ambos os sexos.

Uma observação importante para o presente estudo foi mostrar que a PAS não sofreu alteração de forma significativa nas fêmeas, das duas linhagens, nas diferentes fases do ciclo estral. Durante o ciclo estral ocorrem flutuações hormonais que podem influenciar diversos sistemas fisiológicos, incluindo a PA. Poucos estudos na literatura abordam a

relação entre as fases do ciclo estral e a PA. Estudo realizado por Takezawa *et al.*, (1994), através de medida de PA por telemetria por mais de 2 meses, observou uma pequena diferença da PA apenas durante o período noturno. Os autores descrevem que a PAM foi maior na noite do proestro (103.8 ± 1.3 mmHg) e na noite do estro (103.7 ± 1.5 mmHg em relação a noite do diestro 2 (101.8 ± 1.2 mmHg). No entanto, a PA na noite na noite do proestro ou estro não foi diferente da PA do diestro 1 (103 ± 1.4 mmHg). Observando com cuidado os dados da tabela apresentada no trabalho de Takezawa *et al.*, 1994, pode se concluir que a PA na noite do diestro é menor que das outras fases. Essas alterações da PA com o ciclo estral desapareceram após ovariectomia bilateral. De qualquer forma, esses autores não observaram variações da PA durante o período do dia (TAKEZAWA *et al.*, 1994). Estudo mais recente de Ayala-Méndes *et al.* (2023) avaliou simultaneamente a PA, através de pletismografia de cauda, e o ciclo estral em fêmeas Wistar-Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensas (SHR). Embora a PA das SHR de 16 semanas de idade ser superior as das WKY de mesma idade, os autores não observaram diferenças da PAM, da sistólica ou da diastólica ou da FC entre as diferentes fases do ciclo estral. Nossos dados estão de acordo com esses estudos, e sugerem que a comparação dos diferentes parâmetros analisados entre os animais, não sofre interferência das variações hormonais decorrentes das diferentes fases do ciclo estral.

Em relação à FC, os resultados obtidos no registro de curta duração mostraram que as fêmeas TG apresentaram FC superior tanto em relação as fêmeas SD, quanto aos machos TG. No estudo anterior conduzido por Alves *et al.* (2021), utilizando a técnica de telemetria, os machos TG apresentaram FC idêntica aos machos SD, porém no presente estudo, utilizando registro de curto prazo os machos TG apresentaram aumento da FC quando comparado aos machos SD. É importante considerar que vários fatores podem influenciar essa diferença de FC, incluindo o uso de registro de curta duração da pressão arterial, nos

quais os animais podem ser submetidos a manipulação durante o processo, potencialmente gerando algum nível de estresse. Dessa forma, estudos futuros deverão explorar esta possibilidade através de registro de longo prazo e que imponha menor estresse ao animal, como o registro de PA/FC por telemetria (BROCKWAY; MILLS; AZAR, 1991). Além disso, é importante destacar que a regulação da FC é um processo multifatorial, influenciado por vários sistemas e mecanismos, incluindo o sistema nervoso autônomo (SNA) e hormonal.

O papel SNA, composto pelo SNS e SNPS, já é bem descrito na literatura e é o principal mecanismo neural pelo qual a FC é controlada. O SNS intensifica o automatismo cardíaco, aumentando a FC, enquanto o SNPS inibe, desempenhando um papel de desaceleração da FC. O sistema cardiovascular é regulado por meio de ações coordenadas de vias neurais aferentes sinalizando distensão dos grandes vasos e câmaras cardíacas, e vias eferentes que transmitem fluxos simpáticos e parassimpáticos para órgãos terminais cardiovasculares, como coração, rins e vasculatura. A regulação neural da FC é coordenada por áreas localizadas no tronco cerebral, especialmente no bulbo, incluindo o núcleo motor dorsal do nervo vago, núcleo ambíguo e área rostroventrolateral do bulbo. Informações sensoriais provenientes dos barorreceptores (localizados nos seios carotídeos e arco aórtico), quimiorreceptores e receptores de estiramento cardíaco, são integradas no núcleo do trato solitário (NTS), que por sua vez envia projeções para as áreas bulbares relacionadas com a modulação da atividade dos SNS e SNPS, ajustando a FC de acordo com as necessidades do organismo (MILLER, A. J.; ARNOLD, 2019).

No presente estudo foi analisado o índice da sensibilidade do controle barorreflexo da FC. Observamos que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais TG em comparação aos SD para bradicardia barorreflexa. Esses resultados também estão de acordo com os obtidos em estudo anterior realizados apenas em machos

das linhagens TG e SD (ALVES *et al.*, 2021). Entretanto, esses resultados são contrários aos apresentados por outros autores que descreveram a melhora da SBR após tratamento crônico com Ang-(1-7) central em ratos com insuficiência cardíaca (ZEBRAL *et al.*, 2020) e também aumento da sensibilidade bradicardia barorreflexa pela microinjeção de Ang-(1-7) no NTS em ratos normotensos (CHAVES *et al.*, 2000), ou infusão ICV em ratos normotensos (CAMPAGNOLE-SANTOS e *et al.*, 1992) ou hipertensos (GUIMARÃES *et al.*, 2012; KANGUSSU *et al.*, 2015). Além disso, estudos realizados em camundongos nocaute do receptor MAS mostraram redução da SBR, implicando um papel protetor endógeno da Ang-(1-7) sobre o tônus autonômico cardíaco (DE MOURA *et al.*, 2010). Conseqüentemente, seria esperado que os animais TG que apresentam aumento no nível de Ang-(1-7), apresentassem aumento da sensibilidade da regulação reflexa da FC. Entretanto, é preciso destacar que o fenótipo hipotenso destes animais poderia contrabalancear o efeito direto da Ang-(1-7).

É interessante observar que as fêmeas da linhagem TG, por outro lado, apresentaram aumento da sensibilidade do controle barorreflexo da FC em comparação aos machos da mesma linhagem. Embora as fêmeas SD tenham apresentado tendência de maior SBR em comparação aos machos SD, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Esses achados sugerem que as fêmeas TG têm uma capacidade mais pronunciada de ajustar a FC em resposta às variações da pressão arterial. Estudos sugerem que essas diferenças na SBR entre os sexos podem ser influenciadas por vários fatores, incluindo diferenças hormonais, e que o barorreflexo pode apresentar alterações cíclicas em fêmeas devido às flutuações hormonais que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (BROOKS *et al.*, 2012). Essas mudanças hormonais podem afetar a função cardiovascular, incluindo a SBR. Estudos anteriores mostraram que os estrogênios podem ter um efeito positivo na SBR, o que significa que podem facilitar o controle do SBR às mudanças na pressão arterial (SAEKI *et*

al., 1997; TANAKA *et al.*, 2003). Nas mulheres a SBR sofre variação durante as fases do ciclo reprodutivo, tendo aumento durante a fase lútea do ciclo menstrual, quando os hormônios gonadais (estrogênio e progesterona) estão elevados (BROOKS *et al.*, 2012; GOLDMAN *et al.*, 2009; MINSON *et al.*, 2000). No entanto, em estudo realizado com ratas submetidas à ovariectomia a variação da SBR foi abolida, isso porque, o perfil cíclico das mudanças no SBR reflete as mudanças no estrogênio, o qual atua no tronco cerebral para aumentar o SBR (BROOKS *et al.*, 2012; GOLDMAN *et al.*, 2009). Deve-se salientar que apenas as fêmeas TG apresentaram maior SBR que os machos TG, sugerindo uma interação entre a Ang-(1-7) e fatores hormonais nessas fêmeas. Contudo, é importante realizar estudos complementares para obter uma compreensão mais abrangente desse fenômeno e identificar os mecanismos subjacentes a essas diferenças na SBR existentes entre sexo/ gênero, tema ainda escasso na literatura. O funcionamento dos barorreceptores arteriais pode ser considerado um alvo terapêutico potencial para melhorar o prognóstico de pacientes com doenças cardiovasculares, especialmente com uma abordagem personalizada para os diferentes sexos/gêneros.

Considerando o aumento da FC basal das fêmeas TG, avaliamos a seguir possíveis alterações do tônus autonômico cardíaco. Observamos que as fêmeas TG, bem como os machos TG, não apresentaram diferenças estatísticas na FC intrínseca e no tônus autonômico quando comparados aos respectivos grupos SD. As fêmeas TG, no entanto, apresentaram tônus simpático superior aos machos TG e SD. Este resultado está de acordo com o maior nível basal de FC desses animais. Alves *et al.* (2021) apesar de não observarem diferenças significativas da FC entre os machos TG e SD, demonstraram que, os machos TG apresentam aumento do tônus simpático cardíaco e periférico, o que está de acordo com o achado do presente estudo em fêmeas TG.

Este resultado contrasta com o fenótipo hipotenso deste animal transgênico e com estudos anteriores que mostraram que infusão ou administração central (ICV) de Ang-(1-7) reduz o balanço simpato/vagal cardíaco (KANGUSSU *et al.*, 2015). Assim, estudos futuros serão necessários para mostrar se o aumento da atividade simpática está relacionado a um efeito estimulatório direto nas áreas pré-motoras do SNS no SNC ou um efeito indireto mediado pela menor PA do rato TG. Deverá ser explorado também, qual o mecanismo hemodinâmico que determinou o fenótipo hipotenso das fêmeas TG. Alves *et al.* (2021) mostrou que os machos TG apresentaram queda da resistência periférica total (RPT) associado a aumento do índice cardíaco (IC). O maior IC não compensou a menor RPT o que resultou em PA mais baixa nesses animais. Considerando a FC mais alta das fêmeas TG, é muito provável que a menor PA destas também esteja relacionada à queda da RPT, que por sua vez pode ser devido a um efeito direto da Ang-(1-7). Essa hipótese depende da demonstração de que as fêmeas TG, expressam a proteína de fusão no endotélio e que a liberação de Ang-(1-7) está aumentada no vaso. O mecanismo do efeito vasodilatador da Ang-(1-7) já foi largamente explorado na literatura, especialmente relacionado à liberação de óxido nítrico (SANTOS *et al.*, 2018). Outro mecanismo hormonal vasodilatador que pode estar contribuindo para a menor PA das fêmeas TG é o peptídeo natriurético atrial (ANP). Alves *et al.* (2021), mostrou que os machos desta linhagem apresentam níveis plasmáticos elevados de (ANP). Já está bem estabelecido na literatura a ação vasodilatadora do ANP (BRENNER *et al.*, 1990). Animais transgênicos com aumento ANP circulante apresentam fenótipo hipotenso e menor risco de desenvolver hipertensão arterial (CANNONE *et al.*, 2013; ICHIKI, TOMOKO; BURNETT, 2017; NEWTON-CHEH *et al.*, 2009). Embora essas possibilidades ainda sejam especulativas considerando os dados do presente estudo, o aumento dos níveis de ANP no TG pode estar relacionado à ação direta da Ang-(1-7) no átrio direito ou à estimulação da liberação de ocitocina pelos núcleos paraventricular e

supraoptico hipotalâmicos (FELIX *et al.*, 1991; SANTOS *et al.*, 2018; SCHIAVONE *et al.*, 1988). Estudos mostraram que a oxitocina, por sua vez, induz a liberação de ANP (GUTKOWSKA *et al.*, 1997; HAANWINCKEL *et al.*, 1995). Certamente estudos futuros deverão ser realizados confirmar essas hipóteses.

No presente estudo determinamos a concentração de angiotensinas no plasma dos animais TG e SD, machos e fêmeas, por espectrometria de massa. Não observamos diferenças estatísticas significativas dos níveis de Ang-(1-7) circulantes entre os ratos TG e SD. Embora esta conclusão esteja baseada em um pequeno número de animais, está de acordo com estudos anteriores de Alves *et al.* (2021) e sugere que a inserção do transgene que leva a síntese de uma proteína produtora de Ang-(1-7) não altera os níveis plasmáticos deste peptídeo. Considerando que a expressão do transgene foi dirigida pelo promotor GFAP, espera-se que as fêmeas apresentem, da mesma forma que os machos (ALVES *et al.*, 2021), aumento cerebral de Ang-(1-7). Etapas futuras deste trabalho deverão confirmar esta possibilidade.

É interessante observar que as fêmeas SD apresentaram níveis plasmáticos de Ang I, Ang II e Ang-(1-7) maiores do que os observados em machos, sugerindo uma ativação do SRA circulante. Considerando que a razão entre AngII/AngI e Ang-(1-7)/AngII das fêmeas SD não foi diferente dos machos SD, é possível que as fêmeas apresentem aumento da atividade da renina plasmática ou dos níveis de AOPEN. Poucos estudos determinaram os níveis de angiotensinas em fêmeas. Estudos mostraram que fêmeas apresentam aumento de AOPEN relacionada a produção de estrógeno, associado a redução da atividade da renina plasmática, redução da atividade da ECA, redução da expressão renal de receptor AT1 e redução de aldosterona (FISCHER; BAESSLER; SCHUNKERT, 2002; GALLAGHER *et al.*, 1999; KOMUKAI; MOCHIZUKI; YOSHIMURA, 2010; SCHUNKERT *et al.*, 1997). Por outro lado, machos apresentam aumento da atividade da renina plasmática, aumento da

expressão de receptor AT1, aumento da atividade de ECA2 (CHEN, Y. F.; NAFTILAN; OPARIL, 1992; ELLISON *et al.*, 1989; PENDERGRASS *et al.*, 2008).

Estudos realizados em humanos mostraram que os níveis de prorenina e renina em homens são significativamente maiores do que em mulheres. Além disso, mulheres sem terapia de reposição de estrogênio também apresentam níveis significativamente maiores de prorenina e renina do que mulheres com terapia de reposição de estrogênio (DANSER *et al.*, 1998). O estrogênio diminui significativamente a atividade de ECA e atenua as ações de Ang II (BROSNIHAN *et al.*, 1997; GALLAGHER *et al.*, 1999). Além disso, estudos mostraram que o tratamento crônico com estrogênio reduz a expressão de receptores AT1 em diversos de tecidos, incluindo adrenal, rim, aorta, hipófise e cérebro (SANDBERG; JI, 2003). Concomitante, estudos mostraram que a expressão do mRNA para AT1 é maior na aorta e nos vasos mesentéricos de machos do que de fêmeas, também foi observado que fêmeas SHR que passaram por ovariectomia apresentaram expressão de mRNA para AT1 similar à dos machos, e o tratamento com estrogênio reverteu a superexpressão observada (SILVA-ANTONIALLI *et al.*, 2004).

As fêmeas TG, entretanto, apresentaram apenas níveis aumentados de Ang-(1-7) em relação aos machos TG e SD. Estudos realizados anteriormente por Sullivan *et al.* (2015) demonstraram que mulheres exibiram maior concentração circulante de Ang-(1-7) em comparação com os homens, enquanto os valores de Ang II foram semelhantes entre os grupos. Da mesma forma, Chappell *et al.* (2013) mostraram que ratas da linhagem Lewis apresentam maior nível de Ang-(1-7) no plasma que os machos. Os resultados do nosso estudo estão de acordo com o obtido por esses autores. Estudos futuros deverão elucidar o mecanismo envolvido no aumento isolado de Ang-(1-7) nas fêmeas TG. As diferenças nos níveis de angiotensinas, principalmente da Ang-(1-7), no plasma entre machos e fêmeas pode ter implicações importantes na fisiologia cardiovascular e na fisiopatologia das doenças

cardiovasculares. No entanto, é necessário aumentar o n amostral e determinar a atividade das principais enzimas do SRA, renina, ECA e ECA2 e a expressão dos receptores MAS e AT1 para que se possa compreender completamente os mecanismos subjacentes a essas diferenças e seu impacto na saúde cardiovascular.

Em síntese, os resultados obtidos no presente estudo mostram que ratos TG7371, machos e fêmeas, que apresentam uma proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) sob a regulação do promotor GFAP, tem PA mais baixa em comparação com os ratos normotensos, machos e fêmeas, da linhagem SD. No entanto, não foram observadas alterações no controle barorreflexo ou autonômico cardíaco que pudessem explicar essa alteração na PA basal. Assim, estudos futuros deverão abordar os mecanismos exatos pelos quais a Ang-(1-7) influencia a pressão arterial nesta linhagem de rato transgênico. Da mesma forma, será necessário medir os níveis de angiotensinas em diferentes tecidos, como cérebro e vasos, bem como identificar as áreas do tecido ou células onde a expressão da proteína de fusão apresenta-se aumentada. No presente estudo apresentamos a caracterização fenotípica cardiovascular de ratas TG7371, único modelo de animais transgênicos com superexpressão de Ang-(1-7) e que apresentam PA mais baixa. Considerando o “background” genético de animal normotenso, este é um resultado bastante relevante e torna este animal um modelo interessante para se estudar o efeito do aumento tecidual de longo prazo da Ang-(1-7) na fisiopatologia e tratamento de doenças cardiovasculares. É importante salientar que estudos realizados em ambos os sexos, fêmeas e machos, poderão identificar possíveis disparidades de resposta e permitir o desenvolvimento de estratégias farmacológicas adaptadas a cada sexo. Certamente esses estudos contribuirão para um tratamento mais eficaz e personalizado da HA e das DCV em homens e mulheres.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, A. R.; MERRILL, R. H.; WOOLLES, W. R. Gender-related differences in the baroreceptor reflex control of heart rate in normotensive humans. *Journal of Applied Physiology*, v. 77, n. 2, p. 606–613, ago. 1994.
- AHMED, S.; Hu, R.; LEETE, J.; LAYTON, A. T. Understanding sex differences in long-term blood pressure regulation: insights from experimental studies and computational modeling. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, v. 316, n. 5, p. H1113–H1123, 1 maio 2019.
- AKKAD, A. A.; HALLIGAN, A. W.; ABRAMS, K.; AL-AZZAWI, F. Differing responses in blood pressure over 24 hours in normotensive women receiving oral or transdermal estrogen replacement therapy. *Obstetrics and Gynecology*, v. 89, n. 1, p. 97–103, jan. 1997.
- ALA-FOSSI, S. L.; MÄENPÄÄ, J.; AINE, R.; PUNNONEN, R. Ovarian testosterone secretion during perimenopause. *Maturitas*, v. 29, n. 3, p. 239–245, 17 jun. 1998.
- ALVES, D. T.; MENDES, L. F.; SAMPAIO, W. O.; COIMBRA-CAMPOS, L. M. C.; VIEIRA, M. A. R.; FERREIRA, A. J.; MARTINS, A. S.; POPOVA, E.; TODIRAS. M.; QADRI, F.; ALENINA, N.; BADER M.; SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Hemodynamic phenotyping of transgenic rats with ubiquitous expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein. *Clinical Science (London, England: 1979)*, v. 135, n. 18, p. 2197–2216, 30 set. 2021.
- ALZAMORA, A. C.; SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Hypotensive effect of ANG II and ANG-(1-7) at the caudal ventrolateral medulla involves different mechanisms. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 283, n. 5, p. R1187-1195, nov. 2002.
- AYALA-MÉNDEZ, G. X.; CALDERÓN, V. M.; ZUÑIGA-PIMENTEL, T. A.; RIVERA-CERECEDO, C. V. Noninvasive Monitoring of Blood Pressure and Heart Rate during Estrous Cycle Phases in Normotensive Wistar–Kyoto and Spontaneously Hypertensive Female Rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 62, 2 maio 2023.
- BACHMANN, H.; HORACEK U.; LEOWSKY M.; HIRCHE, H. [Blood pressure in children and adolescents aged 4 to 18. Correlation of blood pressure values with age, sex, body height, body weight and skinfold thickness (Essen Blood Pressure Study)]. *Monatsschrift Kinderheilkunde: Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Kinderheilkunde*, v. 135, n. 3, p. 128–134, mar. 1987.
- BADER, M. Transgenic animal models for the functional analysis of vasoactive peptides. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, v. 31, n. 9, p. 1171–1183, set. 1998.

- BADER, M. Role of the local renin-angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 34, n. 11, p. 1455–1462, nov. 2002.
- BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, v. 86, n. 6, p. 615–621, jun. 2008.
- BAJENARU, M. L.; ZHU, Y.; HEDRICK, N. M.; DONAHOE, J.; PARADA, L. F.; GUTMANN, D. H. Astrocyte-specific inactivation of the neurofibromatosis 1 gene (NF1) is insufficient for astrocytoma formation. *Molecular and Cellular Biology*, v. 22, n. 14, p. 5100–5113, jul. 2002.
- BEST, P. J. BERGER, P. B.; MILLER, V. M.; LERMAN, A. The effect of estrogen replacement therapy on plasma nitric oxide and endothelin-1 levels in postmenopausal women. *Annals of Internal Medicine*, v. 128, n. 4, p. 285–288, 15 fev. 1998.
- BILMAN, V.; MARES-GUIA, L.; NADU, A. P.; BADER, M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SANTOS, R. A. S.; SANTOS, S. H. S. Decreased hepatic gluconeogenesis in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Peptides*, v. 37, n. 2, p. 247–251, 1 out. 2012.
- BRENNER, B. M.; BALLERMANN, B. J.; GUNNING, M. E.; ZEIDEL, M. L. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiological Reviews*, v. 70, n. 3, p. 665–699, jul. 1990.
- BRENNER, M. Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, v. 4, n. 3, p. 245–257, jul. 1994.
- BROCKWAY, B. P.; MILLS, P. A.; AZAR, S. H. A new method for continuous chronic measurement and recording of blood pressure, heart rate and activity in the rat via radio-telemetry. *Clinical and Experimental Hypertension. Part A, Theory and Practice*, v. 13, n. 5, p. 885–895, 1991.
- BROOKS, V. L.; CASSAGLIA, PA.; ZHAO, D.; GOLDMAN, R. K. Baroreflex function in females: changes with the reproductive cycle and pregnancy. *Gender Medicine*, v. 9, n. 2, p. 61–67, abr. 2012.
- BROSNIHAN, K. B.; LI, P.; GANTEN, D.; FERRARIO, C. M. Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *The American Journal of Physiology*, v. 273, n. 6, p. R1908-1915, dez. 1997.
- BROWN, A. J.; CASALS-STENZEL, J.; GOFFORD, S.; LEVER, A. F.; MORTON, J. J. Comparison of fast and slow pressor effects of angiotensin II in the conscious rat. *The American Journal of Physiology*, v. 241, n. 3, p. H381-388, set. 1981.
- CAMBOTTI, L. J.; COLE, F. E.; GERALL, A. A.; FROHLICH, E. D.; MACPHEE, A. A. Neonatal gonadal hormones and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 247, n. 2, p. E258–E264, ago. 1984.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. *Rev. bras. hipertens*, p. 30–40, 2001.

- CANNONE, V.; CEFALU', A. B.; NOTO, D.; SCOTT, C. G.; BAILEY, K. R.; CAVERA, G.; PAGANO, M.; SAPIENZA, M.; AVERNA, M. R.; BURNETT, J. C. JR. The atrial natriuretic peptide genetic variant rs5068 is associated with a favorable cardiometabolic phenotype in a Mediterranean population. *Diabetes Care*, v. 36, n. 9, p. 2850–2856, set. 2013.
- CARRIÈRE, P. D.; LÉAN, A.; GUTKOWSKA, J.; CANTIN, M. Chronic Estradiol Treatment Decreases Angiotensin II Receptor Density in the Anterior Pituitary Gland and Adrenal Cortex but Not in the Mesenteric Artery. *Neuroendocrinology*, v. 43, n. 1, p. 49–56, 1 abr. 2008.
- CHAPPELL, M. C.; MARSHALL, A. C.; ALZAYADNEH, E. M.; SHALTOU, H. A.; DIZ, D. I. Update on the Angiotensin Converting Enzyme 2-Angiotensin (1–7)-Mas Receptor Axis: Fetal Programming, Sex Differences, and Intracellular Pathways. *Frontiers in Endocrinology*, v. 4, 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2013.00201>>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- CHEN, Y. F.; NAFTILAN, A. J.; OPARIL, S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension*, v. 19, n. 5, p. 456–463, maio 1992.
- CHEN, Y.-F.; MENG, Q.-C. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sciences*, v. 48, n. 1, p. 85–96, 1 jan. 1991.
- COLBY, H. D.; SKELTON, F. R.; BROWNIE, A. C. Testosterone-induced hypertension in the rat. *Endocrinology*, v. 86, n. 5, p. 1093–1101, maio 1970.
- CROWLEY, S. D.; GURLEY, S. B.; OLIVERIO, M. I.; PAZMINO, A. K.; GRIFFITHS, R.; FLANNERY, P. J.; SPURNEY, R. F.; KIM, H. S.; SMITHIES, O.; LE, T. H.; COFFMAN, T. M. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 4, p. 1092–1099, abr. 2005.
- DANSER, A. H.; DERKX, F. H.; SCHALEKAMP, M. A.; HENSE, H. W.; RIEGGER, G. A.; SCHUNKERT, H. Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *Journal of Hypertension*, v. 16, n. 6, p. 853–862, jun. 1998.
- DANSER, A. H.; SARIS, J. J.; SCHUIJT, M. P.; VAN KATS, J. P. Is there a local renin-angiotensin system in the heart? *Cardiovascular Research*, v. 44, n. 2, p. 252–265, nov. 1999.
- DARTORA, D. R.; IRIGOYEN, M. C.; CASALI, K. R.; MORAES-SILVA, I. C.; BERTAGNOLLI, M.; BADER, M.; SANTOS, R. A. S. Improved cardiovascular autonomic modulation in transgenic rats expressing an Ang-(1-7)-producing fusion protein. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 95, n. 9, p. 993–998, set. 2017.
- DE ALMEIDA, P. W. M.; MELO, M. B.; LIMA, R. F.; GAVIOLI, M.; SANTIAGO, N. M.; GRECO, L.; JESUS, I. C.; NOCCHI, E.; PARREIRA, A.; ALVES, MN.; MITRAUD, L.; RESENDE, R. R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, MJ.; SANTOS, R. A. S.; GUATIMOSIM, S.

- Beneficial effects of angiotensin-(1-7) against deoxycorticosterone acetate-induced diastolic dysfunction occur independently of changes in blood pressure. *Hypertension* (Dallas, Tex.: 1979), v. 66, n. 2, p. 389–395, ago. 2015.
- DE MOURA, M. M.; SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; TODIRAS, M.; BADER, M.; ALENINA, N.; HAIBARA, A. S. Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin-(1-7) receptor Mas-knockout mice. *Peptides*, v. 31, n. 10, p. 1934–1939, out. 2010.
- DOSTAL, D. E.; BAKER, K. M. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circulation Research*, v. 85, n. 7, p. 643–650, 1 out. 1999.
- Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. *JAMA*, v. 273, n. 3, p. 199–208, 18 jan. 1995.
- ELCARTE L. R.; VILLA E. I.; SADA G. J.; GASCO E. M.; OYARZABAL I. M.; SOLA M. A.; MARTÍNEZ G. A. ELCARTE L. T.; SERRANO T. D. MERINO G. R. [Study from Navarra. Variations in the average arterial blood pressure level according to age, gender and body height]. *Anales Espanoles De Pediatria*, v. 38, n. 2, p. 151–158, fev. 1993.
- ELLISON, K. E.; INGELFINGER, J. R.; PIVOR, M.; DZAU, V. J. Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 83, n. 6, p. 1941–1945, 1 jun. 1989.
- ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research*, v. 25, n. 9–10, p. 1439–1451, out. 2000.
- F, L. A. The fast and the slowly developing pressor effect of angiotensin II. *The Renin-Angiotensin System*, p. 28.1-28.9, 1993.
- FELIX, D.; KHOSLA, M. C.; BARNES, K. L.; IMBODEN, H.; MONTANI, B. FERRARIO, C. M. NEUROPHYSIOLOGICAL RESPONSES to angiotensin-(1-7). *Hypertension* (Dallas, Tex.: 1979), v. 17, n. 6 Pt 2, p. 1111–1114, jun. 1991.
- FERREIRA, A. J.; PINHEIRO, S. V.; CASTRO, C. H.; SILVA, G. A.; SILVA A. C.; ALMEIDA, A. P.; BADER, M.; RENTZSCH, B.; REUDELHUBER, T. L.; SANTOS, R. A. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, v. 4, n. 2, p. 83–96, 1 abr. 2010.
- FERREIRA, A. J.; PINHEIRO, S. V.; CASTRO, C. H.; SILVA, G. A.; SILVA A. C.; ALMEIDA, A. P.; BADER, M.; RENTZSCH, B.; REUDELHUBER, T. L.; SANTOS, R. A. RENAL FUNCTION IN TRANSGENIC RATS EXPRESSING AN ANGIOTENSIN-(1-7)-PRODUCING FUSION protein. *Regulatory Peptides*, v. 137, n. 3, p. 128–133, 10 dez. 2006.

- FISCHER, M.; BAESSLER, A.; SCHUNKERT, H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*, v. 53, n. 3, p. 672–677, 15 fev. 2002.
- FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine*, v. 264, n. 3, p. 224–236, set. 2008.
- GALLAGHER, P. E.; LI, P.; LENHART, J.R.; CHAPPELL, M. C.; BROSNIHAN, K. B. Estrogen Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme mRNA. *Hypertension*, v. 33, n. 1, p. 323–328, jan. 1999.
- DOUMAS, M.; PAPADEMETRIOU, V.; FASELIS, C.; KOKKINOS, P. Gender differences in hypertension: myths and reality. *Curr Hypertens Rep.*, v. 15 n. 4, p. 321-330, aug. 2013.
- GIRONACCI, M. M.; CERNIELLO, M. F.; CARBAJOSA, N. L.; GOLDSTEIN, J.; CERRATO, B. D. Protective axis of the renin-angiotensin system in the brain. *Clinical Science*, v. 127, n. 5, p. 295–306, set. 2014.
- GOLDMAN, R. K.; AZAR, A. S.; MULVANEY, J. M.; HINOJODA-LABORDE, C.; HAYWOOD, J. R.; BROOKS, V. L. Baroreflex sensitivity varies during the rat estrous cycle: role of gonadal steroids. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 296, n. 5, p. R1419-1426, maio 2009.
- GUETTA, V.; QUYYUMI, A. A.; PRASAD, A.; PANZA, J. A.; WACLAWIW, M.; CANNON, R. O. The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation*, v. 96, n. 9, p. 2795–2801, 4 nov. 1997.
- GUTKOWSKA, J. JANKOWSKI, M.; LAMBERT, C.; MUKADDAM-DAHER, S.; ZINGG, H. H.; MCCANN, S. M. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 21, p. 11704–11709, 14 out. 1997.
- HAANWINCKEL, M. A.; ELIAS L. K.; FAVARETTO, A. L.; GUTOWSKA, J.; McCANN S. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, n. 17, p. 7902–7906, 15 ago. 1995.
- HARTMANN, B. W.; KIRCHENGAST, S.; ALBRECHT, A.; LAML, T.; SÖREGI, G.; HUBER, J. C. Androgen serum levels in women with premature ovarian failure compared to fertile and menopausal controls. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, v. 44, n. 2, p. 127–131, 1997.
- HAY, M. Sex, the brain and hypertension: brain oestrogen receptors and high blood pressure risk factors. *Clinical Science*, v. 130, n. 1, p. 9–18, jan. 2016.
- HONG, M.-N.; LI, X. D.; CHEN, D. R.; RUAN, C. C.; XU, J. Z.; CHEN, J.; WU, Y. J.; MA, Y.; ZHU, D. L.; GAO, P. J. Renal denervation attenuates aldosterone expression and associated

- cardiovascular pathophysiology in angiotensin II-induced hypertension. *Oncotarget*, v. 7, n. 42, p. 67828–67840, 18 out. 2016.
- ICHIKI, T.; USUI, M.; KATO, M.; FUNAKOSHI, Y.; ITO, K.; EGASHIRA, K.; TAKESHITA, A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, v. 31, n. 1 Pt 2, p. 342–348, jan. 1998.
- ICHIKI, TOMOKO; BURNETT, J. C. Atrial Natriuretic Peptide - Old But New Therapeutic in Cardiovascular Diseases. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, v. 81, n. 7, p. 913–919, 23 jun. 2017.
- ILIESCU, R.; LOHMEIER, T. E.; TUDORANCEA, I.; LAFFIN, L.; BAKRIS, G. L. Renal denervation for the treatment of resistant hypertension: review and clinical perspective. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, v. 309, n. 7, p. F583-594, 1 out. 2015.
- JIROUTEK, M. R.; CHEN, M. H.; JOHNSTON, C. C.; LONGCOPE, C. Changes in reproductive hormones and sex hormone-binding globulin in a group of postmenopausal women measured over 10 years. *Menopause (New York, N.Y.)*, v. 5, n. 2, p. 90–94, 1998.
- KANGUSSU, L. M.; GUIMARAES, P. S.; NADU, A. P.; MELO, M. B.; SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Activation of angiotensin-(1-7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Neuropharmacology*, v. 97, p. 58–66, out. 2015.
- KANGUSSU, L. M.; ALMEIDA-SANTOS, A. F.; MOREIRA, F. A.; FONTES, M. A. P.; SANTOS, R. A. S.; AGUIAR, D. C.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Reduced anxiety-like behavior in transgenic rats with chronically overproduction of angiotensin-(1-7): Role of the Mas receptor. *Behavioural Brain Research*, v. 331, p. 193–198, 28 jul. 2017.
- KAPLAN, N. M.; KEM, D. C.; HOLLAND, O. B.; KRAMER, N. J.; HIGGINS, J.; GOMEZ-SANCHEZ, C. The Intravenous Furosemide Test: A Simple Way to Evaluate Renin Responsiveness. *Annals of Internal Medicine*, v. 84, n. 6, p. 639–645, jun. 1976.
- KIENITZ, T.; QUINKLER, M. Testosterone and blood pressure regulation. *Kidney & Blood Pressure Research*, v. 31, n. 2, p. 71–79, 2008.
- KNOWLTON, A. A.; LEE, A. R. Estrogen and the Cardiovascular System. *Pharmacology & therapeutics*, v. 135, n. 1, p. 54–70, jul. 2012.
- KOMUKAI, K.; MOCHIZUKI, S.; YOSHIMURA, M. Gender and the renin–angiotensin–aldosterone system. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 24, n. 6, p. 687–698, 2010.
- KORNER, P. I. Integrative neural cardiovascular control. *Physiological Reviews*, v. 51, n. 2, p. 312–367, abr. 1971a.
- KORNER, P. I. The central nervous system and physiological mechanisms of “optimal” cardiovascular control. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, v. 49, n. 4, p. 319–343, ago. 1971b.

- LIPPOLDT, A.; PAUL, M.; FUXE, K.; GANTEN, D. The brain renin-angiotensin system: molecular mechanisms of cell to cell interactions. *Clinical and Experimental Hypertension*, v. 17, n. 1–2, p. 251–266, 1995.
- LUCINI, D.; DI FEDE, G.; PARATI, G.; PAGANI, M. Impact of Chronic Psychosocial Stress on Autonomic Cardiovascular Regulation in Otherwise Healthy Subjects. *Hypertension*, v. 46, n. 5, p. 1201–1206, nov. 2005.
- MATTSSON, L. A.; CULLBERG, G.; HAMBERGER, L.; SAMSIOE, G.; SILFVERSTOLPE, G. Lipid metabolism in women with polycystic ovary syndrome: possible implications for an increased risk of coronary heart disease. *Fertility and Sterility*, v. 42, n. 4, p. 579–584, out. 1984.
- MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The New England Journal of Medicine*, v. 340, n. 23, p. 1801–1811, 10 jun. 1999.
- MILLER, A. J.; ARNOLD, A. C. The Renin-Angiotensin System in Cardiovascular Autonomic Control: Recent Developments and Clinical Implications. *Clinical Autonomic Research: official journal of the Clinical Autonomic Research Society*, v. 29, n. 2, p. 231–243, abr. 2019.
- MILLER, J. A.; ANACTA, L. A.; CATTRAN, D. C. Impact of gender on the renal response to angiotensin II. *Kidney International*, v. 55, n. 1, p. 278–285, jan. 1999.
- MINSON, C. T.; HALLIWILL, J. R.; YOUNG, T. M.; JOYNER, M. J. Influence of the menstrual cycle on sympathetic activity, baroreflex sensitivity, and vascular transduction in young women. *Circulation*, v. 101, n. 8, p. 862–868, 29 fev. 2000.
- MOREIRA, C. C. L.; LOURENÇO, F. C.; MARIO, É. G.; SANTOS, R. A. S., BOTION, L. M., & CHAVES, V. E. Long-term effects of angiotensin-(1-7) on lipid metabolism in the adipose tissue and liver. *Peptides*, v. 92, p. 16–22, jun. 2017.
- MOURA SANTOS, D.; RIBEIRO MARINS, F.; LIMBORÇO-FILHO, M.; DE OLIVEIRA, M. L.; HAMAMOTO, D.; XAVIER, C. H.; MOREIRA, F. A.; SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; PELIKY FONTES, M. A. Chronic overexpression of angiotensin-(1-7) in rats reduces cardiac reactivity to acute stress and dampens anxious behavior. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, v. 20, n. 2, p. 189–196, mar. 2017.
- MULLINS, J. J.; PETERS, J.; GANTEN, D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature*, v. 344, p. 541–544, 1 abr. 1990.
- NEWTON-CHEH, C.; LARSON, M. G.; VASAN, R. S.; LEVY D.; BLOCH, K.; SURTI, A.; GUIDUCCI, C.; KATHIRESAN, S.; BENJAMIN, E. J.; STRUCK, J.; MORGENTHALER, N. G.; BERGMANN, A.; BLANKENBERG, S.; KEE, F.; NILSSON, P.; YIN, X.; PELTONEN, L.; VARTIAINEN, E.; SALOMAA, V.; HIRSCHHORN, J. N.; MELANDER, O.; WANG, T. J. Association of common variants in NPPA and NPPB with circulating natriuretic peptides and blood pressure. *Nature Genetics*, v. 41, n. 3, p. 348–353, mar. 2009.

- NICKENIG, G.; BÄUMER, A. T.; GROHÈ, C.; KAHLERT, S.; STREHLOW, K.; ROSENKRANZ, S.; STÄBLEIN, A.; BECKERS, F.; SMITS, J. F.; DAEMEN, M. J.; VETTER, H.; BÖHM, M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*, v. 97, n. 22, p. 2197–2201, 9 jun. 1998.
- OSMAN, I.; WANG, L.; HU, G.; ZHENG, Z.; & ZHOU, J. GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)-Positive Progenitor Cells Contribute to the Development of Vascular Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells-Brief Report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 40, n. 5, p. 1231–1238, maio 2020.
- OUCHI, Y.; SHARE, L.; CROFTON, J. T.; IITAKE, K.; BROOKS, D. P. Sex difference in the development of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. *Hypertension*, v. 9, n. 2, p. 172–177, fev. 1987.
- LOUDAR, O.; ELGER, M.; BANKIR, L.; GANTEN, D.; GANTEN, U.; KRIZ, W. Differences in rat kidney morphology between males, females and testosterone-treated females. *Renal Physiology and Biochemistry*, v. 14, n. 3, p. 92–102, 1991.
- OVERLIE, I.; MOEN, M. H.; MORKRID, L.; SKJAERAASEN, J. S.; HOLTE, A. The endocrine transition around menopause--a five years prospective study with profiles of gonadotropines, estrogens, androgens and SHBG among healthy women. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, v. 78, n. 7, p. 642–647, ago. 1999.
- PASSOS-SILVA, D. G.; VERANO-BRAGA, T.; SANTOS, R. A. S. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clinical science (London, England)*, v. 124, n. 7, p. 443–456, 1 abr. 2013.
- PATTEN, R. D.; KARAS, R. H. Estrogen replacement and cardiomyocyte protection. *Trends in Cardiovascular Medicine*, v. 16, n. 3, p. 69–75, abr. 2006.
- PENDERGRASS, K. D.; PIRRO, N. T.; WESTWOOD, B. M.; FERRARIO, C. M.; BROSNIHAN, K. B.; CHAPPELL, M. C. Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2). Lewis but not normotensive Lewis rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 1 jul. 2008.
- PRIPP, U.; HALL, G.; CSEMICZKY, G.; EKSBORG, S.; LANDGREN, B. M.; SCHENCK-GUSTAFSSON, K. A randomized trial on effects of hormone therapy on ambulatory blood pressure and lipoprotein levels in women with coronary artery disease. *Journal of Hypertension*, v. 17, n. 10, p. 1379–1386, out. 1999.
- RAPOSO-COSTA, A. P.; REIS, A. M. O sistema renina-angiotensina em ovário. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 44, p. 306–313, ago. 2000.
- RECKELHOFF, J. F. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, v. 37, n. 5, p. 1199–1208, maio 2001.

- RECKELHOFF, J. F.; ZHANG, H.; GRANGER, J. P. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, v. 31, n. 1 Pt 2, p. 435–439, jan. 1998.
- RECKELHOFF, J. F.; ZHANG, H.; SRIVASTAVA, K. Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, v. 35, n. 1 Pt 2, p. 480–483, jan. 2000.
- RECKELHOFF, JANE F. Sex Differences in Regulation of Blood Pressure. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1065, p. 139–151, 2018.
- ROSANO, G. M. C.; VITALE, C.; MARAZZI, G.; & VOLTERRANI, M. Menopause and cardiovascular disease: the evidence. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society*, v. 10 Suppl 1, p. 19–24, fev. 2007.
- ROSSI, G. P.; CAROCCIA, B.; SECCIA, T. M. Role of estrogen receptors in modulating aldosterone biosynthesis and blood pressure. *Steroids*, v. 152, p. 108486, dez. 2019.
- ROWLAND, N. E.; FREGLY, M. J. Role of Gonadal Hormones in Hypertension in the Dahl Salt-Sensitive Rat. *Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice*, v. 14, n. 3, p. 367–375, 1 jan. 1992.
- RUBANYI, G. M.; FREAY, A. D.; KAUSER, K.; SUKOVICH, D.; BURTON, G.; LUBAHN, D. B.; COUSE, J. F.; CURTIS, S. W.; KORACH, K. S. Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. *Journal of Clinical Investigation*, v. 99, n. 10, p. 2429, 1997.
- SAEKI, Y.; ATOGAMI, F.; TAKAHASHI, K.; YOSHIZAWA, T. Reflex control of autonomic function induced by posture change during the menstrual cycle. *Journal of the Autonomic Nervous System*, v. 66, n. 1, p. 69–74, 10 set. 1997.
- SAMUEL, C. S.; Hewitson, T. D.; Unemori, E. N.; Tang, M. L. Drugs of the future: the hormone relaxin. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 64, n. 12, p. 1539–1557, jun. 2007.
- SANDBERG, K.; JI, H. Sex and the renin angiotensin system: implications for gender differences in the progression of kidney disease. *Advances in Renal Replacement Therapy*, v. 10, n. 1, p. 15–23, jan. 2003.
- SANTIAGO, N. M.; GUIMARÃES, P. S.; SIRVENTE, R. A.; OLIVEIRA, L. A.; IRIGOYEN, M. C.; SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Lifetime overproduction of circulating Angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension-induced cardiac dysfunction and remodeling. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, v. 55, n. 4, p. 889–896, abr. 2010.
- SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; NADU, A. P.; BRAGA, A. N. G.; ALMEIDA, A. P.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; BALATU, O.; ILIESCO, R.; REUDELHUBER, T. L.;

- BADER, M. Expression of angiotensin-(1-7) producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiological genomics*, v. 17, p. 292-9, 1 jun. 2004.
- SANTOS, R. A. S.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P., DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 14, p. 8258-8263, 8 jul. 2003.
- SANTOS, R. A. S.; SAMPAIO, W. O.; ALZAMORA, A. C.; MOTTA-SANTOS, D.; ALENINA, N.; BADER, M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiological Reviews*, v. 98, n. 1, p. 505-553, 1 jan. 2018.
- SANTOS, S. H. S.; BRAGA, J. F.; MARIO, E. G.; PÔRTO L. C. J.; RODRIGUES-MACHADO, M. G.; MURARI, A.; BOTION, L. M.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A. S. Improved Lipid and Glucose Metabolism in Transgenic Rats With Increased Circulating Angiotensin-(1-7). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 30, n. 5, p. 953-961, maio 2010.
- SCHIAVONE, M. T.; SANTOS, R. A. S.; BROSNIHAN, K. B.; KHOSLA, M. C.; FERRARIO, C. M. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 85, n. 11, p. 4095-4098, jun. 1988.
- SCHINKE, M.; BALTATU, O.; BÖHM, M.; PETERS, J.; RASCHER, W.; BRICCA, G.; LIPPOLDT, A.; GANTEN, D.; BADER, M. Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, n. 7, p. 3975-3980, 30 mar. 1999.
- SCHINKE, M.; BALTATU, O.; BÖHM, M.; PETERS, J.; RASCHER, W.; BRICCA, G.; LIPPOLDT, A.; GANTEN, D.; BADER, M. Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, n. 7, p. 3975-3980, 30 mar. 1999b.
- SCHUNKERT, H.; DANSER, A. H.; HENSE, H. W.; DERKX, F. H.; KÜRZINGER, S.; RIEGGER, G. A. Effects of Estrogen Replacement Therapy on the Renin-Angiotensin System in Postmenopausal Women. *Circulation*, v. 95, n. 1, p. 39-45, 7 jan. 1997.
- SEELY, E. W.; WALSH, B. W.; GERHARD, M. D.; WILLIAMS, G. H. Estradiol with or without progesterone and ambulatory blood pressure in postmenopausal women. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, v. 33, n. 5, p. 1190-1194, maio 1999.
- SHEPHERD, J. T.; MANCIA, G. Reflex control of the human cardiovascular system. *Reviews of*

- Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, v. 105, p. 1–99, 1986.
- SILVA-ANTONIALI, M. M.; TOSTES, R. C.; FERNANDES, L.; FIOR-CHADI, D. R.; AKAMINE, E. H.; CARVALHO, M. H.; FORTES, Z. B.; NIGRO, D. A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research*, v. 62, n. 3, p. 587–593, 1 jun. 2004.
- SINN, P. L.; SIGMUND, C. D. Transgenic models as tools for studying the regulation of human renin expression. *Regulatory Peptides*, v. 86, n. 1–3, p. 77–82, 29 jan. 2000.
- SMITHIES, O. Theodore Cooper Memorial Lecture. A mouse view of hypertension. *Hypertension* (Dallas, Tex.: 1979), v. 30, n. 6, p. 1318–1324, dez. 1997.
- SOATO, G.; KRIEGER, E. Heart rate after acute hypertension in the rat. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, v. 227, n. 6, p. 1389–1393, dez. 1974.
- SORANNO, D.; PRASAD, V.; DAVID, R.; OBERFIELD, S.; GRECO, A.; SIVARAMAN, N.; DRUCKER, W. Hypertension and virilization caused by a unique desoxycorticosterone- and androgen-secreting adrenal adenoma. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*, v. 12, n. 2, p. 215–220, 1999.
- SULLIVAN, J. C.; RODRIGUEZ-MIGUELEZ, P.; ZIMMERMAN, M. A.; HARRIS, R. A. Differences in angiotensin (1–7) between men and women. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 308, n. 9, p. H1171–H1176, 1 maio 2015.
- TAKEZAWA, H.; HAYASHI, H.; SANO, H.; SAITO, H.; EBIHARA, S. Circadian and estrous cycle-dependent variations in blood pressure and heart rate in female rats. *The American Journal of Physiology*, v. 267, n. 5 Pt 2, p. R1250-1256, nov. 1994.
- TAKEZAWA, H.; HAYASHI, H.; SANO, H.; EBIHARA, S. Estrous-related variations of blood pressure and heart rate in female rats. *Frontiers of Medical and Biological Engineering: The International Journal of the Japan Society of Medical Electronics and Biological Engineering*, v. 6, n. 2, p. 131–137, 1994.
- TALBOTT, E.; GUZICK, D.; CLERICI, A.; BERGA, S.; DETRE, K.; WEIMER, K.; KULLER, L. Coronary heart disease risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 15, n. 7, p. 821–826, jul. 1995.
- TANAKA, M.; SATO, M.; UMEHARA, S.; NISHIKAWA, T. Influence of menstrual cycle on baroreflex control of heart rate: comparison with male volunteers. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 285, n. 5, p. R1091-1097, nov. 2003.
- TU, H.; ZHANG, D.; LI, Y.-L. Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Arterial Baroreceptor Remodeling in Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Neuroscience Bulletin*, v. 35, n. 1, p. 98–112, 27 ago. 2018.

- USUI, M.; ICHIKI, T.; KATOH, M.; EGASHIRA, K.; TAKESHITA, A. Regulation of angiotensin II receptor expression by nitric oxide in rat adrenal gland. *Hypertension* (Dallas, Tex.: 1979), v. 32, n. 3, p. 527–533, set. 1998.
- VILLELA, D. C.; PASSOS-SILVA, D. G.; SANTOS, R. A. S. Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 23, n. 2, p. 130–134, mar. 2014.
- VOIGT, J.-P.; HÖRTNAGL, H.; REX, A.; VAN HOVE, L.; BADER, M.; FINK, H. Brain angiotensin and anxiety-related behavior: The transgenic rat TGR(ASrAOGEN)680. *Brain Research*, v. 1046, n. 1–2, p. 145–156, jun. 2005.
- WIINBERG, N.; HØEGHOLM, A.; CHRISTENSEN, H. R.; BANG, L. E.; MIKKELSEN, K. L.; NIELSEN, P. E.; SVENDSEN, T. L.; KAMPMANN, J. P.; MADSEN, N. H.; BENTZON, M. W. 24-h ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. *American Journal of Hypertension*, v. 8, n. 10, p. 978–986, 1 out. 1995.
- YAMADA, K.; IYER, S. N.; CHAPPELL, M. C.; GANTEN, D.; FERRARIO, C. M. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension* (Dallas, Tex.: 1979), v. 32, n. 3, p. 496–502, set. 1998.
- ZHUO, L.; THEIS, M.; ALVAREZ-MAYA, I.; BRENNER, M.; WILLECKE, K.; MESSING, A. hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis* (New York, N.Y.: 2000), v. 31, n. 2, p. 85–94, out. 2001.