

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E RENAIIS INDUZIDOS PELA
INFUSÃO CENTRAL DE ALAMANDINA
EM ANIMAIS HIPERTENSOS**

LUCAS ARAÚJO CASTRO E SOUZA

BELO HORIZONTE
2018

LUCAS ARAÚJO CASTRO E SOUZA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E RENAIIS INDUZIDOS PELA
INFUSÃO CENTRAL DE ALAMANDINA
EM ANIMAIS HIPERTENSOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências: Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos

BELO HORIZONTE
2018

“Life is like riding a bicycle.

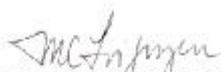
To keep your balance, you must keep moving”.

Albert Einstein

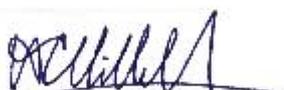
**"EFEITOS CARDIOVASCULARES E RENAIIS DA INFUSÃO
CENTRAL DE ALAMANDINA EM ANIMAIS HIPERTENSOS"**

LUCAS ARAÚJO CASTRO E SOUZA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **29 de maio de 2018**, pela Banca
Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DRª. MARIA CLAUDIA COSTA IRIGOYEN
INCor/USP



PROF. DR. DANIEL CAMPOS VILLELA
FACULDADE DE MEDICINA/UFVJM



PROFA. DRª. ANDREA SIQUEIRA HAIBARA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRª. RAFAELA FERNANDES DA SILVA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRA. MARIA JOSÉ CAMPAGNOLE DOS SANTOS
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa do Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, 29 de maio de 2018.

**DEDICO ESTE TRABALHO À MINHA ESPOSA, BRUNA, E À MINHA
FAMÍLIA, PEO AMOR, INCENTIVO E COMPREENSÃO.**

AGRADECIMENTOS ACADÊMICOS

A minha orientadora, Professora Maria José Campagnole dos Santos, pela oportunidade, incentivo, confiança, carinho e por todos os ensinamentos! Muito obrigado também por perseguir, junto comigo, sempre com muita paciência, o sonho do doutorado sanduíche! Aprendi muito com você e lhe sou eternamente grato por tudo!

Ao meu orientador estrangeiro, Professor Michael Bader, pela oportunidade de integrar a sua equipe, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho e por estar sempre disponível para ajudar durante o período em que estive em Berlim.

Ao Professor Robson pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho e por estar sempre disponível para conversar e tirar dúvidas.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia pela importante contribuição na minha formação científica, em especial aos professores Cândido Coimbra, Robson Santos, Andrea Haibara, Marco Antônio Peliky, Rafaela Fernandes, Rafael Szawka, Maria Aparecida Vieira e Jader Cruz.

À equipe do Laboratório de Hipertensão e a todos os meus colaboradores pela contribuição na realização deste trabalho, em especial ao Lucas Kangussu, Silvia Zebral, Leda Coimbra, Marcella Braga, Danielle Alves e Daisy Santos.

À equipe do Bader's Lab por me receber tão bem, pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão, ICB/UFMG, pela amizade, por tornar os dias mais leves e agradáveis e por estarem sempre dispostos a me ajudar quando precisei! Em especial Giovanni Canta, Jônathas Almeida, Fernando Pedro. Com certeza aprendi muito com vocês!

À Mônica, Elaine e Sílvio pelo cuidado dos animais nos biotérios e durante os períodos de experimentos.

Ao Zezé pela boa vontade em ajudar sempre e pela contribuição na realização deste trabalho.

Aos animais pela contribuição no avanço da ciência e geração de conhecimento e benefícios diretos e indiretos para a sociedade.

Às agências de fomento à pesquisa, FAPEMIG, Capes e CNPq pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos que, de forma direta ou indireta, participaram de minha formação científica e da realização deste trabalho, meu muito obrigado!!!

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

A Deus por me guiar, iluminar e dar força e sabedoria para superar todas as dificuldades que surgiram no caminho.

À Bruna, minha esposa, pelo amor, carinho, amizade, companheirismo, dedicação, incentivo e por viver os meus sonhos ao meu lado, dividindo comigo os momentos mais felizes e tristes de minha vida. Com certeza, a minha vida é muito mais feliz e completa ao seu lado! Muito obrigado por tudo!!!

À minha família pela pessoa que me tornei, por me ensinar meus valores e a importância de me dedicar para alcançar os meus objetivos. Aos meus pais por todo o sacrifício e incentivo para que eu chegasse até aqui. Aos meus irmãos, Mateus e Carol, pela amizade e por sempre me ajudarem nos momentos em que precisei. À minha madrinha, Cota, por todo o carinho, incentivo e por não medir esforços para que eu realizasse os meus sonhos. À minha vó, Genita, por ser um exemplo de educação, generosidade e sabedoria e por todo o amor e carinho. À minha sogra, Neuza, por me tratar como um filho e estar sempre presente em nossas vidas. Aos meus sobrinhos, Cauã e Bia, pelo carinho e por compreenderem os momentos que eu não estava disponível para brincar! Rsr.

Aos meus amigos pela convivência, incentivo e amizade! Em especial ao Giovanni Canta por todas as caronas após os dias exaustivos no laboratório, por me ajudar nos experimentos e organizações do laboratório e, principalmente, por ser um amigo com quem sempre posso contar! Ao Jonathas Almeida por toda a amizade e por estar sempre disposto a trocar idéias, ouvir desabafos e dar conselhos! Aos amigos de Berlim por todos os momentos agradáveis, em especial à Paula Cavalcante, André Rodrigues, Sarah, Rogério, Rafael, Polina e Simon.

Este 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). Parte do trabalho foi realizado no Bader's Lab, no Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC), em Berlim, Alemanha, durante o estágio sanduíche do discente sob a supervisão do Prof. Dr. Michael Bader e com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Além disso, alguns dos experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Renal do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG, a partir de colaboração com a Profa. Dra. Maria Aparecida Ribeiro Vieira. O projeto contou com o apoio financeiro da FAPEMIG, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) via edital PRONEX e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – NanoBioFar.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2R1C	Ratos com hipertensão renovascular, 2 rins 1 clipe
A779	Antagonista seletivo do receptor Mas
Ach	Acetilcolina
ADAM17	Desintegrina e metaloprotease 17
Ala	Resíduo de alanina
Ang A	angiotensina A
Ang I	angiotensina I
Ang II	angiotensina II
Ang-(1-12)	angiotensina-(1-12)
Ang-(1-7)	angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	angiotensina-(1-9)
ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
AOGEN	Angiotensinogênio
Arg	Resíduo de arginina
Asp	Resíduo de aspartato
AT ₁	Receptores tipo I da Ang II
AT ₂	Receptores tipo II da Ang II
AVE	Acidente Vascular Encefálico
Avp	Gene responsável pela transcrição do hormônio arginina vasopressina
BNP	Peptídeo Natriurético Cerebral
BPF	Fator potenciador da bradicinina
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
CVLM	Bulbo ventrolateral caudal
DC	Débito cardíaco
DNAc	DNA complementar
DOCA	Deoxicorticosterona
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina II
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FC	Frequência cardíaca
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLS	Glutaminase
HA	Hipertensão arterial
HE	Hematoxilina e Eosina
His	Resíduo de histidina
Iba1	Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1
ICV	Intracerebroventricular
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
Ile	Resíduo de isoleucina
IP	Intervalo de pulso
KCl	Cloreto de potássio
MrgD	MAS-related G-protein coupled receptor D
MrgD-KO	Camundongos com deleção genética do receptor MrgD

NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanonograma, unidade de medida
NGAL	Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PD123319	Antagonista dos receptores AT ₂ e mrgd
Phe	Resíduo de fenilalanina
PKA	Proteína cinase dependente de ampc
pmol	Picomol, unidade de medida
PP	Pressão de pulso
Pro	Resíduo de prolina
PRR	Receptores de prorenina
PVN	Núcleo paraventricular
RA	Camundongos transgênicos com superexpressão de renina e angiotensinogênio humanos
mRNA	RNA mensageiro
RP	Resistência periférica
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real
RVLM	Bulbo ventrolateral rostral
SA	Camundongos transgênicos com superexpressão de ECA2 em neurônios
SCN	Núcleo supraquiasmático do hipotálamo
SD	Sprague-Dawley
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
siRNA	Small interfering RNA
Slc1a3	Transportador de amino ácido excitatório
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SO	Núcleo supraóptico do hipotálamo
SRA	Sistema renina-angiotensina
Ratos TG	Ratos hipertensos transgênicos TGR(mREN2) ²⁷
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TGR(mREN2) ²⁷	Ratos transgênicos com superexpressão de renina de camundongo
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tyr	Resíduo de tirosina
Val	Resíduo de valina
VE	Ventrículo esquerdo do coração
VS	Volume sistólico
WT	Wild-type, camundongos selvagens

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista esquemática da cascata do sistema renina-angiotensina e a sequência de aminoácidos de seus principais peptídeos.	26
Figura 2 - Protocolo experimental para a avaliação os efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por curto prazo em animais normotensos e hipertensos.....	59
Figura 3 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos (SD).	59
Figura 4 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre parâmetros cardiovasculares de ratos hipertensos (TG).	60
Figura 5 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a sensibilidade do controle barorreflexo da FC de ratos SD e TG.....	60
Figura 6 – Protocolo experimental para a avaliação da estabilidade da alamandina.	61
Figura 7 - Avaliação da estabilidade da alamandina por espectrometria de massas (MALDI-TOF).	62
Figura 8 - Confirmação da sequência de aminoácidos da alamandina por espectrometria de massas.	63
Figura 9 - Protocolo experimental para a avaliação dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por longo prazo em ratos hipertensos TGR(mREN2)27 com diferentes idades no início do tratamento.	64
Figura 10 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre parâmetros cardiovasculares de ratos hipertensos com 9 semanas de idade no início do tratamento.	65
Figura 11 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre parâmetros cardiovasculares de ratos hipertensos com 16 semanas de idade no início do tratamento.....	66
Figura 12 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre parâmetros cardiovasculares de ratos hipertensos com 12 semanas de idade no início do tratamento.....	67
Figura 13 - Protocolo experimental para a avaliação dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por longo prazo em ratos hipertensos DOCA-Sal.	70
Figura 14 – Efeito da infusão ICV de alamadina sobre parâmetros cardiovasculares em ratos hipertensos DOCA-sal.....	71
Figura 15 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre sensibilidade do controle reflexo da FC em ratos hipertensos DOCA-sal.....	71
Figura 16 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a hipertrofia cardíaca em ratos hipertensos DOCA-sal.....	72
Figura 17 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a hipertrofia renal em ratos hipertensos DOCA-sal.	72
Figura 18 - Protocolo experimental para a avaliação dos efeitos da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o coração de ratos hipertensos TG.....	74
Figura 19 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a hipertrofia cardíaca em ratos hipertensos.....	75
Figura 20 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão de ANP e BNP cardíacos em ratos hipertensos.	75
Figura 21 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre os níveis de citocinas no coração de ratos hipertensos TG.	76
Figura 22 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a deposição de matriz extracelular no coração de ratos hipertensos.	77
Figura 23 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão gênica de componentes da matriz extracelular no coração de ratos hipertensos.	78

Figura 24 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão gênica de ECA e ECA2 no coração de ratos hipertensos TG.....	79
Figura 25 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre o peso do rim de ratos hipertensos TG.	81
Figura 26 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a inflamação renal de ratos hipertensos TG.....	82
Figura 27 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre os níveis de citocinas no rim de ratos hipertensos TG.....	83
Figura 28 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre deposição de colágeno total no rim de ratos hipertensos TG.	84
Figura 29 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão de componentes da matriz extracelular no rim de ratos hipertensos TG.....	85
Figura 30 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a função renal de ratos hipertensos TG.	86
Figura 31 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão de componentes do SRA no rim de ratos hipertensos TG.....	86
Figura 32 - Protocolo experimental para a avaliação do perfil de expressão gênica no SNC de ratos SD, TG e TG tratados com alamandina por 28 dias.	88
Figura 33 - Volcano plot mostrando o número genes com expressão aumentada (up-regulated, à direita, em vermelho) e diminuída (down regulated, à esquerda, em verde) no SNC de ratos TG (TG+Sal) em relação ao SNC de ratos SD (SD+Sal).....	89
Figura 34 - Volcano plot mostrando o número de genes com expressão aumentada (up-regulated, à direita em vermelho) e diminuída (down regulated, à esquerda, em verde) no SNC de ratos TG (TG+Sal) em relação ao SNC de ratos TG tratados com alamandina (200 ng/h, TG+Ala) por 28 dias.....	99
Figura 35 – Expressão gênica de Avp no SNC de ratos TG.	104
Figura 36 - Protocolo experimental para a avaliação do efeito da injeção ICV de alamandina (2 µg, 8 µl) sobre o volume urinário de ratos SD submetidos à restrição de água por 24 h. .	105
Figura 37 – Volume urinário basal e após a restrição de água por 24 horas em ratos SD. ...	106
Figura 38 – Ingestão de água, volume urinário e balanço hídrico basal de ratos SD.....	106
Figura 39 - Protocolo experimental para a avaliação do efeito da deleção genética do receptor MrgD sobre o fluxo urinário basal e após a restrição de água overnight.	107
Figura 40 – Volume urinário, ingestão hídrica e balanço hídrico basal de camundongos WT e MrgD-KO.	107
Figura 41 – Volume urinário após a restrição de água overnight em camundongos WT e MrgD-KO.	108
Figura 42 – Peso do rim de camundongos WT e MrgD-KO.....	108
Figura 43 - Protocolo para a avaliação do efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o volume urinário de ratos hipertensos TG.....	109
Figura 44 – Volume urinário, ingestão de água e balanço hídrico basal de ratos SD, TG e TG tratados com alamandina.	110
Figura 45 - Protocolo para a avaliação do efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre mecanismos relacionados às ações centrais do SRA.	111
Figura 46 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão gênica de componentes da via glutamatérgica no SNC de ratos hipertensos TG.....	112
Figura 47 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão gênica de nNOS no SNC de ratos hipertensos TG.	113
Figura 48 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão gênica de componentes do SRA no SNC de ratos hipertensos TG.	113

Figura 49 - Protocolo para a avaliação do efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre os níveis de citocinas inflamatórias no hipotálamo e no bulbo de ratos hipertensos TG.	114
Figura 50 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre citocinas no SNC de ratos hipertensos TG.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados para a avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.	55
Tabela 2 - Sumário dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina (4 ug/h) por curto prazo em ratos normotensos (SD) e hipertensos (TG).	60
Tabela 3 - Sumário dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por longo prazo em ratos TG com diferentes idades no início do tratamento.	68
Tabela 4 - Sumário dos efeitos da infusão ICV de alamandina (200 ng/h) por longo prazo em ratos DOCA.	73
Tabela 5 - Parâmetros de função cardíaca de animais normotensos (SD), hipertensos (TG) e hipertensos tratados com alamandina (TG+Ala; 200 ng/h), por longo prazo.	78
Tabela 6 - Sumário dos efeitos da infusão ICV de alamandina (200 ng/h) sobre o coração de ratos TG.	80
Tabela 7 - Efeito da infusão ICV de alamandina (200 ng/h) por longo prazo sobre o rim de ratos TG.	87
Tabela 8 - Genes com expressão alterada no encéfalo de ratos TG.	89
Tabela 9 - Anotação funcional dos genes com expressão alterada no SNC de ratos TG em relação ao encéfalo de ratos SD.	98
Tabela 10 - Genes com expressão alterada no encéfalo de ratos TG tratados com alamandina (200 ng/h; TG+Ala) por 28 dias.	99
Tabela 11 - Anotação funcional dos genes com expressão alterada no SNC de ratos TG em relação ao encéfalo de ratos TG tratados com alamandina (200 ng/h; TG+Ala) por 28 dias.	103
Tabela 12 - Sumário dos mecanismos centrais desencadeados pela infusão ICV de alamandina (200 ng/h) por longo prazo em ratos TG.	117

SUMÁRIO

RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Regulação da pressão arterial e Hipertensão	21
1.2. Sistema Renina-Angiotensina (SRA)	23
1.3. Sistema Renina-Angiotensina Cerebral	26
1.4. Sistema Renina-Angiotensina cerebral e hipertensão.....	28
1.5. Alamandina.....	34
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	37
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo Geral.....	42
3.2. Estratégias Experimentais.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Animais.....	44
4.2. Cirurgia estereotáxica para infusão ICV de alamandina.....	44
4.3. Infusão ICV de alamandina por curto prazo	45
4.4. Infusão ICV de alamandina por longo prazo	45
4.5. Avaliação dos efeitos cardiovasculares da alamandina	45
4.6. Avaliação da ingestão hídrica e da excreção urinária.....	48
4.7. Genotipagem dos ratos hipertensos TGR(mREN2) ²⁷	48
4.8. Avaliação dos efeitos da administração ICV de alamandina por longo prazo no padrão de lesões em órgãos-alvo promovidas pela hipertensão	48
4.9. Avaliação dos efeitos centrais da alamandina em animais hipertensos submetidos à infusão ICV de alamandina por longo prazo	52
4.10. Análise Estatística.....	54
5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS	58
5.1. Avaliação dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por curto prazo em animais normotensos e hipertensos.....	58
5.2. Avaliação dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por longo prazo em animais hipertensos	61
5.3. Avaliação do efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o coração de ratos hipertensos TGR(mREN2) ²⁷	73

5.4. Efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o rim de animais hipertensos	81
5.5. Avaliação do efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o cérebro de ratos hipertensos TGR(mREN2)27	88
6. DISCUSSÃO	118
7. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO	128
8. REFERÊNCIAS	130
ANEXOS	145
ANEXO I – Termo de aprovação do CEUA/UFMG	146

RESUMO

Introdução e objetivo. O tratamento da hipertensão arterial avançou muito nas últimas décadas, no entanto, cerca de 20% dos hipertensos possuem uma condição chamada hipertensão resistente e não respondem bem à terapêutica disponível atualmente. Dentre os mecanismos envolvidos na gênese e manutenção da hipertensão, destaca-se a hiperatividade da via angiotensina (Ang) II/ receptor AT₁ do sistema renina-angiotensina (SRA) circulante e tecidual, incluindo o SRA cerebral, associada a um desequilíbrio na atividade do sistema nervoso autônomo. Recentemente uma nova via do SRA composta pela alamandina e receptor MrgD foi descrita. Os estudos realizados até o momento mostram que a alamandina apresenta efeitos biológicos similares àqueles demonstrados para a Ang-(1-7), sugerindo que esta via poderia representar um mecanismo contrarregulador adicional do SRA. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do aumento dos níveis de alamandina no sistema nervoso central sobre os parâmetros cardiovasculares, o coração, o rim e o cérebro de animais hipertensos. **Métodos.** Para a realização desse estudo, foram utilizados ratos Sprague-Dawley (SD) e dois modelos de hipertensão experimental: ratos hipertensos transgênicos, TGR(mREN2)²⁷ (TG), e ratos com hipertensão DOCA-Sal (DOCA). Um grupo de animais recebeu tratamento com alamandina via infusão intracerebroventricular (ICV) de curto prazo (90 minutos) e outro grupo recebeu tratamento ICV com alamandina por longo prazo (14 ou 28 dias; com mini-bombas osmóticas). A avaliação dos parâmetros cardiovasculares (pressão arterial, frequência cardíaca e sensibilidade do barorreflexo) foi realizada a partir de um dos 3 sistemas: sistema de aquisição de pressão arterial (PA; BIOPAC), sistema de medida por telemetria ou sistema de medida por pletismografia de cauda. Lesões no coração e rim foram avaliadas a partir dos seguintes parâmetros: 1) hipertrofia cardíaca por peso do coração ou diâmetro dos cardiomiócitos por histologia e a expressão gênica (mRNA) de dois marcadores de hipertrofia: o peptídeo natriurético atrial (ANP) e o peptídeo natriurético cerebral (BNP); 2) avaliação da deposição de matriz extracelular no ventrículo esquerdo do coração (VE) por histologia e por expressão gênica de proteínas da matriz extracelular (mRNA) no VE e no rim; 3) função cardíaca por ecocardiograma; 4) dosagem de mediadores de inflamação no VE e no rim (ELISA); 5) avaliação do infiltrado inflamatório e de lesão tubulointersticial no rim por histologia; 6) avaliação da função renal. Os possíveis mediadores cerebrais envolvidos na resposta da alamandina foram avaliados por 1) RNAseq; 2) expressão gênica de componentes do sistema nitrérgico (nNOS), glutamatérgico (glutaminase, transportador de amino-ácido excitatório, subunidade NR1 do receptor NMDA), e do SRA [angiotensinogênio, enzima conversora

(ECA), ECA2, MrgD, Mas]; 3) dosagem de mediadores inflamatórios (ELISA). **Resultados.** O aumento dos níveis de alamandina no SNC por curto prazo (horas) reduziu a PA de animais hipertensos e melhorou a sensibilidade do barorreflexo em animais normotensos e hipertensos. Por sua vez, a infusão ICV de alamandina por longo prazo (4 semanas) reduziu a pressão arterial (PAD, PAS, PAM) e frequência cardíaca dos ratos TG que tinham 12 semanas de idade no início do tratamento. A infusão ICV de alamandina (14 dias) melhorou a sensibilidade do barorreflexo dos ratos DOCA, sem alterar a PA desses animais. A infusão de alamandina por longo prazo não alterou a hipertrofia cardíaca dos animais dos dois modelos de hipertensão, mas atenuou o aumento na deposição de matriz extracelular observada no VE dos animais hipertensos transgênicos. A função cardíaca e o nível aumentado de citocinas no VE desses animais não foi alterada. Em relação ao rim, o tratamento com alamandina reduziu o infiltrado inflamatório, a lesão túbulointersticial, os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β e reverteu a deposição de colágeno nos ratos TG. Em relação aos mecanismos centrais da alamandina, os animais hipertensos apresentaram aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipotálamo e no bulbo e proliferação e ativação da micróglia em importantes áreas do SNC relacionadas ao controle cardiovascular, como o PVN, o NTS e a RVLM. O tratamento com alamandina, atenuou essas alterações. Não houve diferença entre grupos com relação à expressão de componentes do SRA no SNC, com exceção do receptor MrgD, cuja expressão está aumentada em animais hipertensos e não é influenciada pelo aumento dos níveis de alamandina. Com relação à expressão de componentes dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico, não observamos alterações importantes entre os diferentes grupos experimentais. Uma variedade de genes está alterada no cérebro de animais hipertensos e hipertensos tratados com alamandina. Um certo número desses genes é comum a estes dois grupos, no entanto, a alteração observada na expressão desses genes não é uniforme. Assim, a expressão de alguns genes aumenta ou reduz nos dois grupos de animais, enquanto outros genes apresentam alterações opostas nos animais hipertensos em relação aos hipertensos tratados. **Conclusão.** Em conjunto, os resultados do presente estudo reforçam a importância do SRA cerebral na fisiopatologia da HA e indicam a alamandina como uma importante via alternativa e contraregulatória do SRA.

Palavras-chave: hipertensão arterial, sistema renina-angiotensina, sistema nervoso central, alamandina, lesões em órgãos-alvo, coração, rim.

ABSTRACT

Background and aim. The treatment of hypertension advanced a lot in the last decades, nevertheless around 20% of the subjects with hypertension have a condition named resistant hypertension and do not respond well to the currently available therapy. Among the mechanisms involved in the genesis and maintenance of hypertension we highlight the overactivity of angiotensin (Ang) II-AT1 receptor axis of the circulating and tissue renin-angiotensin system (RAS), including the brain RAS, which is associated to an imbalance of the autonomic nervous system activity. Recently, a new axis of the RAS composed by alamandine and MrgD receptor was described. The studies done heretofore show that alamandine has similar biological effects to those demonstrated to Ang-(1-7), suggesting that this axis could be an additional contraregulatory mechanism of the RAS. The aim of this study was to investigate the effects of the increased levels of alamandine in the central nervous system on cardiovascular parameters, the heart, the kidney, and the brain of hypertensive animals. **Methods.** To perform this study, Sprague-Dawley (SD) rats and two experimental models of hypertension were used: transgenic hypertensive rats, TGR(mREN2)27 (TG), and DOCA-Salt hypertensive rats (DOCA). Part of the animals received treatment with short-term intracerebroventricular (ICV) infusion of alamandine (90 minutes), and another part of the animals received treatment with long-term ICV infusion of alamandine (14 or 28 days, with osmotic minipumps). The assessment of cardiovascular parameters (arterial pressure, heart rate, and baroreflex sensitivity) was carried out through one of the following methods: arterial pressure acquisition system (AP, BIOPAC), telemetry, or by tail-cuff plethysmography. Damage in the heart and kidney was evaluated by the following parameters: 1) cardiac hypertrophy by the heart weight and cardiomyocytes diameter by histology and gene expression (mRNA) of two hypertrophy markers: atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP); 2) assessment of extracellular matrix deposition by histology and gene expression (mRNA) of extracellular matrix proteins in the left ventricle of the heart (LV) and in the kidney; 3) cardiac function by echocardiogram; 4) measurement of inflammatory mediators in the LV and kidney (ELISA); 5) evaluation of inflammatory infiltrate and tubulointerstitial injury in the kidney by histology; 6) renal function assessment. The possible brain mediators involved on alamandine effects were evaluated by: 1) RNASeq; 2) gene expression of components of the nitergic (nNOS), glutamatergic (glutaminase, excitatory aminoacid transporter, and NR1 subunit of the NMDA receptor) systems, and of the RAS [angiotensinogen, angiotensin converting enzyme (ACE), ACE2, MrgD and Mas receptors]; and 3) measurement of inflammatory mediators (ELISA). **Results.** The short-term (hours) increased levels of alamandine in the CNS decreased the AP

of hypertensive animals and improved the baroreflex sensitivity in both normotensive and hypertensive rats. The long-term (4 weeks) ICV infusion of alamandine decreased the arterial pressure (SAP, DAP, and MAP) and heart rate of 12 weeks old TG rats. The ICV infusion of alamandine (2 weeks) improved the baroreflex sensitivity of DOCA rats, without changing the AP of these rats. The long-term ICV infusion of alamandine did not change cardiac hypertrophy in both experimental models of hypertension but attenuated the increased extracellular matrix deposition observed in the LV of TG hypertensive rats. The cardiac function and levels of inflammatory cytokines were not changed. Regarding the kidney, the treatment with alamandine decreased the inflammatory infiltrate, the tubulointerstitial injury, the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β , and reverted collagen deposition in TG rats. Concerning central mechanisms of alamandine, TG rats presented increased levels of proinflammatory cytokines in hypothalamus and medulla oblongata. The treatment with alamandine attenuated these changes. There was no change between groups regarding the expression of the RAS components, with exception of the MrgD receptor, which expression is increased in hypertensive rats and is not influenced by the increased levels of alamandine. About the expression of the glutamatergic and nitroergic systems components, we did not find important differences between groups. The expression of a great number of genes is changed in the brain of hypertensive animals and hypertensive animals treated with alamandine. Some of these genes are common to these two groups, nonetheless the changes observed in the expression of these genes is not uniform. Thus, the expression of some genes is increased or decreased in the two groups while other genes present opposite changes in hypertensive animals in comparison to the treated hypertensive animals. **Conclusion.** Together, the results of this study support the importance of the brain RAS in the pathophysiology of hypertension and indicate alamandine as an alternative and contraregulatory pathway of the RAS.

Key-words: hypertension, renin-angiotensin system, central nervous system, alamandine, end-organ damage, heart, kidney.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Regulação da pressão arterial e Hipertensão

A regulação da pressão arterial (PA) é um processo complexo que depende da integração de diferentes órgãos e sistemas, os chamados sistemas de controle, para que a PA se mantenha dentro de uma estreita faixa de variação, o que é fundamental para a perfusão adequada dos tecidos corporais e a manutenção da homeostase. A PA de um indivíduo é determinada principalmente pelo débito cardíaco (DC) e pela resistência periférica (RP). O DC, por sua vez, é estabelecido pelo volume sistólico (VS) e pela frequência cardíaca (FC). O VS é ainda definido pela contratilidade miocárdica, RP e pré-carga, a última dependendo da volemia e da capacitância venosa. A RP depende do diâmetro e comprimento dos vasos e da viscosidade do sangue. É importante destacar que, dentre todos os determinantes da PA, com exceção apenas do comprimento dos vasos, todas as variáveis sofrem influência do sistema nervoso central (SNC) a partir do sistema nervoso autônomo (SNA), o qual é dividido didaticamente em duas porções: o sistema nervoso simpático e o sistema nervoso parassimpático (IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001; MICHELINI, 2012).

Os reflexos cardiovasculares – o barorreflexo, o quimiorreflexo e os reflexos cardiopulmonares – são considerados mecanismos de regulação momento-a-momento da PA, funcionando como uma forma de o SNC receber informações da periferia e, a partir dessas informações, controlar a atividade do SNA de acordo com as demandas do organismo. O barorreflexo, a partir do controle da atividade do SNA, do eixo hipotálamo-hipófise e da atividade do SRA circulante, é um dos mecanismos responsáveis por manter a PA em níveis relativamente constantes (IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001; MICHELINI, 2012).

O consenso na literatura é que o barorreflexo não participa da regulação a longo prazo da PA (THRASHER, 2004). Existem dois argumentos bem estabelecidos na literatura para isso. O primeiro deles diz respeito a adaptação ou ‘resetting’ dos barorreceptores observado em animais hipertensos. Em condições normais, os barorreceptores são mais ativados durante a sístole ventricular, quando a pressão no interior dos vasos é mais elevada. Até dois ou três dias após o aumento sustentado da PA, os barorreceptores apresentam uma saturação em sua atividade durante todo o ciclo cardíaco na tentativa de modular o DC e a RP e assim reduzir a PA. Entretanto, se a causa do aumento da PA não for removida, após três dias de aumento sustentado da PA, os barorreceptores passam por uma adaptação e a faixa de variação da PA ou ‘set point’ é deslocada de forma sustentada para níveis mais elevados de PA (ANDRESEN;

YANG, 1989; MCCUBBIN; GREEN; PAGE, 1956), o que significa que os barorreceptores voltam a apresentar um aumento em sua atividade apenas durante a sístole ventricular e mantêm a PA em sua nova faixa de variação. O segundo argumento é que animais submetidos à desnervação sinoaórtica apresentam um aumento da PA na fase inicial e maior labilidade da PA a longo prazo, mas não desenvolvem um aumento sustentado da PA (MASSON; AOKI; PAGE, 1966; THRASHER, 2004), o que provaria que os barorreceptores não são importantes para a regulação a longo prazo da PA (THRASHER, 2004).

Apesar de ser um tema ainda controverso na literatura (LOHMEIER; ILIESCU, 2015; THRASHER, 2004), nos últimos anos, diferentes estudos têm mostrado a importância do barorreflexo também na regulação a longo prazo da PA. Indivíduos e animais hipertensos com frequência apresentam disfunção desse importante reflexo cardiovascular (FREITAS *et al.*, 2017; GUIMARAES *et al.*, 2012; HERINGER-WALTHER *et al.*, 2001; KANGUSSU *et al.*, 2015), o que contribui para o aumento da atividade do sistema nervoso simpático (LOHMEIER; ILIESCU, 2015; THRASHER, 2004), a manutenção da hipertensão e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

As doenças cardiovasculares causam aproximadamente 17 milhões de mortes por ano no mundo, o que representa cerca de um terço do total de mortes. As complicações decorrentes da hipertensão arterial (HA), por sua vez, são responsáveis por aproximadamente 9,4 milhões dessas mortes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013), sendo a hipertensão responsável por pelo menos 45% das mortes por doenças cardíacas e 51% das mortes por acidente vascular encefálico (AVE) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). Além disso, a prevalência da hipertensão é alta e tem aumentado nas últimas décadas. O número de pessoas com hipertensão no mundo aumentou de 600 milhões em 1980 para 1 bilhão em 2008 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

A fisiopatologia da hipertensão essencial é complexa e multifatorial. O aumento sustentado da PA em indivíduos hipertensos provavelmente é causado pela interação de múltiplos fatores e o papel e importância de cada um desses fatores pode variar entre diferentes indivíduos (BEEVERS; LIP; O'BRIEN, 2001; OPARIL; ZAMAN; CALHOUN, 2003). De acordo com a literatura, os fatores relacionados à gênese e manutenção da hipertensão são: a hiperatividade do sistema renina-angiotensina (SRA) circulante e tecidual, o desbalanço da atividade do SNA, a disfunção endotelial, a alteração nos níveis de substâncias vasoativas, a hipercoagulabilidade, a alteração na sensibilidade à insulina e os fatores genéticos (BEEVERS; LIP; O'BRIEN, 2001; OPARIL; ZAMAN; CALHOUN, 2003). No entanto, apesar do conhecimento da fisiopatologia da hipertensão e seu tratamento terem avançado muito nas

últimas décadas, a prevalência dessa doença tem aumentado e aproximadamente 20% dos indivíduos possuem uma condição chamada hipertensão resistente, e não respondem bem à terapêutica disponível atualmente (FISHER, J. P.; PATON, 2012).

1.2. Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

Em 1836, Richard Bright foi o primeiro cientista a associar doença renal e hipertensão (KRIEGER, EDUARDO M., 2013). Nesse contexto, vários estudos foram realizados na tentativa de identificar os mecanismos pelos quais os rins poderiam elevar a PA (KRIEGER, EDUARDO M., 2013; MARKS; MAXWELL, 1979). Em 1898, Tingerstedt e Bergman tinham a hipótese de que uma substância pressora era sintetizada nos rins e, para confirmar essa hipótese, os cientistas injetaram extrato de rim de coelhos em outros coelhos, o que na maioria das vezes resultou em aumento da PA. Naquela publicação, os autores sugeriram que, em certas circunstâncias, essa substância secretada pelos rins, a qual eles chamaram de renina, poderia ser formada em maiores quantidades, o que poderia levar à hipertensão (MARKS; MAXWELL, 1979). A renina foi então o primeiro componente do sistema renina-angiotensina (SRA) a ser descoberto. Nos anos seguintes, como substâncias que reduzem a PA também estão presentes no extrato renal, vários autores não conseguiram reproduzir os resultados obtidos por Tingerstedt e Bergman e a renina acabou caindo em descrédito na comunidade científica (KRIEGER, EDUARDO M., 2013).

Em 1934, Goldblatt e colaboradores descreveram o desenvolvimento do primeiro modelo experimental de hipertensão a partir da constrição controlada da artéria renal. Utilizando um clipe de prata de forma a reduzir o lúmen da artéria renal de forma controlada, os autores demonstraram que a isquemia renal, na ausência de doença renal aparente, aumentava a pressão arterial (PA) de cachorros (GOLDBLATT *et al.*, 1934). A descoberta de Goldblatt e colaboradores despertou grande interesse nos cientistas para investigar o papel dos rins na hipertensão e, diversos cientistas, começaram a estudar as substâncias vasoconstritoras produzidas pelos rins (KRIEGER, EDUARDO M., 2013).

Em 1940, Page e Helmer (PAGE; HELMER, 1940) extraíram a renina de extrato renal e observaram o efeito pressor prolongado dessa substância quando injetada em animais, efeito similar ao descrito por Tingerstedt e Bergman, em 1898, pouco mais de 40 anos antes (MARKS; MAXWELL, 1979), ao injetar extrato de rim de coelhos em outros coelhos. Eles ainda constataram que, apesar dessa substância ser muito ativa quando injetada em animais, não produzia vasoconstrição quando perfundida em preparações utilizando a cauda de um cachorro

ou a orelha de um coelho. Entretanto, a ausência de efeito da renina nessas preparações podia ser revertida pela adição de uma substância similar a uma proteína e presente no plasma, a qual eles chamaram de ativador de renina. Em 1940, eles descreveram que essa substância era, na verdade, o substrato no qual a renina agia e formava então um produto, o qual foi chamado de angiotonina (PAGE; HELMER, 1940). Nesse mesmo ano, Braun-Menendez e colaboradores, a partir de experimentos independentes aos realizados pelo grupo de Page, induziram isquemia renal em cachorros e coletaram o sangue venoso proveniente da veia renal, para o qual eles demonstraram um efeito pressor e vasoconstritor. Em seguida, eles extraíram uma substância do sangue coletado da veia renal e quando essa substância foi injetada em outro animal, o mesmo efeito foi observado. Eles ainda descreveram que essa substância, chamada por eles de hipertensina, também poderia ser formada *in vitro* quando proteínas sanguíneas eram incubadas com renina (BRAUN-MENENDEZ *et al.*, 1940). Já em 1951, Skeggs e colaboradores descreveram um método para a extração da hipertensina do sangue da veia renal a partir da utilização de um rim artificial e mostraram que a quantidade extraída de hipertensina era maior em cachorros com hipertensão renovascular em relação à quantidade obtida de cachorros normotensos (SKEGGS; KAHN; SHUMWAY, 1951). Três anos mais tarde, em 1954, o mesmo grupo percebeu que, na verdade, quando se incubava renina com o seu substrato ocorre a formação de duas substâncias pressoras, inicialmente a hipertensina I, que é rapidamente convertida em hipertensina II, possivelmente pela ação de uma enzima no plasma, chamada por esse grupo de enzima conversora de hipertensina (SKEGGS *et al.*, 1954). Em 1958, os grupos de Page e Braun-Menendez se reuniram e definiram uma nomenclatura padrão para referir à substância isolada por ambos os grupos, a qual foi chamada então de angiotensina. Eles ainda sugeriram que o ativador de renina passasse a ser chamado de angiotensinogênio e a enzima renina passasse a ser chamada de angiotensinase (BRAUN-MENENDEZ; PAGE, 1958).

Onze anos após a descoberta da enzima conversora de angiotensina (ECA), em 1965, Ferreira identificou uma família de peptídeos, o fator potenciador da bradicinina (BPF, sigla em inglês, de Bradykinin-Potentiating Factor) (FERREIRA, 1965), que possuía como efeito biológico a capacidade de potencializar os efeitos da bradicinina, peptídeo descoberto pelo grupo do professor Maurício Rocha e Silva em 1949 (ROCHA E SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949). Em 1970, Ferreira e colaboradores evidenciaram que os peptídeos que constituíam o BPF inibiam também a enzima conversora de angiotensina (FERREIRA *et al.*, 1970). Um ano após, Krieger e colaboradores (KRIEGER; SALGADO; ASSAN, 1971) demonstraram que o BPF era capaz de reverter a hipertensão arterial de animais com hipertensão renovascular e hiperatividade do SRA. Além disso, os autores mostraram também

que a administração do BPF era capaz de prevenir os efeitos observados com a administração de angiotensina I (Ang I), não revertendo os efeitos da administração de angiotensina II (Ang II). Em 1977, foi então sintetizada a molécula do captopril, primeiro inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) (CUSHMAN *et al.*, 1977). Pouco antes, em 1970, foram ainda identificados os receptores da Ang II (LIN; GOODFRIEND, 1970) e, em 1993, um antagonista para os receptores tipo I da Ang II (AT₁) (TIMMERMANS *et al.*, 1993). Os inibidores da ECA e os antagonistas do receptor AT₁ estão entre as drogas mais utilizadas no tratamento da hipertensão e de outras doenças cardiovasculares (KRIEGER, EDUARDO M., 2013).

Atualmente, sabe-se que o SRA é um sistema hormonal com características endócrinas, parácrinas e autócrinas que exerce um papel importante na homeostase cardiovascular e no equilíbrio hidroeletrólítico (FRAGA-SILVA; FERREIRA; SANTOS, 2013). Na visão clássica do SRA, a enzima renina, produzida nos rins, hidrolisa o seu substrato angiotensinogênio, produzido no fígado, formando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I), que é hidrolisado pela ECA, localizada na superfície do endotélio vascular, produzindo então o peptídeo biologicamente ativo Ang II (CAREY, 2013). Este octapeptídeo atua via seu receptor AT₁ para produzir diferentes respostas fisiológicas, como a vasoconstrição, a reabsorção renal de sódio (Na⁺), a proliferação celular, a desdiferenciação, a secreção de aldosterona, o aumento da pressão arterial e contribui para o desenvolvimento de hipertensão arterial (CAREY, 2013). A Ang II também pode se ligar aos receptores tipo II da Ang II (AT₂), produzindo normalmente efeitos opostos aos previamente mencionados com relação à sua ligação ao receptor AT₁, como vasodilatação e efeitos anti-fibróticos, anti-hipertróficos e anti-proliferativos (ETELVINO; PELUSO; SANTOS, 2014; FOULQUIER; STECKELINGS; UNGER, 2012).

Nos últimos anos, novos peptídeos, enzimas e receptores com atividade biológica têm sido descritos como componentes do SRA (Figura 1): a angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) (SANTOS, R. A. *et al.*, 1988) e seu receptor Mas (SANTOS, ROBSON A. S. *et al.*, 2003), a angiotensina-(1-12) (Ang-(1-12)) (TRASK *et al.*, 2008), a prorenina, o receptor de prorenina/renina (PRR) (NGUYEN *et al.*, 2002), a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (DONOGHUE *et al.*, 2000), a angiotensina-(1-9) (Ang-(1-9)), a angiotensina A (Ang A) (JANKOWSKI *et al.*, 2007), e mais recentemente a alamandina e seu receptor MrgD (LAUTNER *et al.*, 2013). Com a evolução do conhecimento sobre o papel fisiológico do SRA, atualmente aceita-se que esse seja composto por dois eixos: o eixo ECA-Ang II-AT₁, pressor, e cuja ativação inapropriada resulta em efeitos deletérios, e o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas,

1985) e outros mostraram que a Ang II não penetrava a barreira hematoencefálica (SCHELLING *et al.*, 1976; VOLICER; LOEW, 1971), o que ratificou a existência de um SRA local no SNC.

O primeiro componente do SRA a ser identificado no SNC foi a renina. Ganten e colaboradores (1971) localizaram e quantificaram a renina no núcleo caudado e mostraram que essa enzima não conseguia atravessar a barreira hematoencefálica, indicando que a enzima era produzida localmente (GANTEN, DETLEV *et al.*, 1971). Esses resultados foram corroborados em 1986 por Dzau e colaboradores, os quais mostraram que a sequência de mRNA da renina está presente, em pequenas quantidades, no SNC (DZAU *et al.*, 1986). Esses autores também identificaram que a sequência de mRNA do angiotensinogênio estava presente em grandes quantidades em todo o SNC, o que havia sido mostrado, um ano antes, por Ohkubo e colaboradores (OHKUBO *et al.*, 1986). Posteriormente, estudos mostraram também a presença da ECA (CHAI; MENDELSON; PAXINOS, 1987; ROGERSON *et al.*, 1995; STRITTMATTER *et al.*, 1984), da Ang II (PHILLIPS; STENSTROM, 1985) e seus receptores (SONG *et al.*, 1992; TSUTSUMI; SAAVEDRA, 1991) no SNC. Apesar da renina ser encontrada em pequenas quantidades no SNC, Nguyen e colaboradores (2002) identificaram o receptor de prorenina/renina (PRR) no SNC e mostraram que ele é expresso em grandes quantidades, sugerindo então uma via alternativa para a formação de Ang II no SNC (NGUYEN *et al.*, 2002). Sendo assim, foi constatada a existência de um SRA cerebral e muitos estudos foram realizados nos anos seguintes com o objetivo de se estudar o papel fisiológico desse sistema.

Em 1988, Santos e colaboradores publicaram um estudo no qual eles investigaram o metabolismo *in vitro* da Ang I marcada com radioisótopo em homogenatos de tronco encefálico de cachorros e evidenciaram que esse peptídeo era metabolizado em Ang II, mas que o principal produto do metabolismo da Ang I era o heptapeptídeo Ang-(1-7), tanto na presença quanto na ausência de um inibidor da ECA (SANTOS, R. A. *et al.*, 1988). Ainda em 1988, Schiavone e colaboradores demonstraram com um experimento que utiliza de uma preparação do tronco encefálico e neurohipófise que, assim como a Ang II, a Ang-(1-7) estimula a liberação de vasopressina pela neurohipófise (SCHIAVONE *et al.*, 1988) e Block e colaboradores (1988) mostraram que esse peptídeo estava presente em diversas estruturas do prosencéfalo, como os núcleos paraventricular (PVN), supraóptico (SO) e supraquiasmático (SCN) do hipotálamo, estria terminal, substância inominada, eminência medial e neurohipófise, sugerindo que a Ang-(1-7) atuasse como um neuromodulador (BLOCK *et al.*, 1988). No ano seguinte, Campagnole-

Santos e colaboradores (1989) ao injetar Ang-(1-7) no núcleo do trato solitário de ratos, observaram efeitos bradicárdico e depressor, similares aos reportados previamente para a Ang II (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1989). Iniciava-se então a descoberta de um novo peptídeo e uma nova era na pesquisa do SRA, na qual milhares de pesquisadores passaram a investigar o papel fisiológico desse peptídeo, o que acabou levando à descoberta de outros componentes do sistema e com a divisão didática do mesmo em dois eixos com papéis fisiológicos na maioria das vezes distintos.

Apenas em 2003, Santos e colaboradores descobriram o receptor a partir do qual a Ang-(1-7) exerce os seus efeitos, o receptor Mas. Nesse estudo, os autores utilizaram animais com deleção genética do receptor Mas e revelaram que a ausência desse receptor prevenia o efeito antidiurético da Ang-(1-7) após sobrecarga aguda de água em camundongos. Além disso, a Ang-(1-7) promoveu a liberação de ácido araquidônico em células transfectadas com o receptor Mas, não induzindo vasorelaxamento em anéis da artéria aorta de animais knockout para esse receptor (SANTOS, ROBSON A. S. *et al.*, 2003).

Apesar de alguns efeitos centrais reportados para a Ang-(1-7) serem similares aos efeitos da Ang II, os mecanismos pelos quais esses dois peptídeos exercem seus efeitos são diferentes (SANTOS, RA, 2014). Além disso, a Ang-(1-7) apresenta alguns efeitos centrais contrários aos observados para a Ang II, especialmente quando analisados os efeitos desses peptídeos no núcleo do trato solitário (NTS). Quando microinjetados nessa área do SNC, ambos os peptídeos produzem um efeito depressor (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1989). Entretanto, a Ang-(1-7) facilita o componente bradicárdico do barorreflexo, melhorando a sua sensibilidade, enquanto a Ang II atenua a sensibilidade do mesmo (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1992; COUTO *et al.*, 2002; ISA *et al.*, 2011). Corroborando esses resultados, Moura e colaboradores (2010) avaliaram a sensibilidade do barorreflexo em camundongos com deleção genética do receptor Mas e demonstraram que esses animais apresentam redução da sensibilidade do barorreflexo (DE MOURA *et al.*, 2010).

1.4. Sistema Renina-Angiotensina cerebral e hipertensão

Dentre os mecanismos relacionados à gênese e manutenção da hipertensão, a hiperatividade do sistema nervoso simpático ainda é um mecanismo relativamente pouco explorado. Diversos estudos têm encontrado uma interrelação entre o SRA cerebral e o sistema nervoso simpático, sendo que o aumento dos níveis de Ang II no SNC está associado com o aumento da atividade do sistema nervoso simpático. Um dos primeiros estudos a mostrar a relação entre a Ang II e o aumento da atividade do sistema nervoso simpático foi realizado por

Severs e colaboradores em 1966 (SEVERS *et al.*, 1966). Os autores injetaram Ang II (4 µg/h) no ventrículo lateral do cérebro de gatos e evidenciaram um aumento pronunciado da PA nesses animais. Eles tentaram então investigar qual era a origem desse efeito pressor a partir da injeção intravenosa de antagonistas dos receptores alfa- e beta-adrenérgicos e observaram uma grande atenuação do efeito pressor da Ang II, mostrando que esse peptídeo, quando injetado no SNC, aumenta a atividade do sistema nervoso simpático. Em 1969, Epstein, Fitzsimons e Simons injetaram Ang II no hipotálamo anterior, área pré-óptica e área septal de ratos e perceberam uma resposta dipsogênica nesses animais, concluindo que a Ang II tem um papel importante na regulação da sede (EPSTEIN; FITZSIMONS; SIMONS, 1969). No ano seguinte, Ferrario, Dickinson e McCubbin detectaram que a administração de Ang II na artéria vertebral de cachorros produzia aumento da PA, da FC, do DC e da RP, sugerindo que parte dos efeitos centrais da Ang II se devem a sua ação em alguma parte do rombencéfalo (FERRARIO; DICKINSON; MCCUBBIN, 1970). Posteriormente, vários estudos foram realizados com o objetivo de entender melhor o papel fisiológico do SRA cerebral, mostrando que esse sistema exerce um papel modulatório do sistema cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico a partir da modulação do sistema nervoso autônomo, do eixo hipotálamo-hipófise, da liberação de vasopressina, da sensibilidade do barorreflexo e da regulação da sede e do apetite ao sal (AGUILERA; KISS, 1996; AVERILL; DIZ, 2000; BADER, MICHAEL, 2010; DIBONA, 1999; FINK, 1997; FITZSIMONS, 1998; PAUL; POYAN MEHR; KREUTZ, 2006).

Além dos estudos que constataram que o aumento dos níveis de Ang II a curto prazo no cérebro induz aumento da atividade do sistema nervoso simpático, diversos outros estudos mostraram que animais hipertensos com hiperatividade do SRA cerebral apresentam aumento da atividade do sistema nervoso simpático. O nosso grupo mostrou que animais hipertensos DOCA-Sal (GUIMARAES *et al.*, 2012) e TGR(mREN2)27 (KANGUSSU *et al.*, 2015) apresentam aumento do tônus simpático para o coração. Takeda e Buñag (1980) já haviam observado também que ratos hipertensos DOCA-Sal apresentavam aumento da frequência basal de disparos nos nervos simpáticos abdominais (TAKEDA; BUÑAG, 1980). Cabassi e colaboradores (2002) identificaram que os níveis de norepinefrina e atividade da tirosina hidroxilase estão aumentados nos músculos esqueléticos e no tecido adiposo subcutâneo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com diferentes idades, sugerindo um aumento da atividade do sistema nervoso simpático nesses animais até mesmo em órgãos não relacionados ao sistema cardiovascular (CABASSI *et al.*, 2002). O grupo do Prof. Zucker mostrou ainda que ratos Sprague-Dawley (SD) que receberam a infusão intracerebroventricular (ICV) de Ang

II por 12 dias desenvolvem hipertensão, com redução na sensibilidade do barorreflexo para o coração e para o rim e aumento da atividade simpática renal (BECKER; WANG; ZUCKER, 2017). Por outro lado, o nosso grupo demonstrou que ratos com depleção de angiotensinogênio no cérebro apresentam melhor sensibilidade do barorreflexo, redução da atividade simpática renal, assim como aumento do tônus vagal e redução do tônus simpático para o coração (CALIGIORNE *et al.*, 2008).

Outras evidências experimentais da hiperatividade do SRA cerebral em animais hipertensos ganharam vida a partir de estudos que utilizaram do bloqueio farmacológico de componentes do SRA cerebral para elucidar as suas funções. Nesse sentido, Ganten, Hutchinson e Schelling (1975) observaram que a administração ICV aguda de Ang II aumentava a PA de animais normotensos. Além disso, as concentrações de Ang II no líquido cerebrospinal eram maiores em animais hipertensos e a administração de um antagonista do receptor AT_1 , o P113, reduzia a PA de animais hipertensos sem alterar a PA de animais normotensos (GANTEN, D.; HUTCHINSON; SCHELLING, 1975). Hutchinson e colaboradores, em 1980, identificaram que uma única injeção ICV de captopril reduzia a PA de ratos SHR por algumas horas, mas não alterava a PA de animais normotensos (HUTCHINSON; MENDELSON; DOYLE, 1980). Um ano após, Suzuki e colaboradores observaram redução da pressão arterial em ratos com hipertensão renovascular (2 Rins 1 Clipe, 2R1C) e espontaneamente hipertensos (SHR) após a injeção ICV de saralasin, antagonista do receptor AT_1 , e captopril, inibidor da ECA (SUZUKI *et al.*, 1981). Além disso, após a injeção de sarthran, antagonista do receptor AT_1 , houve redução da PA (JENSEN; HARDING; WRIGHT, 1988) e melhora da sensibilidade do barorreflexo (BERECEK; ROBERTSON; THORSTAD, 1991) em ratos SHR. Esses dados sugeriram que animais hipertensos apresentavam um aumento da atividade do SRA cerebral, o qual estaria intimamente relacionado com a manutenção dos níveis aumentados de PA. Corroborando esses dados, em 1982, Weyhenmeyer e Phillips mostraram a distribuição de Ang II no cérebro de ratos SHR e seus controles, ratos normotensos Wistar Kyoto, sendo a imunoreatividade à Ang II muito maior no cérebro de ratos SHR. Os maiores níveis de Ang II foram encontrados em áreas do SNC responsáveis pelo controle cardiovascular, como o PVN e outros núcleos do hipotálamo, núcleo do trato solitário (NTS) e a formação reticular (WEYHENMEYER; PHILLIPS, 1982). Park e Leenen (2001) também investigaram o efeito da injeção ICV de losartan, antagonista seletivo do receptor AT_1 , em ratos após duas e quatro semanas de indução de hipertensão DOCA-Sal, e detectaram que o tratamento com losartan normalizou a PA de ambos os grupos após 18 e 24 h de tratamento (PARK; LEEN, 2001). Nosso grupo mostrou também que a infusão ICV de outro antagonista

do receptor AT₁, o Dup753, em ratos SHR, melhorou a sensibilidade do barorreflexo após 1 e 3 horas de infusão (OLIVEIRA, DJENANE R. *et al.*, 1996).

A partir da informação de que a injeção ICV de captopril reduz a PA de animais hipertensos, alguns estudos investigaram os efeitos da infusão crônica de captopril na PA de animais hipertensos. Nesse contexto, Okuno e colaboradores, em 1983, identificaram que a infusão ICV crônica de captopril em ratos SHR com sete semanas de idade atenuava o desenvolvimento de hipertensão nesses animais, sendo a PA dos animais tratados com captopril aproximadamente 24 mmHg inferior à dos animais que receberam a infusão de veículo (OKUNO *et al.*, 1983). Alguns anos mais tarde, em 1995, Moriguchi e colaboradores, ao administrar anticorpos específicos contra a Ang II no SNC de ratos TGR(mREN2)27, mostraram que o bloqueio das ações da Ang II produzia hipotensão e bradicardia (MORIGUCHI *et al.*, 1995).

Os avanços das técnicas de biologia molecular nas últimas décadas também ajudaram substancialmente na elucidação do papel do SRA cerebral a partir da geração de animais geneticamente modificados que apresentam aumento ou redução da expressão de componentes do SRA (ALENINA *et al.*, 2008; BADER, M. *et al.*, 2000). Em 1990, o grupo do Prof. Ganten desenvolveu uma linhagem de ratos transgênicos hipertensos com superexpressão de renina de camundongo a partir da adição do gene Ren-2, de camundongos, ao genótipo do rato. Entretanto, os autores mostraram que esses animais apresentavam o SRA circulante e o SRA renal suprimidos, o que sugeriu envolvimento do SRA em outros tecidos na patogênese da hipertensão arterial nesses animais (MULLINS; PETERS; GANTEN, 1990). Pouco mais tarde, o mesmo grupo descobriu que o gene Ren-2 também estava expresso, antes mesmo do desenvolvimento da hipertensão (ZHAO *et al.*, 1993), em outros órgãos relacionados ao controle cardiovascular, entre eles, o cérebro (BADER, M. *et al.*, 1992), o que sugere uma relação causal com o desenvolvimento de hipertensão nesses animais. Senanayake e colaboradores (1994) evidenciaram ainda que os níveis de Ang II estão aumentados no hipotálamo, bulbo e córtex, indicando a hiperatividade do SRA cerebral nesses animais (SENANAYAKE *et al.*, 1994). Além disso, Szczepańska-Sadowska e colaboradores observaram, a partir do bloqueio central dos receptores V₁ de vasopressina, redução da PA, sugerindo aumento da atividade do sistema vasopressinérgico nesses animais (SZCZEPAŃSKA-SADOWSKA *et al.*, 1998). Allen (2001) mostrou ainda que o bloqueio do receptor AT₁ no bulbo ventrolateral rostral (RVLM) reduz a ativação do nervo simpático

lombar desses animais (ALLEN, 2001), o que revela uma evidente interação entre o SRA e o sistema nervoso simpático em animais hipertensos.

Por outro lado, o grupo do Prof. Michael Bader desenvolveu, em 1999, a partir da utilização de uma sequência antisense para o angiotensinogênio e o promotor de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) humano, ratos transgênicos com deficiência de angiotensinogênio especificamente no cérebro, o modelo TGR(ASrAOGEN) (SCHINKE *et al.*, 1999). Nesse estudo, o grupo identificou que esses animais apresentam reduzida resposta de ingestão de água após a administração ICV de renina, níveis reduzidos de PA e uma síndrome similar ao diabetes insipidus, marcada por poliúria, redução da osmolaridade da urina e redução dos níveis plasmáticos de vasopressina. Um ano após, Baltatu e colaboradores (2000) provaram, a partir da infusão subcutânea de Ang II em dose subpressora por 7 dias, que a resposta hipertensiva e hipertrófica da Ang II são mediados em parte pelo SRA cerebral, uma vez que animais com deficiência de angiotensinogênio no cérebro apresentaram resposta hipertensiva e hipertrófica mais brandas em relação às respostas apresentadas por ratos SD (BALTATU *et al.*, 2000). Um ano mais tarde, o mesmo grupo revelou ainda que esses animais são protegidos da inversão da acrofase da pressão arterial sistólica (PAS) observada após 7 dias de infusão subcutânea de Ang II em ratos SD, apresentando ainda maior variabilidade da frequência cardíaca e sensibilidade do barorreflexo, o que sugere melhor balanço simpato-vagal para o coração (BALTATU *et al.*, 2001).

Ainda dentre os estudos que reduziram a atividade do eixo clássico do SRA cerebral, Li e colaboradores (2012), mais recentemente, reduziram a expressão de PRR especificamente no cérebro e encontraram redução da PA, atenuação da disfunção do barorreflexo, redução do tônus simpático para o coração e vasos e aumento do tônus vagal para o coração de camundongos hipertensos RA, provando a importância do PRR para a ativação não-proteolítica da prorenina e a formação de Ang II no cérebro (LI, WENCHENG *et al.*, 2012). Dois anos depois, o mesmo grupo demonstrou que, a deleção genética do PRR apenas em neurônios, previne o desenvolvimento de hipertensão DOCA-Sal em camundongos (LI, W. *et al.*, 2014). Além disso, o grupo do Prof. Lazartigues constatou que a deleção genética do receptor AT₁ apenas em neurônios previne o desenvolvimento de hipertensão DOCA-Sal, melhora a sensibilidade do barorreflexo, reduz o tônus simpático para o coração e vasos, normaliza o tônus parassimpático para o coração e reduz a atividade de ADAM17 e aumenta a atividade e expressão de ECA2 no hipotálamo desses animais. Em seguida, a partir da indução de hipertensão em camundongos com a infusão crônica de norepinefrina, os autores ratificaram que esses animais não apresentam aumento da atividade de ADAM17 e redução da atividade

de ECA2 no hipotálamo, o que corrobora que essas alterações sejam provenientes da hiperatividade do SRA cerebral (XU *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm mostrado também que o aumento da atividade do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas no SNC de animais hipertensos apresenta efeitos protetores para o sistema cardiovascular (BRITTO *et al.*, 1997; GUIMARAES *et al.*, 2012; HERINGER-WALTHER *et al.*, 2001; KANGUSSU *et al.*, 2015). O nosso grupo identificou que a melhora da sensibilidade do barorreflexo promovida pela inibição da ECA se deve em parte pelo aumento dos níveis endógenos de Ang-(1-7) no SNC de ratos SHR (HERINGER-WALTHER *et al.*, 2001) e de ratos com hipertensão renovascular (BRITTO *et al.*, 1997). O nosso grupo verificou também que a infusão ICV de Ang-(1-7) por 14 dias reduz a PA, melhora a sensibilidade do barorreflexo e o balanço simpato-vagal para o coração de animais hipertensos DOCA-Sal (GUIMARAES *et al.*, 2012) e TGR(mREN2)27 (KANGUSSU *et al.*, 2015), normalizando a atividade do nervo simpático renal nos primeiros e atenuando a hipertrofia cardíaca e a deposição de matriz extracelular no ventrículo esquerdo do coração (VE) dos últimos. Por outro lado, Jiang e colaboradores (2013) mostraram que a infusão ICV de Ang-(1-7) por 4 semanas não reduziu a PA de ratos SHR. Entretanto, os animais tratados com Ang-(1-7) apresentaram redução do estresse oxidativo e apoptose neuronal no SNC (JIANG, TENG; GAO; SHI; *et al.*, 2013). Em outro estudo, o mesmo grupo mostrou que o tratamento com Ang-(1-7) reduz a atividade autofágica observada no cérebro de ratos SHR, sendo esse efeito independente de alterações na PA desses animais (JIANG, TENG; GAO; ZHU; *et al.*, 2013).

O papel da ECA2 no controle central da PA também tem sido muito explorado. O grupo do Prof. Lazartigues mostrou que a infusão ICV crônica de losartan em camundongos hipertensos que superexpressam renina e angiotensinogênio humanos (RA) reduz a PA e melhora a sensibilidade do barorreflexo nesses animais. Além disso, eles observaram que a atividade da ECA2 no cérebro dos camundongos RA estava muito reduzida e o tratamento com losartan aumentou a atividade dessa enzima. Então, a partir do cruzamento de camundongos RA e camundongos com superexpressão de ECA2 apenas em neurônios (SA), eles comprovaram que os animais com superexpressão dos três componentes do SRA (angiotensinogênio, renina e ECA2) apresentam redução da PA, melhora da sensibilidade do barorreflexo e redução do tônus simpático e aumento do tônus parassimpático para o coração em relação a camundongos RA (XIA *et al.*, 2009), constatando então a importância da ECA2 no controle central da PA. Alguns anos mais tarde, esse mesmo grupo mostrou que camundongos SA, quando submetidos à hipertensão DOCA-Sal, apresentam uma atenuação

dos níveis de PA, normalização da sensibilidade do barorreflexo, redução do tônus simpático para o coração e vasos e aumento do tônus parassimpático para o coração. Além disso, esses animais apresentaram redução dos níveis de Ang II no hipotálamo, no plasma e na urina, redução ou normalização da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α , melhora no balanço da atividade do SRA cerebral e redução da atividade e expressão de ADAM17, o que sugeriu que o aumento de ECA2 previne a hiperatividade do SRA observada em camundongos DOCA-Sal e reduz o corte (shedding) de ECA2 da membrana celular promovido pela ADAM17. Finalmente, a redução da expressão de ADAM17 a partir da tecnologia de ‘small interfering RNA’ (siRNA) em camundongos DOCA-Sal atenua a hipertensão, melhora a sensibilidade do barorreflexo e aumenta a atividade de ECA2 nesses animais (XIA *et al.*, 2013). No ano passado, o mesmo grupo observou que a atividade de ECA2 solúvel e os níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no líquido cerebrospinal estão aumentados em indivíduos com hipertensão não controlada e o controle adequado da PA normaliza a atividade de ECA2 e os níveis de TNF- α no líquido cerebrospinal, o que sugere que os indivíduos com hipertensão não controlada apresentam hiperatividade do SRA cerebral, aumento da atividade de ADAM17 e aumento do corte da ECA2 da membrana plasmática das células (XU *et al.*, 2017).

1.5. Alamandina

A alamandina é um heptapeptídeo (Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro) do SRA descoberto e caracterizado por nosso grupo em 2013 (LAUTNER *et al.*, 2013). A estrutura da alamandina é muito similar em relação à estrutura da Ang-(1-7) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro). A única diferença na estrutura dos dois peptídeos é que a alamandina possui como seu primeiro aminoácido no N-terminal um resíduo de alanina (Ala), enquanto a Ang-(1-7) possui um resíduo de aspartato (Asp) nessa localização. A alamandina pode ser formada a partir da remoção de um resíduo de fenilalanina do C-terminal da Ang A (Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) pela ECA2 ou pela descarboxilação do resíduo de aspartato no amino-terminal da Ang-(1-7) por uma enzima ainda desconhecida, sendo a alamandina um peptídeo endógeno no coração de ratos e no plasma de seres humanos. Além disso, a alamandina pode ser formada no coração de ratos a partir da perfusão desse tecido com a Ang-(1-7), o que indica que esse tecido possui todos os componentes necessários para promover a descarboxilação do resíduo de aspartato desse peptídeo (LAUTNER *et al.*, 2013). Além disso, a alamandina foi identificada no plasma de seres humanos, sendo que indivíduos com nefropatia apresentam aumento da concentração plasmática de alamandina. Nesse estudo, nosso grupo demonstrou também que a alamandina

possui ações biológicas semelhantes às da Ang-(1-7), como o vasorelaxamento dependente do endotélio, efeito pressor e depressor quando microinjetada no bulbo ventrolateral rostral (RVLM) e no bulbo ventrolateral caudal (CVLM), respectivamente, efeito hipotensivo de longo prazo após a administração de dose única via oral em ratos SHR e redução na deposição de matriz extracelular no coração de ratos Wistar tratados com isoproterenol. É importante destacar que o vasorelaxamento dependente do endotélio e os efeitos pressor e depressor após microinjeção na RVLM e CVLM promovidos pela alamandina não foram prevenidos pela administração de A779, antagonista seletivo do receptor Mas, o que mostrou que os efeitos da alamandina não se devem por sua ação nesse receptor, e sim por sua ligação ao receptor MrgD (LAUTNER *et al.*, 2013).

Outros estudos têm sido realizados com o objetivo de investigar os efeitos da alamandina sobre a regulação da PA. Hekmat e colaboradores (2017) investigaram o efeito da infusão intravenosa (i.v.) de alamandina sobre a PA de animais com hipertensão renovascular (2R1C) e de animais normotensos e observaram um efeito bifásico do peptídeo sobre a PA dos animais hipertensos: houve um breve aumento da PA seguido por redução da PA até o término da infusão do peptídeo. Em seguida, eles realizaram a infusão concomitante de alamandina com losartan e identificaram que o efeito pressor inicial promovido pela alamandina era prevenido com a administração do antagonista, o que sugere que esse efeito se deve à ligação da alamandina ao receptor AT₁. Eles realizaram também a infusão concomitante de alamandina e PD123319, antagonista dos receptores AT₂ e MrgD, e observaram que o efeito depressor observado após a administração de alamandina foi parcialmente revertido, o que sugere que esse efeito tenha sido causado pela ligação da alamandina aos receptores sensíveis a esse antagonista. Além disso, a infusão de alamandina apresentou apenas a resposta pressora em animais normotensos, sendo esse efeito causado pela ligação desse peptídeo ao receptor AT₁ (SOLTANI HEKMAT *et al.*, 2017). Soares e colaboradores (2017) investigaram o efeito da microinjeção de três doses de alamandina (4, 40 e 140 pmol) no bulbo ventrolateral caudal (CVLM) de ratos com hipertensão renovascular (2R1C) e evidenciaram redução na PA desses animais após a administração das duas primeiras doses. Esse efeito não foi revertido com a administração de A779 ou losartan, mas com a administração de PD123319, mostrando que, apesar de os efeitos biológicos da microinjeção de Ang-(1-7) e alamandina serem similares, os mecanismos pelos quais os dois peptídeos agem no SNC são diferentes (SOARES *et al.*, 2017). Shen e colaboradores (2018) investigaram o efeito da microinjeção de alamandina (4, 40 e 400 pmol) no PVN sobre a PA e a atividade simpática renal de ratos Wistar e SHR e observaram

um pequeno aumento da PA e da atividade simpática renal nesses animais, sendo o efeito mais pronunciado nos animais hipertensos (SHEN, YI-HUI *et al.*, 2018).

Outros estudos investigaram os efeitos biológicos da alamandina no contexto da disfunção vascular e da hipertrofia de cardiomiócitos. Qaradakhli e colaboradores (2017) investigaram os efeitos da alamandina na disfunção vascular promovida pela hiperhomocisteinemia. Para isso, eles isolaram anéis da porção abdominal da artéria aorta de coelhos e utilizaram de soluções com diferentes concentrações de homocisteína para induzir a disfunção vascular. Os anéis de aorta foram então pré-incubados com alamandina ou alamandina e um inibidor específico da proteína cinase dependente de AMPc (PKA), seguido pela incubação dos anéis com acetilcolina (Ach). A incubação dos anéis de aorta com a solução de homocisteína foi capaz de abolir a vasodilatação após incubação com Ach. A pré-incubação dos anéis de aorta com alamandina foi capaz de reverter a disfunção vascular causada pela hiperhomocisteinemia e, a pré-incubação desses anéis com alamandina e o inibidor da PKA, aboliu completamente o efeito da alamandina, o que indica que o efeito desse peptídeo é dependente de sua ação na via da PKA (QARADAKHI *et al.*, 2017). Jesus e colaboradores (2018) investigaram o efeito da alamandina na hipertrofia de cardiomiócitos induzida pela Ang II e observaram que o tratamento com alamandina foi capaz de prevenir o aumento do diâmetro do cardiomiócito induzido pela Ang II, sendo esse efeito causado pela ação da alamandina no receptor MrgD e dependente da sinalização de AMPK/NO (DE JESUS *et al.*, 2018).|

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Estima-se que as doenças cardiovasculares causem aproximadamente 17 milhões de mortes por ano no mundo, o que representa cerca de um terço do total. Apenas as complicações decorrentes da HA, por sua vez, são responsáveis por aproximadamente 9,4 milhões dessas mortes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). É importante ressaltar que a hipertensão é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004). Considerando a alta morbimortalidade relacionada à hipertensão, estudos que visem esclarecer mecanismos fisiopatológicos, bem como identificar novos alvos terapêuticos para seu tratamento são necessários.

Dentre os mecanismos envolvidos na gênese e manutenção da HA, destaca-se a hiperatividade do sistema renina angiotensina (SRA) circulante e tecidual (FRAGA-SILVA; FERREIRA; SANTOS, 2013), ou seja, o aumento dos níveis de Ang II na circulação e nos tecidos. Classicamente, o SRA é descrito como uma cascata enzimática que se inicia com a enzima renina, produzida pelos rins, clivando o angiotensinogênio, uma proteína produzida no fígado, e formando o decapeptídeo Ang I. A Ang I é então hidrolisada pela ECA, uma dicarboxipeptidase presente especialmente nas células do endotélio pulmonar, levando à formação do octapeptídeo Ang II, o qual age via receptor AT_1 e induz diversos efeitos deletérios, como o aumento na retenção de sódio e fibrose nos rins, o aumento da liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais, o aumento do inotropismo e cronotropismo, hipertrofia e fibrose no coração, aumento da constrição, hipertrofia e fibrose nos vasos e, no SNC, leva a um aumento da sede, do apetite ao sal, da atividade do sistema nervoso simpático e da liberação de vasopressina (BADER, 2010).

O sucesso dos fármacos que interferem no SRA para o tratamento das doenças cardiovasculares e hipertensão arterial, como os inibidores da ECA e os antagonistas dos receptores AT_1 , indica a importância deste sistema para a fisiopatologia destas doenças (ESLER, 2010). No entanto, apesar do tratamento da hipertensão ter avançado muito nas últimas décadas, sua prevalência tem aumentado e aproximadamente 20% dos indivíduos possuem uma condição chamada hipertensão resistente (FISHER, J. P.; PATON, 2012), e não respondem bem à terapêutica disponível atualmente. Isso confirma mais uma vez que a etiologia da hipertensão arterial é multifatorial e que o controle mais adequado deve considerar estratégias que modulem diferentes sistemas de controle da PA, alguns deles ainda pouco explorados cientificamente. Dentre esses sistemas, a hiperatividade do sistema nervoso

simpático está presente em pelo menos 50% dos casos de hipertensão essencial (ESLER, 2010). O componente neurogênico da hipertensão e a atividade do SRA estão intrinsecamente e reciprocamente ligados (FISHER, J. P.; PATON, 2012). Todos os componentes necessários para se produzir os diversos componentes do SRA, inclusive a Ang II, são expressos em vários tecidos, incluindo o sistema nervoso central (SNC) (BADER; GANTEN, 2002; BADER, 2010; BADER; GANTEN, 2008; PAUL; POYAN; KREUTZ, 2006).

Nos últimos anos, novos peptídeos, enzimas e receptores com atividade biológica foram descritos, adicionando maior complexidade ao SRA. Entre os novos componentes estão a Ang-(1-12) (TRASK *et al.*, 2008), o receptor da prorenina-renina (NGUYEN *et al.*, 2002), a ECA2 (DONOGHUE *et al.*, 2000), a Ang-(1-9), a Ang-(1-7) (SANTOS, R. A. *et al.*, 1988), o receptor Mas (SANTOS, ROBSON A. S. *et al.*, 2003), a angiotensina A (JANKOWSKI *et al.*, 2007) e, mais recentemente, a alamandina e o receptor MrgD (LAUTNER *et al.*, 2013), através do qual a alamandina desempenha as ações descritas até o momento (ETELVINO; PELUSO; SANTOS, 2014). Atualmente, está bem estabelecido que o SRA atua através de dois eixos principais: ECA-Ang II-AT₁, pressor, cuja hiperatividade resulta em efeitos deletérios, e o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas, cujos efeitos biológicos contrabalançam os do primeiro eixo, sendo por isso considerada uma via protetora do sistema (BADER, MICHAEL, 2010; ETELVINO; PELUSO; SANTOS, 2014; FRAGA-SILVA; FERREIRA; SANTOS, 2013; SANTOS, RA, 2014). Estudos recentes mostraram que o aumento dos níveis de Ang-(1-7) (GUIMARAES *et al.*, 2012; KANGUSSU *et al.*, 2015) no SNC apresentam efeitos benéficos no controle da PA, no equilíbrio simpato-vagal para o coração, melhora da sensibilidade do barorreflexo e da disfunção cardíaca em animais hipertensos ou com síndrome metabólica. Esses dados indicam a necessidade de se compreender melhor as funções do SRA cerebral.

A alamandina [Ala¹-Ang-(1-7)] foi caracterizada pelo nosso grupo recentemente como um novo componente do SRA (LAUTNER *et al.*, 2013). A alamandina está presente no plasma de ratos e seres humanos e no coração de ratos e apresenta estrutura muito similar à da Ang-(1-7), diferindo apenas pela presença de um resíduo de alanina ao invés de um resíduo de aspartato na extremidade amino-terminal (Figura 1). As ações descritas até o momento para a alamandina são similares às da Ang-(1-7): *i*) relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos e ratos; *ii*) ativação de áreas cerebrais (bulbo ventrolateral caudal-CVLM e bulbo ventrolateral rostral-RVLM); *iii*) melhora da sensibilidade do barorreflexo em ratos normotensos após infusão ICV de alamandina; e *iv*) efeitos cardioprotetores e redução da pressão arterial após administração oral em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Os

resultados indicam que estes efeitos são mediados pelo receptor MrgD (LAUTNER *et al.*, 2013; VILLELA; PASSOS-SILVA; SANTOS, 2014).

Em estudo em andamento em nosso laboratório, Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA, ALINE C *et al.*, 2015) mostraram que o receptor MrgD está presente em diversas áreas do SNC relacionadas ao controle cardiovascular, assim como em outras células do organismo, como células endoteliais, células da musculatura lisa de aorta e em cardiomiócitos. Ainda não está esclarecido qual enzima poderia formar a alamandina com maior eficiência, no entanto, várias descarboxilases presentes nos diferentes tecidos, poderiam converter o aspartato em alanina. A possibilidade de formação da alamandina e a presença de MrgD no cérebro, determinam a necessidade de caracterização dos efeitos desencadeados pela alamandina no SNC, não apenas para ampliar o conhecimento no que diz respeito a interação SRA-SNC, mas também para que se possa desenvolver novas estratégias terapêuticas para o combate mais efetivo da hipertensão arterial e das doenças cardiovasculares, especialmente quando considerados os casos resistentes ou de origem neurogênica.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos do aumento dos níveis cerebrais de alamandina sobre os parâmetros cardiovasculares, o coração, o rim e o cérebro de animais hipertensos.

3.2. Estratégias Experimentais

3.2.1. Avaliar os efeitos da infusão ICV de alamandina por curto prazo sobre a PA e a sensibilidade do barorreflexo de ratos hipertensos transgênicos, TGR(mREN2)27.

3.2.2. Avaliar o efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo em animais hipertensos, TGR(mREN2)27, com diferentes idades no início do tratamento.

3.2.3. Investigar os efeitos da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o padrão de lesões em órgãos-alvo (coração e rim) promovidas pelo aumento crônico da PA em animais hipertensos, TGR(mREN2)27.

3.2.4. Avaliar os efeitos do aumento dos níveis de alamandina sobre o cérebro de animais hipertensos, TGR(mREN2)27.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos transgênicos TGR(mRen2)²⁷ heterozigotos (TG) e ratos Sprague-Dawley (SD) machos, com 8 a 15 semanas, e camundongos C57BL6/J wild type (WT) e com deleção genética do receptor MrgD (MrgD-KO) provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão, ICB, UFMG. Todos os animais foram mantidos em micro-isoladores sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação (ciclo claro-escuro de 12/12 horas) e com livre acesso à ração apropriada e água filtrada. Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelo CEUA/UFMG sob protocolo 139/2016.

4.2. Cirurgia estereotáxica para infusão ICV de alamandina

Para a canulação do ventrículo lateral, 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/100 g). Em seguida, foi realizada a tricotomia da região dorsal da cabeça e o animal foi posicionado em decúbito ventral, com a cabeça fixa ao aparelho estereotáxico (David Kopf, Los Angeles, CA, EUA) por meio das barras auriculares do equipamento e com os dentes fixos a - 5,0 mm em relação a linha interaural. Após assepsia com álcool iodado 0,01% e injeção subcutânea de lidocaína com epinefrina (Xylestesin, Cristália, 0,2 mL) na região dorsal da cabeça do animal, os ossos parietais foram expostos através de pequena incisão na pele para a visualização do bregma, o ponto de referência utilizado para a canulação do ventrículo lateral (VL) do cérebro. A cânula ICV foi então introduzida no VL direito, através de uma perfuração vertical no osso parietal utilizando as seguintes coordenadas: 1,5 mm lateral; 1,0 mm posterior ao bregma e 4,5 mm de profundidade (Paxinos e Watson, 2007). Antes da inserção da cânula ICV, dois microparafusos foram fixados nos quadrantes anterior e posterior esquerdo do crânio. Para o grupo de animais a partir do qual foram avaliados os efeitos da infusão de longo prazo, o tecido subcutâneo interescapular do animal foi ainda divulsionado para acomodação da bomba osmótica (infusão de longo prazo). O conjunto cânula-microparafuso-osso parietal foi coberto com cimento e resina ortodôntica para garantir uma boa fixação. A incisão da pele foi então suturada.

4.3. Infusão ICV de alamandina por curto prazo

Para este estudo, foram utilizados ratos normotensos SD e hipertensos TGR(mRen2)27. O registro da PA procedeu-se após 4 a 7 dias da cirurgia estereotáxica. Inicialmente, foi realizado um registro basal da PA e da sensibilidade do barorreflexo e então foi realizada a infusão ICV de salina estéril ou alamandina (4 µg/h, 12 µL/h, por 90 min) a partir de uma seringa Hamilton® acoplada a uma bomba de infusão para seringas. Ao final da infusão ICV, realizou-se o registro da PA e nova avaliação da sensibilidade do barorreflexo.

4.4. Infusão ICV de alamandina por longo prazo

A infusão ICV de alamandina ou salina estéril por longo prazo (14 ou 28 dias) foi realizada a partir de mini-bombas osmóticas (ALZET® modelos 2002 e 2004) acopladas às cânulas ICV.

4.5. Avaliação dos efeitos cardiovasculares da alamandina

Para a avaliação dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por curto prazo em ratos SD e TG e para a avaliação dos efeitos cardiovasculares da infusão de alamandina por longo prazo em ratos hipertensos DOCA-Sal, foi utilizado um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados. Para avaliar os efeitos cardiovasculares da infusão de alamandina por longo prazo em ratos TG, foi utilizado o sistema de radiotelemetria (Data Sciences International™, New Brighton, MN, USA). O sistema de pletismografia de cauda foi utilizado para monitorar o desenvolvimento de hipertensão em ratos DOCA-Sal bem como para a divisão dos animais hipertensos entre grupos nos experimentos que avaliaram os efeitos da infusão de alamandina por longo prazo.

4.5.1. Transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados

Para a avaliação dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por curto prazo foi utilizado um transdutor de pressão acoplado a um amplificador de sinal e sistema de aquisição de dados (Biopac® Systems, Goleta, CA, USA). Para tal, foi realizada a canulação da artéria e da veia femoral para o registro da pressão arterial e injeção de drogas, respectivamente (GUIMARAES *et al.*, 2014).

4.5.1.1. Cirurgia para canulação da artéria e veia femoral

Inicialmente, os animais foram anestesiados utilizando-se uma mistura de Cetamina (80 mg/Kg) e Xilazina (8 mg/Kg) injetada por via intraperitoneal (0,1 mL/100g). Para a canulação da artéria e da veia femoral, foram utilizadas cânulas confeccionadas a partir da conexão de polietilenos PE50 e PE10 preenchidas com solução fisiológica e heparina (100 U.I./ 0,1mL).

Após o posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica, foi realizada tricotomia da região inguinal esquerda do animal e uma pequena incisão na pele (~ 1,0 cm). O feixe vâsculo-nervoso femoral foi então localizado e a artéria e a veia femoral cuidadosamente isoladas. Primeiramente, uma cânula foi introduzida na veia femoral para a posterior administração de fármacos. Em seguida, outra cânula foi introduzida na artéria aorta abdominal através da artéria femoral e utilizada para o registro dos parâmetros cardiovasculares. Após a canulação dos vasos, os cateteres foram então fixados e exteriorizados subcutaneamente, em direção ao dorso do animal, entre as duas escápulas. As incisões foram suturadas e os animais colocados em microisoladores individuais.

4.5.2. Sistema de radiotelemetria

4.5.2.1. Cirurgia para a implantação do probe do sistema de radiotelemetria

Após anestesia com uma mistura de Cetamina (80 mg/Kg) e Xilazina (8 mg/Kg) injetada por via intraperitoneal (0,1 mL/100 g), os animais foram posicionados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica e, após tricotomia e assepsia da região abdominal com álcool iodado 0,01% e colocação de um pano de campo cirúrgico sobre os animais, uma incisão longitudinal mediana de aproximadamente 5 cm foi realizada na pele e tecidos subjacentes. A utilização de duas gazes umedecidas com solução salina 0,9% estéril permitiu o deslocamento do mesentério e a visualização da porção abdominal da artéria aorta, a qual foi delicadamente dissecada com o auxílio de pinças cirúrgicas e cotonetes estéreis. Com o auxílio de uma agulha metálica 21G angulada em aproximadamente 90 graus, a aorta foi então puncionada e utilizada como guia para a introdução da sonda na artéria. A agulha metálica foi removida concomitantemente à introdução da sonda na artéria e a área foi seca com o auxílio de cotonetes estéreis e mantida completamente sem sangramento. Em seguida, uma gota de cola adesiva biológica foi aplicada sobre a sonda e a artéria, e um pedaço de fibra de celulose de aproximadamente 5 mm² foi aplicada sobre a região para auxiliar a adesão da sonda ao vaso. Para a verificação do correto posicionamento da sonda no interior da artéria, o probe (TA11PA-C40, DSI, EUA) foi ligado com o auxílio de um ímã. Para isso, um mini-rádio portátil foi posicionado próximo ao probe

e sintonizado em 550 kHz-AM, frequência que capta as ondas de PA, reproduzindo o som característico da pulsação do sangue. O corpo do probe foi, em seguida, suturado juntamente à camada muscular. Logo após a pele do animal foi suturada. Após o término da cirurgia, os animais foram mantidos em ambiente aquecido até a completa recuperação da anestesia e posteriormente removidos para a sala de registro.

4.5.2.2. Configuração do sistema de radiotelemetria

Inicialmente, os animais foram colocados em micro-isoladores individuais para ratos, os quais foram posicionados sobre uma placa receptora (modelo RPC-1, DSI, EUA). O sistema de telemetria foi utilizado para a mensuração dos seguintes parâmetros: pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM), pressão de pulso (PP), frequência cardíaca (FC) e atividade locomotora do animal. O sistema foi programado para coletar estes parâmetros durante 10 segundos, na frequência de 500 Hz, a cada 10 minutos, antes, durante e após todo o protocolo experimental e disponibilizá-los sob a forma de médias aritméticas. O sistema permite a coleta desses dados durante 24 h por até 6 meses e consiste de um dispositivo de rádio-freqüência probe/sonda, implantado na artéria aorta abdominal dos animais para a aquisição dos valores dos parâmetros pelo sistema. O software DataQuest ART-Gold 2.0 (DSI, EUA) foi utilizado para o registro dos dados.

4.5.3. Pletismografia de cauda

Para a avaliação da pressão arterial de forma não invasiva, foi utilizado o sistema CODA High Throughput (CODA High Throughput, Kent Scientific®, Torrington, CT, USA). A avaliação da PA com esse equipamento consiste inicialmente na colocação dos animais em contêntores, os quais são então posicionados em uma plataforma de aquecimento e a temperatura da cauda monitorada até que atinja 32-35°C, amplitude de temperatura recomendada pelo fabricante para a mensuração da PA. O manguito e o sensor VPR são então posicionados na cauda para a realização das medidas. Para a avaliação da PA neste estudo, inicialmente os animais foram submetidos a um período de aclimação e familiarização, o qual consistiu na realização de todos os procedimentos realizados no dia da medida, por dois dias. A avaliação da PA foi então realizada no terceiro dia, após familiarização com os procedimentos. Para isso, o sistema foi configurado para a obtenção de cinco ciclos de aclimação seguidos por cinco ciclos de medida, com intervalo entre medidas de 15 s.

4.5.4. Avaliação da sensibilidade do componente bradicárdico do barorreflexo

Neste método, alterações transitórias da PAM são obtidas a partir da injeção intravenosa de doses crescentes de uma substância vasoconstritora, a fenilefrina, um agonista $\alpha 1$ -adrenérgico (Smyth et al., 1969). Esses aumentos transitórios na PA levam a um aumento da atividade dos barorreceptores arteriais, que reflexamente induzem reduções da FC.

A sensibilidade do barorreflexo cardíaco foi avaliada através das variações barorreflexas de FC induzidas por alterações de PAM produzidas por doses crescentes de Fenilefrina (2,5 $\mu\text{g/mL}$ a 40 $\mu\text{g/ mL}$, em bolus – 0,1 mL/dose, IV). As reduções máximas da FC foram convertidas em intervalo de pulso (IP) através da fórmula: $\text{IP (em milissegundos, ms)} = 60.000/\text{FC}$. A sensibilidade do barorreflexo foi estimada pela média aritmética das razões entre as alterações de IP (ms) e alterações da PAM (mmHg), sendo denominado Índice de Sensibilidade Barorreflexa (GUIMARAES *et al.*, 2012, 2014; KANGUSSU *et al.*, 2015).

4.6. Avaliação da ingestão hídrica e da excreção urinária

A ingesta hídrica e a excreção urinária de ratos (SD e TG) e camundongos (C57BL6/J) foram avaliados a partir da colocação dos animais em gaiolas metabólicas. Os animais permaneceram nas gaiolas por 48 h para adaptação e pelo menos mais 24 h para a coleta basal dos parâmetros acima mencionados e coleta da urina. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Renal, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG, em uma sala com temperatura controlada (22°C) e ciclo claro-escuro de 12 h.

4.7. Genotipagem dos ratos hipertensos TGR(mREN2)27

Todos os ratos utilizados transgênicos utilizados neste estudo foram genotipados por PCR utilizando-se DNA genômico extraído da cauda e primer específico para a amplificação do gene murino REN2.

4.8. Avaliação dos efeitos da administração ICV de alamandina por longo prazo no padrão de lesões em órgãos-alvo promovidas pela hipertensão

Para avaliar os efeitos da infusão ICV de alamandina por longo prazo no padrão de lesões em órgãos-alvo promovidas pela hipertensão, foram utilizados a análise histológica do coração e do rim, e a expressão gênica (mRNA) de proteínas da matriz extracelular, como os colágenos tipo I, III e IV, e a fibronectina.

4.8.1. Avaliação dos efeitos da infusão ICV de alamandina por longo prazo na hipertrofia cardíaca e deposição de matriz extracelular no coração

Após a eutanásia dos animais, o coração foi isolado e colocado em uma solução de cloreto de potássio (KCl) 10% para garantir que os cardiomiócitos permanecessem em posição de diástole. Em seguida, o coração foi secado, pesado e então imerso em solução de formalina tamponada 10% por dois dias para a fixação do tecido. Em seguida, o coração foi imerso em álcool 70% por aproximadamente sete dias, quando então os tecidos foram processados. Após a inclusão dos tecidos em parafina, os mesmos foram seccionados em secções de 4 µm a partir da utilização de um micrótomo. Para a análise da hipertrofia cardíaca, três secções de cada animal foram coradas com Hematoxilina e Eosina, visualizadas em um microscópio de luz (BX41[®], Olympus, PA, EUA), fotografadas (Q-color 3TM, Olympus, PA, EUA) sob magnificação de 400x e analisadas com o software Image J. O diâmetro dos cardiomiócitos (50 cardiomiócitos por animal) foi mensurado na região correspondente ao núcleo celular. Apenas cardiomiócitos seccionados longitudinalmente, com núcleos e limites celulares visíveis, foram considerados para a análise.

A deposição de matriz extracelular no coração foi avaliada utilizando a coloração de tricrômico de Masson. Depois de coradas, três secções de cada animal foram visualizadas e fotografadas com magnificação de 200x utilizando-se o mesmo sistema utilizado para a análise da hipertrofia cardíaca. A análise da área percentual de fibrose foi realizada a partir do software Image J.

4.8.2. Avaliação dos efeitos da infusão ICV de alamandina por longo prazo na morfologia renal e na deposição de matriz extracelular no rim

Após a eutanásia dos animais, o rim foi isolado e a cápsula renal removida. Em seguida, o rim foi lavado com solução fisiológica, secado com papel filtro e pesado. O rim foi então seccionado longitudinalmente em duas partes e imerso em solução de formalina tamponada 10% para fixação. O tecido foi então processado como descrito anteriormente. Duas secções longitudinais coradas com hematoxilina e eosina foram então utilizados para a avaliação da lesão tubulointersticial no rim utilizando-se a escala de Shih e colaboradores (SHIH; HINES; NEILSON, 1988). Essa escala avalia a extensão do envolvimento cortical numa escala de 0 a 4, sendo: 0, normal; 0,5, pequenas áreas focais de infiltrado celular e lesão tubular; 1, envolvimento de menos de 10% do córtex; 2, envolvimento de até 25% do córtex; 3, envolvimento de 50 a 75% do córtex; e 4, dano extensivo envolvendo mais de 75% do córtex.

Foram avaliados 30 campos em duas secções de cada animal, sendo todas as análises realizadas por um investigador experiente e cegado com relação aos grupos aos quais os animais pertenciam.

Para a avaliação da deposição de matriz extracelular no córtex renal, foram utilizadas secções longitudinais do rim coradas com Picrosirius Red (Direct Red 80, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). As secções foram então fotografadas em um microscópio Axio Lab.A1 (ZEISS®, Oberkochen, Alemanha) no aumento de 40x. Para a quantificação da área de deposição de colágeno, foi utilizado o software Image Pro Plus e 20 imagens do córtex renal foram avaliadas por amostra.

4.8.3. Avaliação da expressão gênica (mRNA) de componentes da matriz extracelular

4.8.3.1. Coleta dos Tecidos e extração do RNA Total

Os animais foram eutanasiados por decapitação e o coração e o rim foram isolados, o ventrículo esquerdo do coração (VE) foi removido e os tecidos foram então congelados a -80°C até serem processados para a extração do RNA. A extração do RNA foi realizada conforme procedimentos descritos resumidamente a seguir:

- 1) Extração do RNA total a partir do método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio utilizando-se o 1 mL de reagente TRIzol (InvitrogenTM, EUA), 0,2 mL de clorofórmio e 0,5 mL de isopropanol para cada amostra.
- 2) Quantificação do RNA total utilizando-se um espectrofotômetro e determinação de sua pureza a partir da razão entre os comprimentos de onda 260/280 nm.
- 3) Confirmação da integridade do RNA a partir do uso de eletroforese em gel de agarose.

4.8.3.2. PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

Para a avaliação da expressão gênica dos colágenos I, III e IV, fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), fibronectina, peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético cerebral (BNP), fator de crescimento transformador beta (TGF-β), CD68 e Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos (NGAL), primeiramente o RNA total foi tratado com a enzima Dnase I (Invitrogen, EUA) para evitar a contaminação com DNA genômico. Em seguida, foi realizada a transcrição reversa (RT) utilizando-se 1 µg de RNA total e a enzima M-MLV (Invitrogen Life Technologies, EUA) para a produção da fita de DNAc. Posteriormente, as amostras (em duplicatas) foram submetidas à amplificação utilizando-se o mix GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA) e primers específicos (Tabela

1). O gene das proteínas ribossomais L32 e 28S se mostraram os mais estáveis entre amostras e grupos, não apresentando diferença em sua expressão entre as diferentes condições experimentais deste estudo e, por isso, foram selecionados como genes housekeeping. Os primers utilizados foram desenhados a partir do software Primer-Blast (Pubmed Designing Tool) e a aquisição dos mesmos foi realizada na empresa BioTeZ (Berlim, Alemanha). Curvas-padrão para todos os genes foram obtidas a partir de diluições seriadas de uma amostra de DNAc para determinar as eficiências dos primers nas reações. Após a realização das curvas, o tamanho dos amplicons foi verificado a partir de eletroforese em gel de agarose. Todas as reações foram realizadas em 40 ciclos com temperatura de anelamento de 60°C, com exceção para a avaliação da expressão do receptor MrgD, para o qual a temperatura de anelamento utilizada foi de 62°C (QuantStudio 5, Applied Biosystem, NY, USA). A expressão de mRNA foi calculada a partir dos valores do ciclo limiar (Ct) utilizando-se o método delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), descrito por Livak e Schmittgen (2001), e os resultados foram expressos como quantidade relativa de mRNA em relação ao grupo controle (SD+Sal).

4.8.4. Avaliação dos níveis de mediadores inflamatórios no VE e rim de animais hipertensos

Os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β e da citocina anti-inflamatória IL-10, foram quantificados no VE e no rim através de ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA) utilizando kits específicos da R&D Systems (DY501, DY 506, DY510, DY522), assim como os procedimentos descritos pelo fabricante.

4.8.5. Avaliação da função cardíaca

A avaliação da morfologia e função cardíaca foi realizada de forma não-invasiva a partir do ecocardiograma transtorácico utilizando-se um equipamento de alta frequência e resolução VEVO 2100 com transdutores de 16 a 21 MHz (Visual Sonics, Toronto, Canadá). Inicialmente, os ratos foram anestesiados com isoflurano 5%. Em seguida, os animais foram submetidos à tricotomia do tórax e posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa equipada com eletrodos eletrocardiográficos para o monitoramento contínuo da FC. A manutenção da anestesia foi realizada com isoflurano 2,5%. Gel de ultrassom foi aplicado à parede anterior do tórax dos animais e imagens de alta resolução no modo M foram obtidas na visão paraesternal esquerda, nos eixos curto e longo do coração. Todas as análises foram realizadas por um examinador experiente e cegado com relação aos grupos aos quais os animais pertenciam.

4.8.6. Avaliação da função renal

4.8.6.1. Avaliação do volume urinário de 24 h

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a obtenção da ingestão de água e do volume urinário e para a coleta da urina, onde permaneceram por 48 h para adaptação e mais 24 h para a coleta basal dos parâmetros acima mencionados.

4.8.6.2. Mensuração da proteinúria de 24 h

Para a dosagem da concentração de proteína na urina, foi utilizado um kit colorimétrico (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil). A dosagem e os cálculos foram realizados de acordo com as orientações do fabricante. A proteinúria de 24 h foi calculada a partir da multiplicação da concentração de proteína na urina pelo volume de urina de 24 h.

4.8.6.3. Dosagem da creatinina na urina

Para a dosagem da concentração de creatinina na urina, foi utilizado um kit colorimétrico (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), sendo os procedimentos e cálculos realizados conforme orientação do fabricante.

4.9. Avaliação dos efeitos centrais da alamandina em animais hipertensos submetidos à infusão ICV de alamandina por longo prazo

4.9.1. Avaliação das mudanças no perfil de expressão gênica no encéfalo de animais hipertensos TGR(mREN2)27 promovidas pela infusão ICV de alamandina por longo prazo

4.9.1.1. RNASeq

A avaliação das mudanças no perfil de expressão gênica no encéfalo de animais hipertensos TGR(mREN2)27 promovidas pela infusão ICV de alamandina por longo prazo, foi realizada a partir de Sequenciamento de Próxima Geração – RNASeq. Para tal, o RNA total de três amostras do encéfalo de cada grupo (SD+Sal, TG+Sal e TG+Ala) foi isolado a partir da utilização do reagente TRIzol (InvitrogenTM, EUA), 0,2 mL de clorofórmio e 0,5 mL de isopropanol para cada amostra. A quantificação do RNA total foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro e a determinação de sua pureza a partir da razão entre os comprimentos de onda 260/280 nm. A confirmação da integridade do RNA foi realizada a partir do uso de eletroforese em gel de agarose seguido por análise realizada no Bioanalyzer, sendo que o valor de “RNA Integrity Number” (RIN) deveria ser maior ou igual a 8 para a realização do ensaio.

O RNASeq foi então realizado no Bioinformatics Core Facility, MDC-Berlin, Berlin, Alemanha.

As amostras foram preparadas utilizando o protocolo ‘TruSeq stranded mRNA’ (Illumina, Cat Nº RS-122-2101). As bibliotecas foram sequenciadas na plataforma ‘Illumina NextSeq 500 Mid Output’, no modo de sequenciamento PE75. Após a etapa de sequenciamento, os arquivos FASTq foram analisados no software Partek® Flow® (St. Louis, Missouri, EUA). Os dados foram importados e alinhados através do protocolo STAR – 2.5.3^a na referência *Rattus norvegicus* – rn6. Em seguida as leituras alinhadas tiveram sua abundância quantificada e normalizada de acordo com o protocolo Partek E/M – Ensembl Transcripts release 83. Em seguida, foi conduzida a análise de expressão diferencial no algoritmo Partek Gene Specific Analysis, comparando os diferentes grupos. Os genes diferencialmente expressos foram filtrados pela significância estatística ($p < 0,05$) e pela diferença de expressão (fold change) igual ou superior a 1,5.

4.9.1.2. Anotação Funcional

Para a classificação funcional dos genes diferencialmente expressos entre grupos, foi utilizada a plataforma PANTHER (protein annotation through evolutionary relationship). O genoma do rato (*rattus norvegicus*) foi utilizado como a lista background para o ‘over-representation test’. A opção Gene Ontology (GO) foi utilizada para a identificação dos processos biológicos enriquecidos. A plataforma VarElect foi utilizada para a identificação dos genes relacionados a hipertensão a partir dos genes diferencialmente expressos entre os grupos para posterior validação dos seus resultados pela técnica de RT-qPCR.

4.9.2. Avaliação da expressão gênica de componentes do SRA e de outras importantes vias em animais hipertensos submetidos à infusão ICV de alamandina por longo prazo

A expressão gênica (mRNA) da ECA e da ECA2 no coração e no rim, assim como de angiotensinogênio, ECA, ECA2, Mas, MrgD, glutaminase (GLS), transportador de amino ácido excitatório (Slc1a3), subunidade NR1 do receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA), molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba1), proteína glial ácida fibrilar (GFAP) e de óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) no encéfalo, foi avaliada pela técnica de RT-qPCR utilizando-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Para o encéfalo, os genes utilizados como housekeepings foram da proteína ribossomal L32 e da proteína

gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A sequência dos primers utilizados estão contidas na Tabela 1.

4.9.3. Avaliação dos níveis de mediadores inflamatórios no hipotálamo e bulbo de animais hipertensos submetidos à infusão ICV de almandina por longo prazo

Os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β e da citocina anti-inflamatória IL-10, foram quantificados no hipotálamo e no bulbo através de ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA) utilizando kits específicos da R&D Systems (DY501, DY 506, DY510, DY522), assim como os procedimentos descritos pelo fabricante.

4.10. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Antes de proceder com a análise inferencial dos dados, foi realizado teste de normalidade dos dados para a decisão do teste estatístico adequado (paramétrico ou não paramétrico) para o tratamento dos dados. Para comparar as médias entre dois grupos, foi utilizado o teste t de Student não pareado. Para comparação das médias entre três grupos e em situações com apenas um fator de variação, foi utilizada a análise de variância de um fator (One-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. Em situações nas quais existiam dois fatores de variação, foi utilizada a análise de variância de dois fatores (Two-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Corporation, versão 6.0, 2012) e o nível de significância foi estabelecido em 0,05.

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados para a avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.

Gene	Protein		Sequence (5'-3')	Ref	Base Pairs
Col1a1	Collagen I	Forward	ATTCACCTACAGCACGCTTGTG	NM_053304.1	67
		Reverse	GATGACTGTCTTGCCCCAAGTT		
Col3a1	Collagen III	Forward	GCTGGCCTTCCTCAGACTTCT	NM_032085.1	67
		Reverse	GCTGTTTTTGCAGTGGTATGTAATG		
Col4a1	Collagen IV	Forward	AGAACCTGGCAGTGATGGAA	NM_001135009.1	105
		Reverse	CCTTTGTCTCCTTTGGTGCC		
Ctgf	CTGF	Forward	GGTCTCTTCTGCGACTTCGG	NM_022266.2	71
		Reverse	GGTGCACCATCTTTGGCAGTG		
Fn1	Fibronectin	Forward	ACCATCACTGGTCTGGAGCC	NM_019143.2	124
		Reverse	GGGTAACCAGTTGGGGAAGC		
Nppa	ANP	Forward	CTTCCTCTTCCTGGCCTTTTG	NM_012612.2	72
		Reverse	GTGTTGGACACCGCACTGTATAC		
Nppb	BNP	Forward	CAAGCTGCTTTGGGCAGAAG	NM_031545.1	74
		Reverse	AAACAACCTCAGCCCGTCAC		
Tgfb1	TGF- β	Forward	CTTTGTACAACAGCACCCGC	NM_021578.2	127
		Reverse	TAGATTGCGTTGTTGCGGTC		
Cd68	CD68	Forward	ACCAATCTCTCTTGCTGCCT	NM_001031638.1	113
		Reverse	GAGGGGCTGGTAGGTTGATT		
Lcn2	NGAL	Forward	AACGTCACTTCCATCCTCGT	NM_130741.1	139
		Reverse	CCACTTGACATCGTAGCTC		
AGT	Angiotensinogen	Forward	CACGGACAGCACCTATTTT	NM_134432.2	101
		Reverse	TGTTGTCCACCCAGAACTCA		

Tabela 1 - Continuação

Ace	ACE	Forward	ATTGCAGCCGGGCAACTTTTC	NM_012544.1	142
		Reverse	CGCATTCTCCTCCGTGATGTT		
Ace2	ACE2	Forward	CTTACGAGCCTCCTGTCACC	NM_001012006.1	70
		Reverse	ATGCCAACCCTACCGTTCC		
MAS1	Mas	Forward	TGAGGAGAAATCCCTTCACG	NM_012757.2	185
		Reverse	CAGATAGAGGCCTGTGTTGT		
Mrgprd	MrgD	Forward	CTGATGAACTTCCTGGCTTC	NM_001001506.1	103
		Reverse	TCCCCAGGATAAGACTGTTG		
Gls	Glutaminase	Forward	CTTGACAAGATGGGCAACAGTG	NM_001109968.1	146
		Reverse	AAGGAATGCCTTTGATCACCTC		
Slc1a3	EAAT	Forward	AAAGATTCCAGCAAGGGGTGC	NM_001289941.1	143
		Reverse	CGCCATTCCCACAATGACAGC		
NMDAR1	NR1	Forward	ATAGTGACAATCCACCAAGAGCC	NM_001270602.1	319
		Reverse	GTAGCTCGCCCATCATTCCGTT		
Nos1	nNOS	Forward	GAACCCTTGCGTTTCTTTCCC	NM_052799.1	124
		Reverse	AGACGCTGTTGAATCGGACC		
Aif1	Iba1	Forward	GCCAGAGCAAGGATTTGCAG	NM_017196.3	92
		Reverse	GAGGAAGTGCTTGTGATCCC		
Gfap	GFAP	Forward	TTGACCTGCGACCTTGAGTC	NM_017009.2	111
		Reverse	GAGTGCTCCTGGTAACTCG		

5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS

5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS

5.1. Avaliação dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por curto prazo em animais normotensos e hipertensos

Grupos experimentais

Com o objetivo de investigar os efeitos da infusão ICV de alamandina por curto prazo sobre a PA e a FC de animais normotensos e hipertensos, ratos SD e TG com 11 semanas foram divididos nos seguintes grupos:

SD+Sal: ratos SD que receberam infusão ICV de salina estéril por curto prazo (12 μ L/h, 90 min).

SD+Ala: ratos SD que receberam infusão ICV de alamandina por curto prazo (4 μ g/h, 12 μ L/h, 90 min).

TG+Sal: ratos TG que receberam infusão ICV de salina estéril por curto prazo (12 μ L/h, 90 min).

TG+Ala: ratos TG que receberam infusão ICV de alamandina por curto prazo (4 μ g/h, 12 μ L/h, 90 min).

Com o objetivo de avaliar o efeito da infusão ICV de alamandina por curto prazo sobre a sensibilidade do barorreflexo de animais normotensos e hipertensos, foram realizadas duas avaliações deste parâmetro: a primeira após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares e antes da infusão do peptídeo; e a segunda após 90 min de infusão do peptídeo (Figura 2).

Protocolo

Após quatro a sete dias da cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos à uma cirurgia para canulação da artéria e da veia femoral. Após 24 h, foi realizado o registro da PA e FC dos animais a partir de um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC[®], EUA). Inicialmente, aguardou-se a estabilização dos parâmetros cardiovasculares por aproximadamente 30-40 minutos e os valores basais foram registrados. Em seguida, foi realizada a avaliação basal da sensibilidade do componente bradicárdico do barorreflexo a partir da injeção intravenosa de diferentes doses de fenilefrina. Logo após, iniciou-se a infusão ICV de salina estéril (12 μ L/h, 90 min) ou alamandina (4 μ g/h, 12 μ L/h, 90 min). Após os 90 min de infusão, a sensibilidade do barorreflexo foi avaliada novamente (Figura 2). A infusão foi mantida até o término do teste do barorreflexo e os parâmetros de PA e FC foram registrados durante todo o experimento.

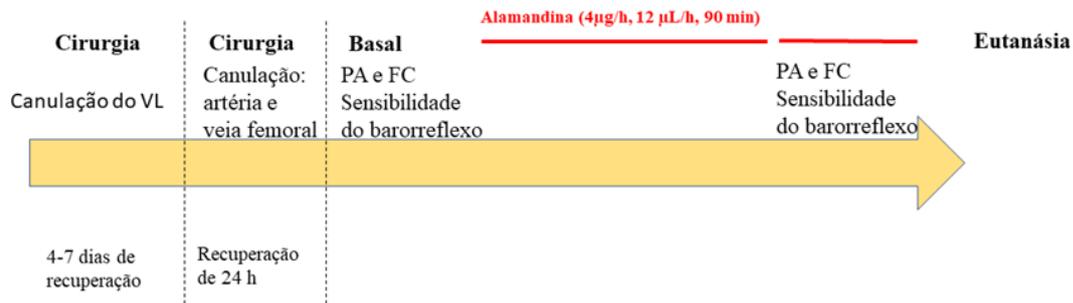


Figura 2 - Protocolo experimental para a avaliação os efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por curto prazo em animais normotensos e hipertensos.

Resultados

A infusão ICV de alamandina por curto prazo (90 min) não alterou a PA e a FC de animais normotensos (Figura 3). No entanto, reduziu a PAM dos animais hipertensos transgênicos (TG) aos 60 min (158 ± 9 mmHg vs. 171 ± 9 mmHg no basal; $n=5$; $p<0,05$; Figura 4) e 90 min (158 ± 7 mmHg vs. 171 ± 9 mmHg no basal, $n=5$, $p<0,05$; Figura 4) de infusão. Além disso, a infusão ICV de alamandina por curto prazo melhorou a sensibilidade do barorreflexo em aproximadamente 40% nos ratos SD ($1,35 \pm 0,23$ ms/mmHg vs. $0,98 \pm 0,14$ ms/mmHg no basal; $n=5$, $p<0,01$; Figura 5-A) e cerca de 30% nos ratos TG ($0,46 \pm 0,05$ ms/mmHg vs. $0,36 \pm 0,05$ ms/mmHg no basal; $n=6$, $p<0,05$; Figura 5-B). A Tabela 2 sumariza os efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por curto prazo em ratos SD e TG.

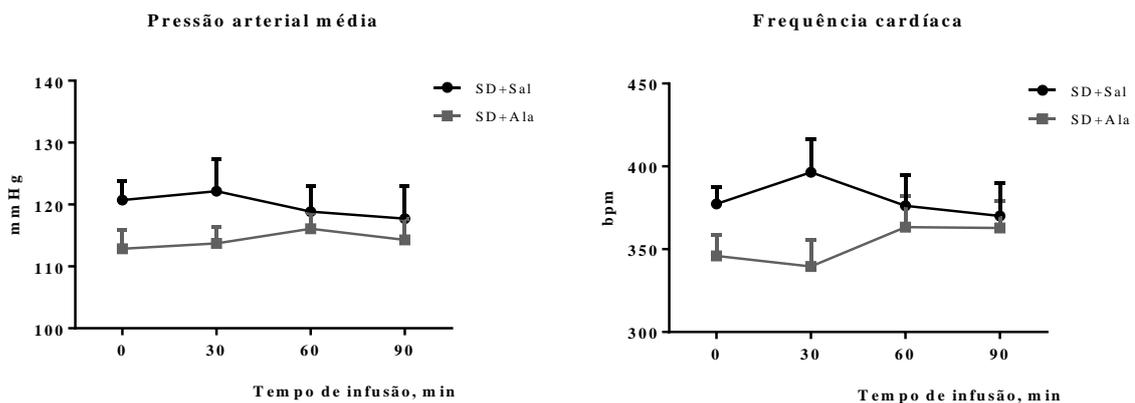


Figura 3 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos (SD). Valores de pressão arterial média (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) de ratos normotensos (SD+Sal, $n=7$) e normotensos tratados com alamandina por 90 min (SD+Ala, $4\mu\text{g/h}$, $n=7$). Não houve diferença estatística entre os grupos ou tempos avaliados (two-way ANOVA para medidas repetidas).

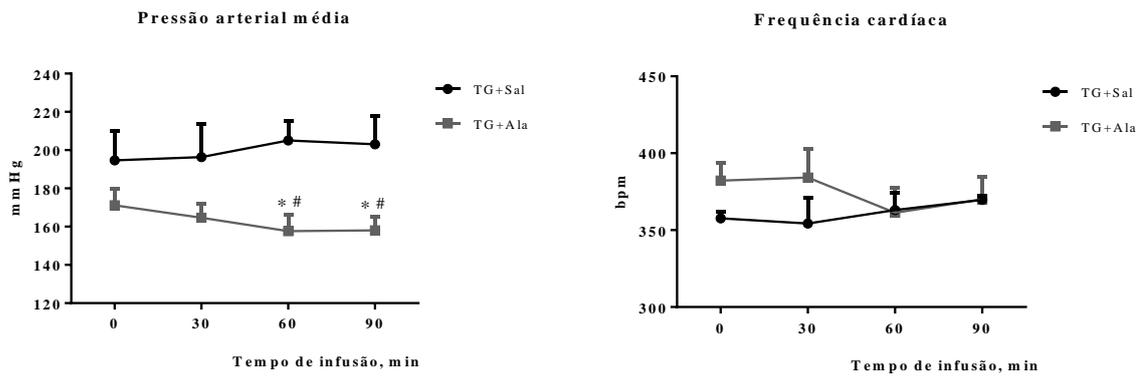


Figura 4 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre parâmetros cardiovasculares de ratos hipertensos (TG). Valores de pressão arterial média (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) de ratos hipertensos (TG+Sal, n=3) e hipertensos tratados com alamandina por 90 min (TG+Ala, 4µg/h, n=5). * $p < 0,05$ vs. Basal (Two-way ANOVA para medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Bonferroni), # $p < 0,05$ vs. TG+Sal (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

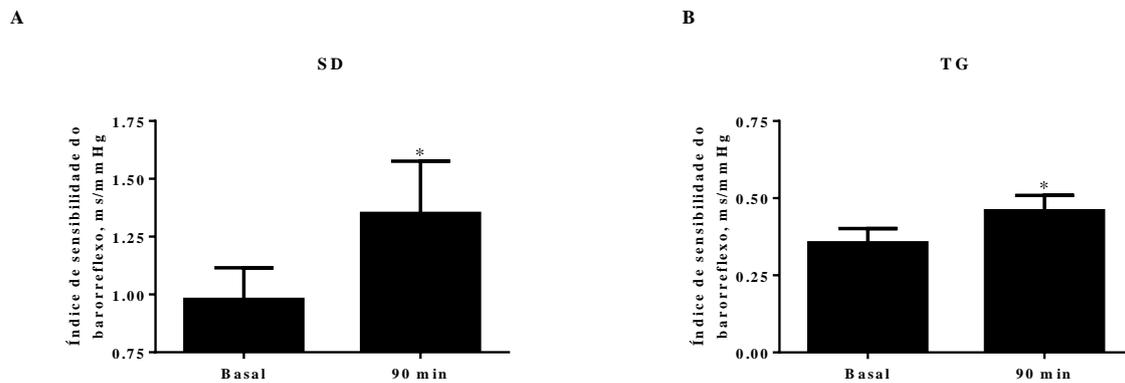


Figura 5 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a sensibilidade do controle barorreflexo da FC de ratos SD e TG.

Índice da sensibilidade do barorreflexo (ms/mmHg) de ratos normotensos (SD, n=5; A) ou ratos hipertensos (TG, n=6; B) antes (basal) e após 90 min de infusão ICV de alamandina (4µg/h). * $p < 0,05$ vs. basal, teste t pareado.

Tabela 2 - Sumário dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina (4 ug/h) por curto prazo em ratos normotensos (SD) e hipertensos (TG).

Parâmetro avaliado	SD+Ala	TG+Ala
PAM	ND	↓
FC	ND	ND
SBR	↑ 40%	↑ 30%

PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; SBR: sensibilidade do barorreflexo; ND: não há diferença entre os grupos; ↑ indica que o parâmetro está aumentado após a infusão de alamandina; ↓ indica que o parâmetro está reduzido após a infusão de alamandina.

5.2. Avaliação dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por longo prazo em animais hipertensos

5.2.1. Padronização da infusão ICV de alamandina por longo prazo: avaliação da estabilidade da alamandina

Protocolo

Antes de estudar os efeitos cardiovasculares promovidos pelo aumento crônico de alamandina no SNC de animais hipertensos, a estabilidade da alamandina em condições similares às que seriam utilizadas durante a infusão do peptídeo por longo prazo (28 dias, temperatura média de 37°C no espaço subcutâneo) foi investigada a partir da técnica de espectrometria de massas (MALDI-TOF). Para tal, a alamandina nas mesmas condições em que seria utilizada no experimento de infusão de longo prazo: utilizando-se a mesma concentração (0,8 µg/µL), o mesmo veículo (salina estéril), o mesmo período de tempo em que seria utilizada (28 dias) e à temperatura fisiológica aproximada de 37°C no espaço subcutâneo, onde seriam implantadas as mini-bombas osmóticas para a infusão de alamandina. Em seguida, a solução foi colocada em diferentes tubos, os quais permaneceram em um banho-maria por diferentes períodos de tempo: 7, 14, 21 e 28 dias. Além disso, parte da solução foi congelada a -20°C imediatamente após a diluição para ser utilizada como controle (dia zero). Após o período de tempo que a solução deveria permanecer no banho-maria, os tubos foram congelados a -20°C (Figura 6). Posteriormente, como o veículo utilizado para a diluição da alamandina foi a salina estéril, as amostras foram devidamente processadas para sua dessalinização utilizando-se ponteiros zip-tip. Posteriormente, as amostras foram analisadas através da espectrometria de massas (MALDI-TOF) e comparadas com uma solução controle de alamandina, diluída naquele momento, e com a matriz utilizada na análise para a ionização da amostra.

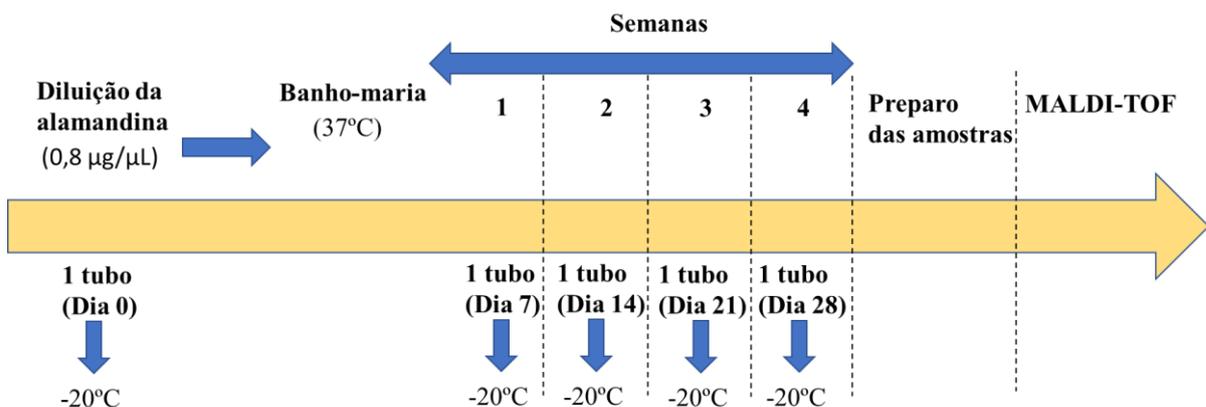


Figura 6 – Protocolo experimental para a avaliação da estabilidade da alamandina.

Resultados

Levando-se em consideração que a infusão ICV de alamandina por curto prazo reduziu a PA de animais hipertensos e melhorou a sensibilidade do barorreflexo tanto em ratos normotensos quanto hipertensos, decidimos investigar os efeitos cardiovasculares decorrentes da infusão ICV desse peptídeo por longo prazo em ratos hipertensos. Para isso, primeiramente avaliamos se a alamandina seria um peptídeo estável em condições similares à da infusão.

Como pode ser observado na Figura 7, houve sobreposição dos espectros de massas obtidos para todas as soluções analisadas (7, 14, 21 e 28 dias), incluindo a solução controle e a matriz. Não foram observados sinais referentes a outros íons, que poderiam indicar a formação de produtos de degradação da alamandina ao longo do período avaliado. Observou-se que o sinal mais abundante observado nos espectros de massas das soluções de alamandina era correspondente à razão massa/carga (m/z) desse peptídeo. Para confirmar a atribuição do sinal mais abundante à alamandina, foi realizada a fragmentação do íon com razão m/z igual a 855, como apresentado na Figura 8. Pela sequência de aminoácidos obtida, confirmou-se que o sinal mais abundante nos espectros de massa era referente à alamandina. Esses dados mostraram que a alamandina é estável nas condições (temperatura de 37°C, salina como veículo e período de 28 dias) que seriam utilizadas para a infusão ICV por longo prazo.

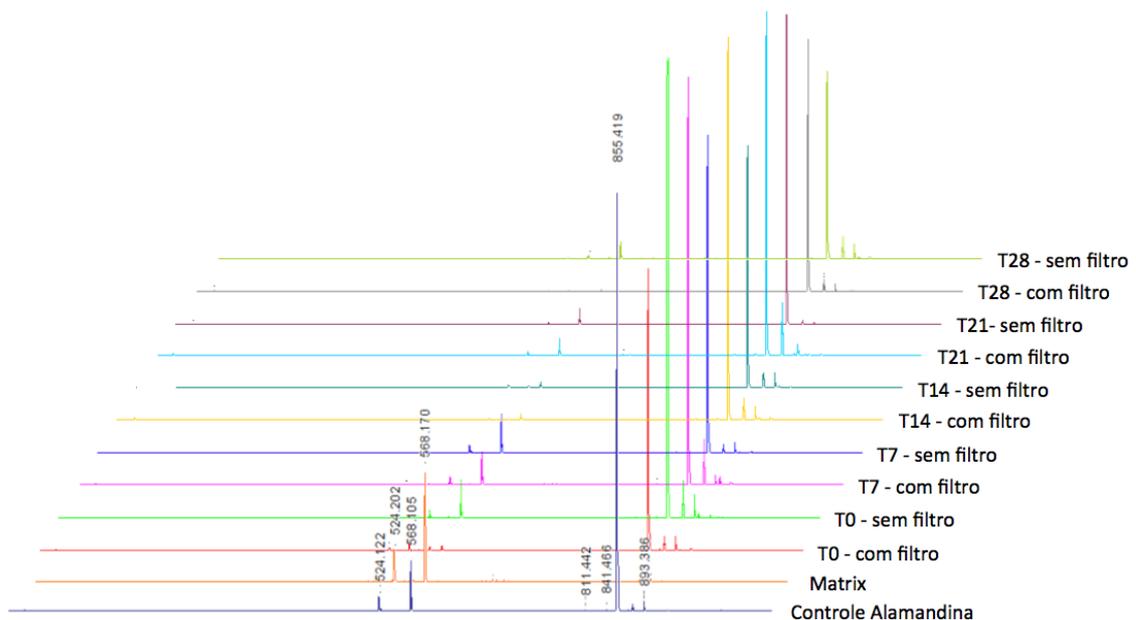


Figura 7 - Avaliação da estabilidade da alamandina por espectrometria de massas (MALDI-TOF).

Controle Alamandina: amostra diluída no dia da análise; T0: amostra diluída e congelada a -20°C até análise; T7: a amostra foi diluída, permaneceu por 7 dias a 37°C e foi congelada; T14: a amostra foi diluída, permaneceu por 14 dias a 37°C e foi congelada; T21: a amostra foi diluída, permaneceu por 21 dias a 37°C e foi congelada; T28: a amostra foi diluída, permaneceu por 28 dias a 37°C e foi congelada. Com filtro: soluções filtradas utilizando-se filtro de seringa; sem filtro: amostras não purificadas com filtro de seringa.

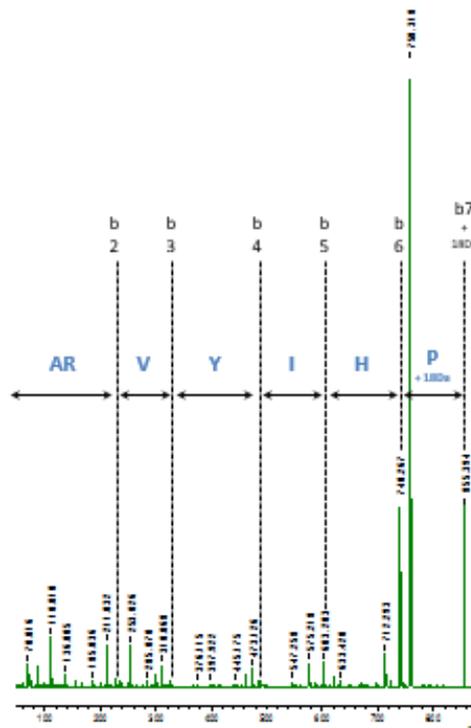


Figura 8 - Confirmação da sequência de aminoácidos da alamandina por espectrometria de massas. Resultado obtido a partir da fragmentação do sinal mais abundante no espectro de massas ($m/z=855$). A: alanina; R: arginina; Y: tirosina; I: isoleucina; H: histidina; P: prolina.

5.2.2. Efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por longo prazo em animais hipertensos TGR(mREN2)27 com diferentes idades no início do tratamento

Inicialmente, avaliamos os efeitos da infusão ICV de alamandina por longo prazo em três diferentes doses (50, 200 e 800 ng/h) sobre a PA de ratos hipertensos TG com 12-15 semanas de idade no início do tratamento. Entretanto, nós observamos que a infusão de alamandina não alterou a PA dos ratos TG. A partir de uma análise mais minuciosa dos dados, identificamos que os animais mais novos pareciam responder melhor ao tratamento com alamandina a 200 ng/h em relação aos animais mais velhos. Além disso, estudos prévios de nosso grupo mostraram que a infusão ICV de Ang-(1-7), a 200 ng/h, induz efeitos protetores em animais hipertensos. Dessa forma, selecionamos a dose de 200 ng/h para os experimentos seguintes.

Grupos experimentais

Para a realização dessa parte do estudo, ratos TG com 9-16 semanas de idade no início do tratamento foram divididos nos seguintes grupos:

TG - 9 semanas: ratos TG com 9 semanas de idade no início da infusão ICV de salina estéril (0,25 μ L/h) ou alamandina (200 ng/h, 0,25 μ L/h) por 28 dias.

TG – 12 semanas: ratos TG com 12 semanas de idade no início da infusão ICV de salina estéril (0,25 $\mu\text{L/h}$) ou alamandina (200 ng/h, 0,25 $\mu\text{L/h}$) por 28 dias.

TG – 16 semanas: ratos TG com 16 semanas de idade no início da infusão ICV de salina estéril (0,25 $\mu\text{L/h}$) ou alamandina (200 ng/h, 0,25 $\mu\text{L/h}$) por 28 dias.

Protocolo

Inicialmente, os animais foram levados para a sala de registro para adaptação. Após sete dias, os animais foram então submetidos à cirurgia para a implantação dos probes de telemetria e, após sete dias de recuperação, foi realizada a coleta dos valores basais de PA e FC. Em seguida, foi realizada a cirurgia estereotáxica para a infusão ICV de alamandina (200 ng/h, 0,25 $\mu\text{L/h}$) por longo prazo (28 dias) em ratos TG com 9 a 16 semanas de idade no início do tratamento. Com o objetivo de investigar se o tratamento com alamandina poderia estar prevenindo aumento na PA dos animais hipertensos, os parâmetros cardiovasculares foram registrados por mais quatro semanas após os 28 dias de infusão. A seguir, os animais foram então eutanasiados (Figura 9).

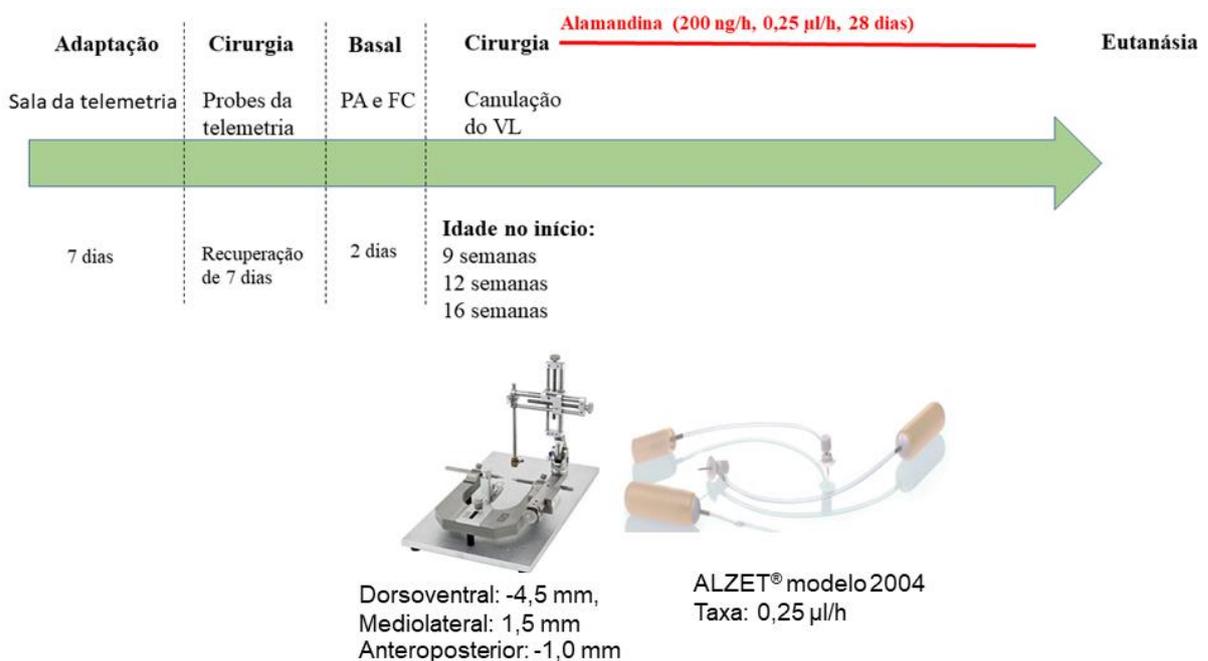


Figura 9 - Protocolo experimental para a avaliação dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por longo prazo em ratos hipertensos TGR(mREN2)27 com diferentes idades no início do tratamento.

Resultados

Inicialmente, avaliamos o efeito da infusão ICV de alamandina em ratos TG com 9, 12 e 16 semanas de idade sobre parâmetros cardiovasculares. A infusão ICV de alamandina por 4 semanas não alterou o desenvolvimento da HA em animais com 9 semanas de idade (Figura

10), bem como não alterou os elevados níveis de PA em animais com HA estabilizada (16 semanas de idade no início do tratamento; Figura 11). Entretanto, a infusão ICV de alamandina reduziu de forma significativa a PA de dia (PAM - $141 \pm 6,0$ mmHg vs. $162 \pm 10,4$ mmHg no basal; $n=4$, $p<0,05$; Figura 12) e de noite (PAM - $132 \pm 6,9$ mmHg vs. $149 \pm 11,3$ mmHg o basal; $n=4$, $p<0,05$; Figura 12) em ratos TG que iniciaram o tratamento com 12 semanas de idade. Os ratos TG que receberam salina ICV (controle) não apresentaram alteração da PA nesse período ($164 \pm 4,4$ mmHg vs. $166 \pm 4,0$ mmHg no basal; $n=3$, $p<0,05$; Figura 12). A Tabela 3 sumariza os efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por longo prazo em ratos TG com diferentes idades no início do tratamento.

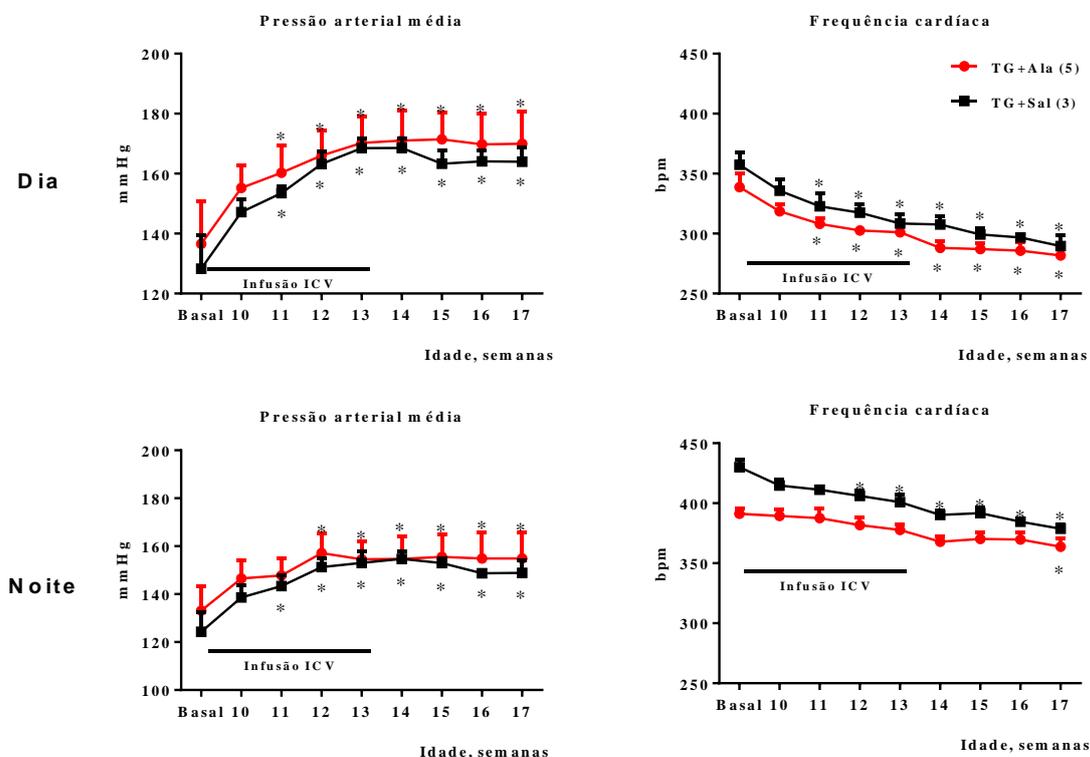


Figura 10 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre parâmetros cardiovasculares de ratos hipertensos com 9 semanas de idade no início do tratamento.

Valores de Pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) de ratos hipertensos (TG+Sal; $n=3$) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala; 200 ng/h, $n=5$). * $p<0,05$ vs. basal (Two-way ANOVA para medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

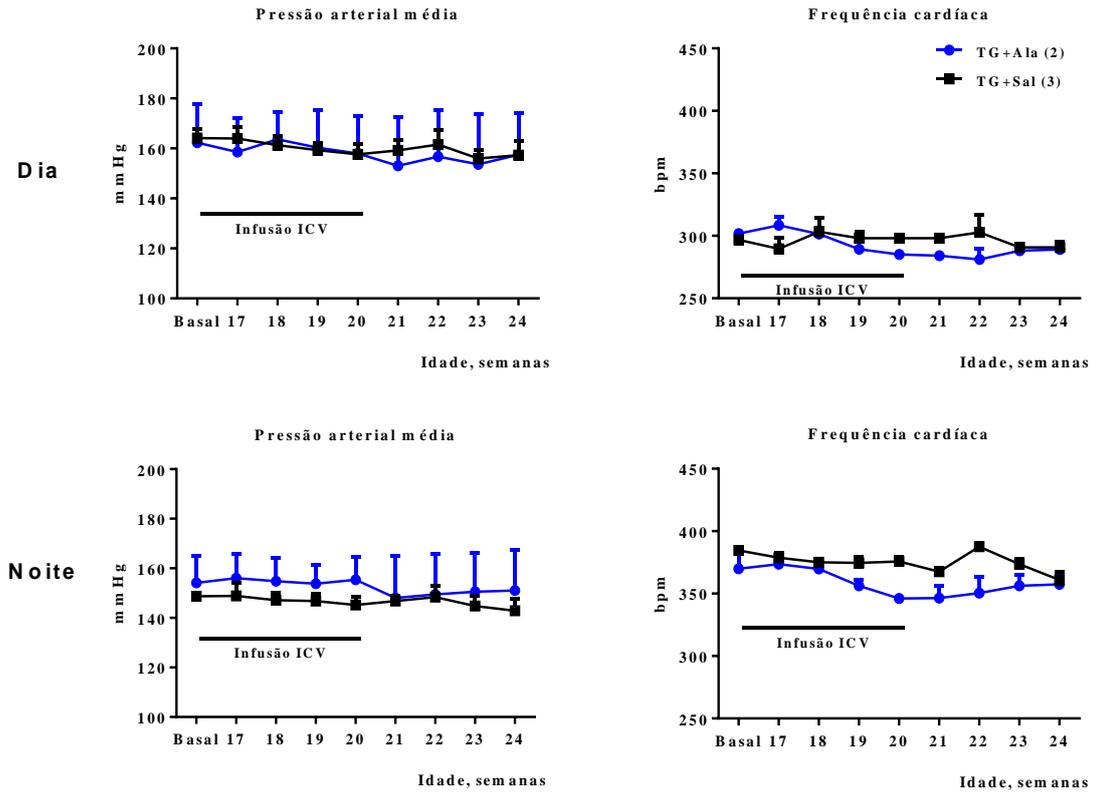
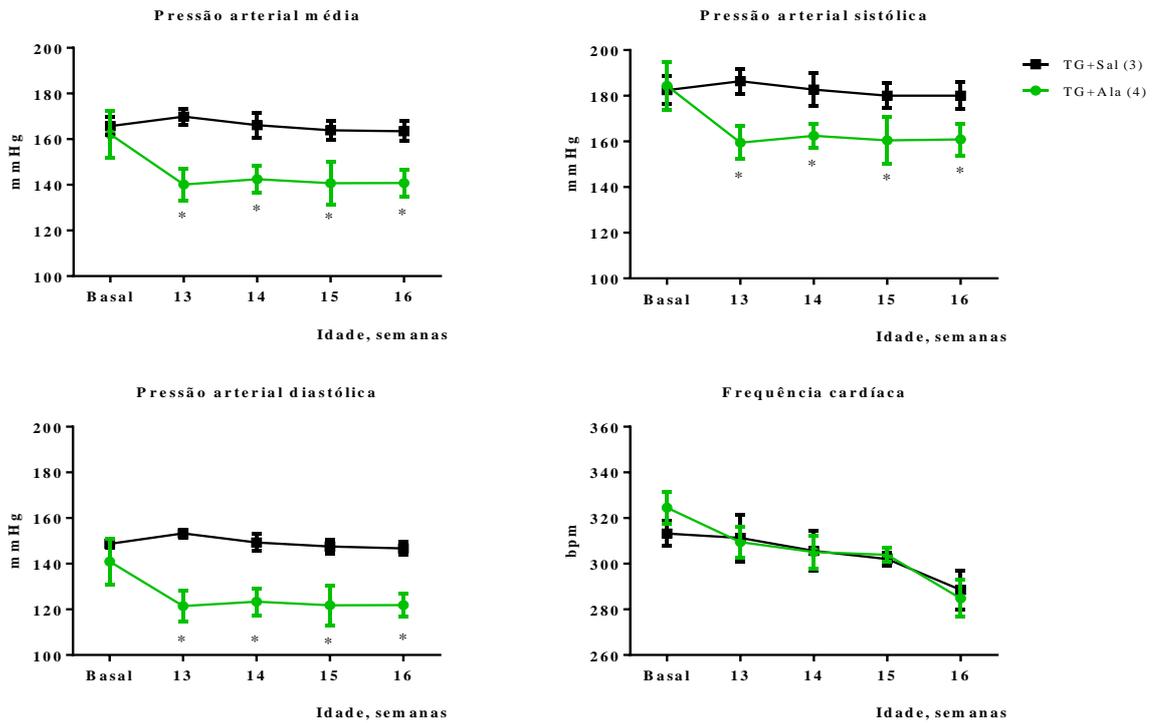


Figura 11 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre parâmetros cardiovasculares de ratos hipertensos com 16 semanas de idade no início do tratamento. Valores de Pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) de ratos hipertensos (TG+Sal; n=3) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+ALA, 200 ng/h, n=2).

Dia



Noite

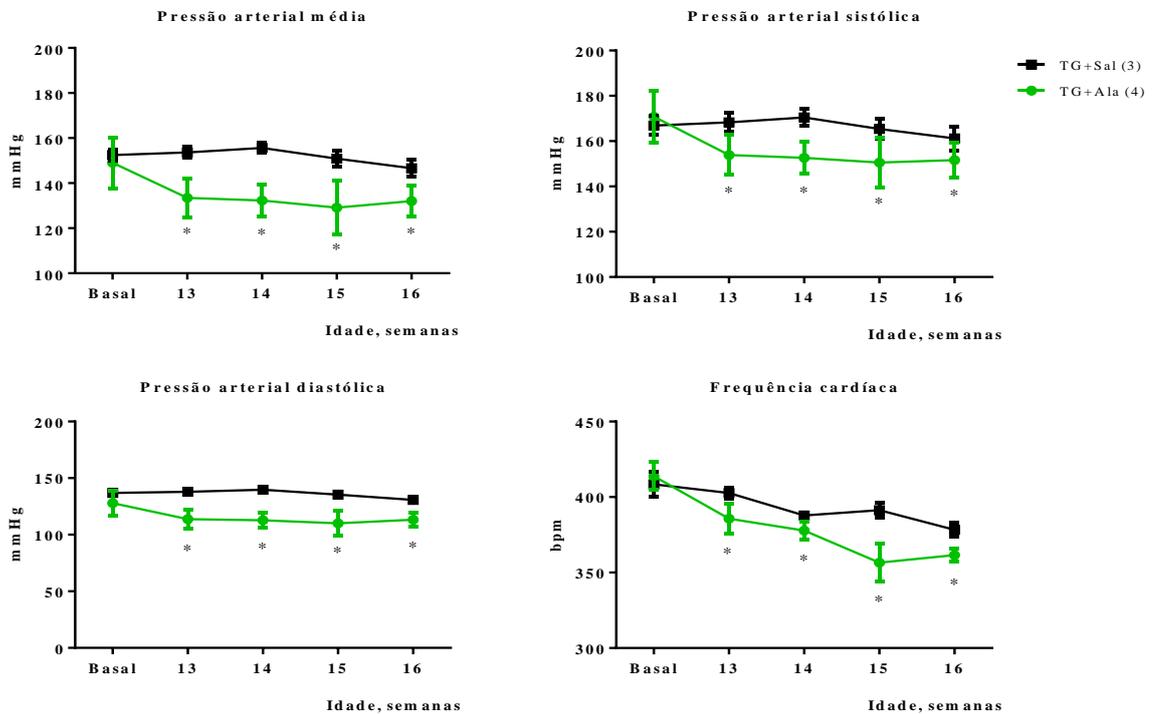


Figura 12 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre parâmetros cardiovasculares de ratos hipertensos com 12 semanas de idade no início do tratamento

Valores de Pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) de dia e de noite de ratos hipertensos (TG+Sal; n=3) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=4). * $p < 0,05$ vs. basal (two-way ANOVA para medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

Tabela 3 - Sumário dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por longo prazo em ratos TG com diferentes idades no início do tratamento.

Idade	Período	Parâmetro avaliado	TG+Ala vs. TG+Sal
9 semanas	Dia	PAM	ND
		FC	ND
	Noite	PAM	ND
		FC	ND
12 semanas	Dia	PAM	↓
		PAS	↓
		PAD	↓
		FC	ND
	Noite	PAM	↓
		PAS	↓
		PAD	↓
		FC	↓
16 semanas	Dia	PAM	ND
		FC	ND
	Noite	PAM	ND
		FC	ND

PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; ND: não há diferença entre os grupos; ↑ indica que o parâmetro está aumentado no primeiro grupo; ↓ indica que o parâmetro está reduzido no primeiro grupo.

5.2.3. Efeitos da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre parâmetros cardiovasculares, o coração e o rim de animais hipertensos DOCA-Sal

5.2.3.1. Indução do modelo DOCA-Sal

Para a indução da hipertensão DOCA-Sal em ratos SD, foram realizadas nefrectomia unilateral, implantação de um pellet com deoxicorticosterona (DOCA) (200 mg/Kg) e administração de NaCl (0,9%) na água de beber, conforme descrito previamente por nosso grupo de pesquisa (GUIMARAES *et al.*, 2012). Para a realização da nefrectomia unilateral e implantação do pellet com DOCA, 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/100 g). Após tricotomia da região póstero-lateral esquerda do abdome e assepsia com álcool iodado 0,1%, os animais foram posicionados em decúbito lateral direito sobre uma mesa cirúrgica. Foi então realizada uma incisão de aproximadamente 3 cm na pele e tecidos subjacentes. O rim esquerdo foi então localizado e a interrupção do fluxo sanguíneo foi realizada amarrando-se o feixe vascular com linha de sutura. Em seguida, foi realizada uma secção, com tesoura, proximal ao nó dado com a linha de sutura e o rim esquerdo dos animais

foi removido. Posteriormente, a pele e os tecidos subjacentes foram suturados. Logo em seguida, para a implantação do pellet com DOCA, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica e foi realizada a tricotomia da região interescapular do dorso. Uma pequena incisão na pele foi então realizada para a implantação do pellet com DOCA ou do pellet vazio (grupo NFX). Em seguida, procedeu-se a sutura da pele. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em ambiente aquecido até a completa recuperação da anestesia e posteriormente foram levados para o Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão, ICB/UFMG. Após dois dias de recuperação, iniciou-se a administração de NaCl 0,9% na água de beber dos animais (grupos DOCA e DOCA+Ala).

Grupos experimentais

Nessa parte do estudo, ratos SD com 11 semanas de idade foram divididos nos seguintes grupos:

NFX: ratos SD submetidos à nefrectomia unilateral, implantação de um pellet de silicone vazio no espaço subcutâneo e que receberam água para beber.

DOCA+Sal: ratos SD submetidos à nefrectomia unilateral, implantação de um pellet com DOCA (200 mg/Kg) no espaço subcutâneo, administração de NaCl 0,9% na água de beber e infusão ICV de salina estéril (0,5 µL/h) por longo prazo (14 dias).

DOCA+Ala: ratos SD submetidos à nefrectomia unilateral, implantação de um pellet com DOCA (200 mg/Kg) no espaço subcutâneo, administração de NaCl 0,9% na água de beber e infusão ICV de alamandina (200 ng/h, 0,5 µL/h) por longo prazo (14 dias).

Protocolo

Primeiramente, a PA de ratos SD foi mensurada por pletismografia de cauda. A seguir, os animais foram submetidos à cirurgia para a realização de nefrectomia unilateral e implantação do pellet de silicone vazio (grupo NFX) ou com DOCA (200 mg/Kg) (grupos DOCA+Sal e DOCA+Ala). Após dois dias de recuperação, iniciou-se a administração de NaCl 0,9% na água de beber dos animais (grupos DOCA+Sal e DOCA+Ala). Após cinco dias, a PA dos animais foi mensurada novamente para garantir que os animais estavam desenvolvendo hipertensão. Em seguida, foi realizada a cirurgia estereotáxica para o início da infusão de salina estéril (0,5 µL/h, DOCA+Sal) ou alamandina (200 ng/h, 0,5 µL/h, DOCA+Ala) por longo prazo (14 dias). Após 13 dias de infusão, os animais foram submetidos à cirurgia para canulação da artéria e da veia femoral para a avaliação da PA e injeção de drogas, respectivamente. Depois

de 24 h, iniciou-se o registro dos parâmetros cardiovasculares a partir de um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC®, EUA). A princípio, aguardou-se 30-40 minutos para a estabilização e registro dos valores basais da PA e da FC. A seguir, foi realizada a avaliação da sensibilidade do componente bradicárdico do barorreflexo. Posteriormente, os animais foram eutanasiados (Figura 13).

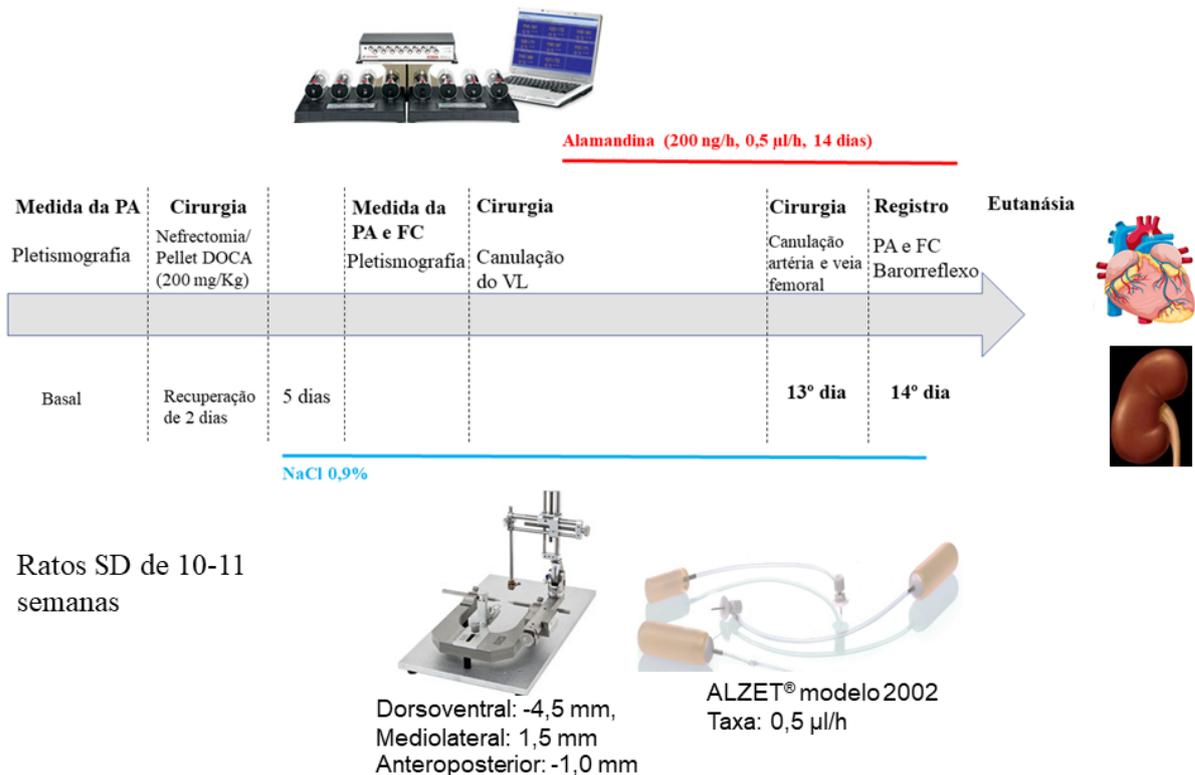


Figura 13 - Protocolo experimental para a avaliação dos efeitos cardiovasculares da infusão ICV de alamandina por longo prazo em ratos hipertensos DOCA-Sal.

Resultados

Como a infusão ICV de alamandina por longo prazo reduziu a PA apenas de ratos TG que iniciaram o tratamento com 12 semanas de idade, decidimos investigar os efeitos produzidos pelo aumento crônico de alamandina no SNC em outro modelo experimental de HA. O modelo escolhido foi o DOCA-Sal, um modelo de HA neurogênico, que apresenta hiperatividade do SRA cerebral. Como esperado, a PA foi significativamente maior nos ratos DOCA em relação aos ratos controle (168 ± 5 mmHg vs. 117 ± 2 mmHg no NFX; $n=5-8$, $p < 0,05$; Figura 14). A infusão ICV de alamandina por longo prazo (14 dias), no entanto, não alterou a PA e a FC dos animais hipertensos (Figura 14). No entanto, diferente do efeito na PA, o aumento crônico de alamandina no SNC desses animais melhorou em aproximadamente 30% a sensibilidade do barorreflexo ($0,49 \pm 0,03$ ms/mmHg vs. $0,38 \pm 0,03$ ms/mmHg no DOCA; $n=4-$

6, $p < 0,001$; Figura 15). O barorreflexo é um dos principais mecanismos moduladores da atividade do sistema nervoso simpático que, por sua vez, está envolvido com a hipertensão e lesão em órgãos alvo no modelo DOCA-sal. Assim, investigamos a seguir se o tratamento com alamandina poderia atenuar alterações observadas no coração e no rim de ratos DOCA-sal.

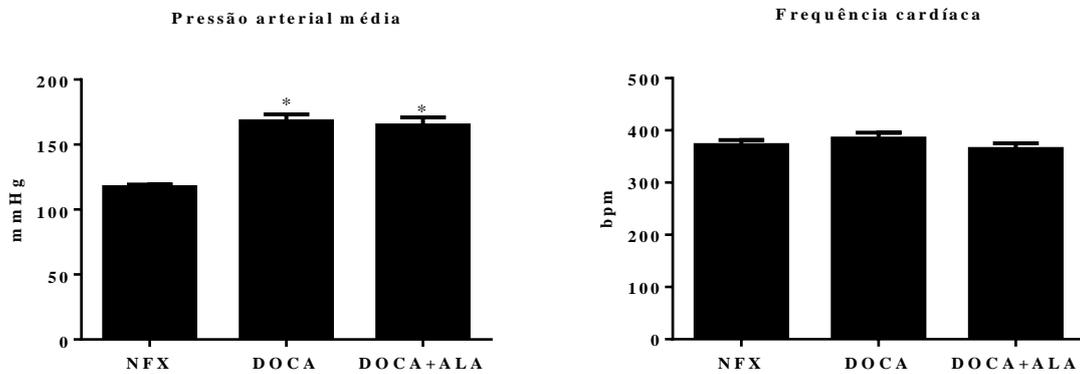


Figura 14 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre parâmetros cardiovasculares em ratos hipertensos DOCA-sal.

Valores de Pressão arterial média (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) de ratos controle (NFX; $n=5$), hipertensos (DOCA; $n=8$) e hipertensos tratados com alamandina por 14 dias (DOCA+Ala, 200 ng/h, $n=8$). * $p < 0,001$ vs. NFX (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

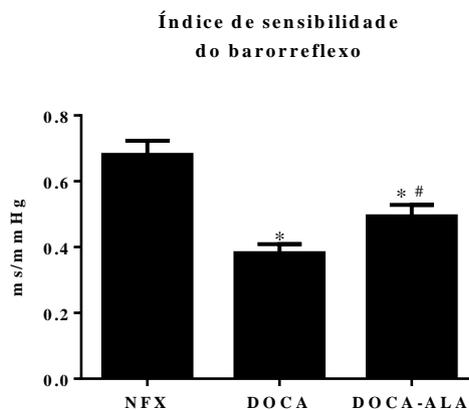


Figura 15 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre sensibilidade do controle reflexo da FC em ratos hipertensos DOCA-sal

Índice de sensibilidade do barorreflexo (ms/mmHg) de ratos controle (NFX; $n=4$), hipertensos (DOCA; $n=6$) e hipertensos tratados com alamandina por 14 dias (DOCA+Ala, 200 ng/h, $n=4$). * $p < 0,001$ vs. NFX; # $p < 0,05$ vs. DOCA (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Observamos que os ratos DOCA apresentaram hipertrofia cardíaca, avaliada pelo diâmetro dos cardiomiócitos ($13,40 \pm 0,18 \mu\text{m}$ vs. $10,83 \pm 0,15 \mu\text{m}$ no NFX; $n=4$, $p < 0,001$; Figura 16-D) e pelo peso do coração corrigido pelo peso corporal ($3,59 \pm 0,15 \text{ mg/g}$ vs. $2,79 \pm 0,13 \text{ mg/g}$ no NFX; $n=5-6$, $p < 0,05$; Figura 16-E). A infusão ICV de alamandina por longo prazo não alterou a hipertrofia cardíaca nesses animais (Figura 16). Além disso, os ratos DOCA apresentaram também hipertrofia renal ($5,64 \pm 0,20 \text{ mg/g}$ vs. $3,83 \pm 0,09 \text{ mg/g}$ no SD+Sal; $n=5-$

6, $p < 0,001$; Figura 17) e o tratamento com alamandina não altera a hipertrofia no rim (Figura 17). A Tabela 4 sumariza os efeitos da infusão ICV de alamandina por longo prazo em ratos DOCA.

Os dados obtidos com ratos DOCA-Sal mostram também que o efeito da alamandina não se restringe a um modelo experimental. Desta forma, prosseguimos o trabalho utilizando ratos transgênicos (TG) com idade inicial de 12 semanas.

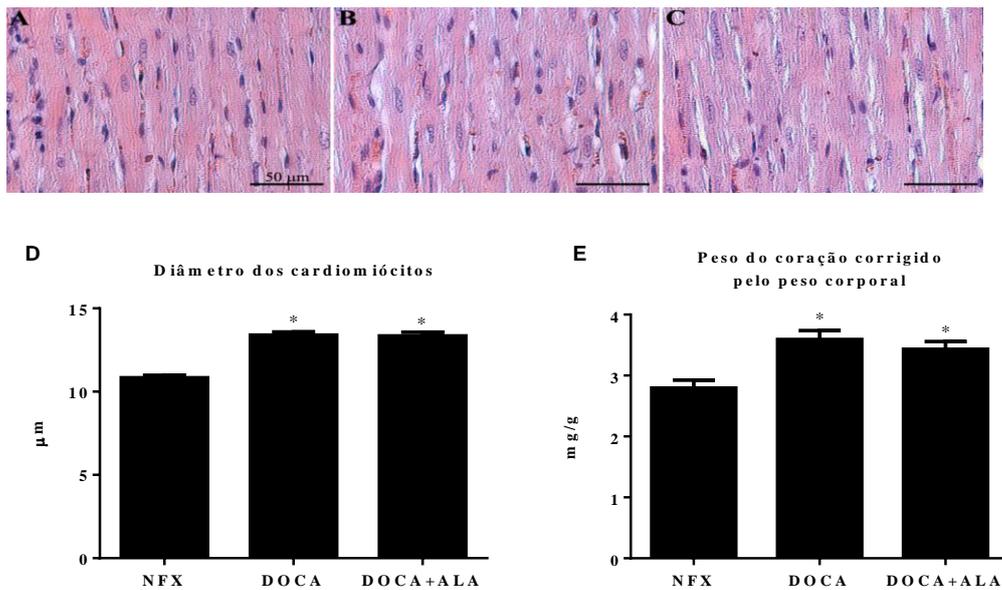


Figura 16 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a hipertrofia cardíaca em ratos hipertensos DOCA-sal. Imagens representativas de cortes transversais (4 μm) do coração de ratos controle (A, NFX, n=4), hipertensos (B, DOCA, n=4) e hipertensos tratados com alamandina (C, DOCA+Ala, 200 ng/h, n=4) por 14 dias. Em D, valores do diâmetro dos cardiomiócitos de ratos NFX, DOCA e DOCA+Ala. Em E, valores do peso do coração corrigido pelo peso corporal de ratos NFX (n=5), DOCA (n=6) e DOCA+Ala (n=6). * $p < 0,05$ vs. NFX (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

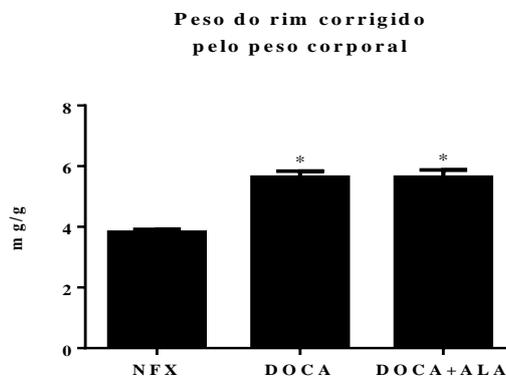


Figura 17 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a hipertrofia renal em ratos hipertensos DOCA-sal. Peso do rim corrigido pelo peso corporal de ratos controle (NFX, n=5), hipertensos (DOCA, n=6) e hipertensos tratados com alamandina por 14 dias (DOCA+Ala, 200 ng/h, n=6). * $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey)

Tabela 4 - Sumário dos efeitos da infusão ICV de alamandina (200 ng/h) por longo prazo em ratos DOCA.

Parâmetro avaliado	DOCA	DOCA+Ala	DOCA+Ala
	vs. NFX	vs. DOCA	vs. NFX
PAM	↑	ND	↑
FC	ND	ND	ND
SBR	↓↓	↑ 30%	↓
Diâmetro cardiomiócitos	↑	ND	↑
HW/BW	↑	ND	↑
KW/BW	↑	ND	↑

PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; SBR: sensibilidade do barorreflexo; HW/BW: peso do coração corrigido pelo peso corporal; KW/BW: peso do rim corrigido pelo peso corporal; ND: não há diferença entre os grupos; ↑ indica que o parâmetro está aumentado no primeiro grupo; ↓ indica que o parâmetro está reduzido no primeiro grupo.

5.3. Avaliação do efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o coração de ratos hipertensos TGR(mREN2)27

Grupos experimentais

Para a realização desse protocolo, ratos SD e TG com 12 semanas de idade no início do tratamento foram divididos nos seguintes grupos:

SD+Sal: ratos SD submetidos à infusão ICV de salina estéril (0,25 µL/h) por 28 dias.

TG+Sal: ratos TG submetidos à infusão ICV de salina estéril (0,25 µL/h) por 28 dias.

TG+Ala: ratos TG submetidos à infusão ICV de alamandina (200 ng/h, 0,25 µL/h) por 28 dias.

Protocolo

Inicialmente, a PA dos animais hipertensos foi avaliada por pletismografia de cauda para que os animais fossem divididos entre grupos de forma a manter a PA homogênea entre grupos. Em seguida, foi realizada a cirurgia estereotáxica para a canulação do ventrículo lateral do cérebro e foi realizada então a infusão ICV de salina estéril (0,25 µl/h) ou alamandina (200 ng/h, 0,25 µl/h) por 28 dias. Após o término da infusão, os animais foram eutanasiados e coração e o rim coletados (Figura 18).

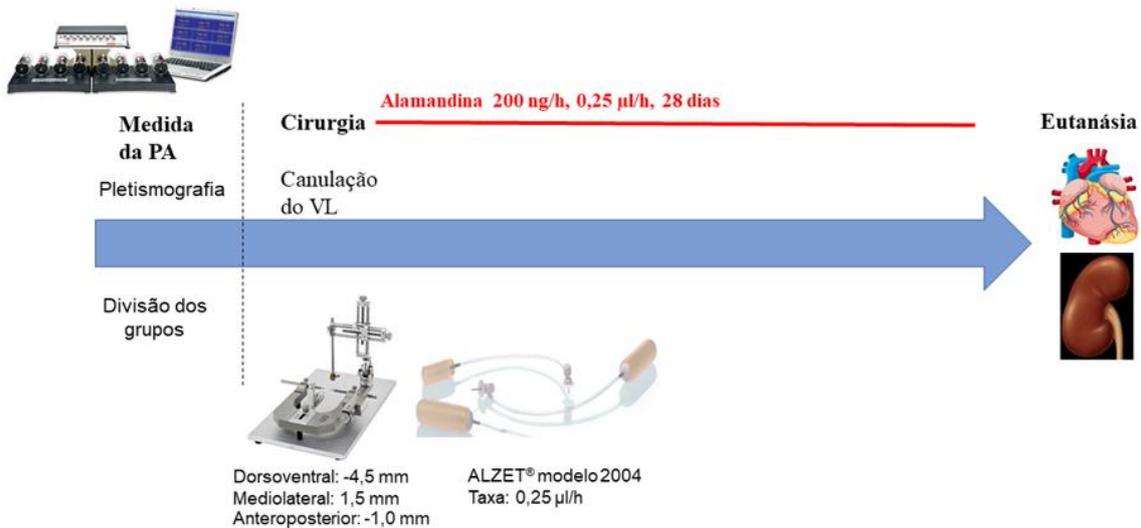


Figura 18 - Protocolo experimental para a avaliação dos efeitos da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o coração de ratos hipertensos TG.

Resultados

Avaliação da hipertrofia cardíaca

Os ratos TG com 12 semanas de idade apresentaram hipertrofia cardíaca, avaliada pelo diâmetro dos cardiomiócitos ($14,17 \pm 0,55 \mu\text{m}$ vs. $10,96 \pm 0,76 \mu\text{m}$ no SD+Sal; $n=4$, $p < 0,01$; Figura 19) e pelo peso do coração corrigido pelo peso corporal ($4,13 \pm 0,09 \text{ mg/g}$ vs. $3,15 \pm 0,06 \text{ mg/g}$ no SD+Sal; $n=7$, $p < 0,001$; Figura 19) e pelo comprimento da tíbia ($38,62 \pm 1,54 \text{ mg/mm}$ vs. $30,55 \pm 1,46 \text{ mg/mm}$ no SD+Sal; $n=7-8$, $p < 0,01$; Figura 19). Entretanto, a infusão ICV de alamandina por longo prazo não alterou o desenvolvimento da hipertrofia nesses animais (Figura 19). Como esperado, houve um aumento de aproximadamente 41 vezes na expressão gênica de ANP ($63,24 \pm 2,91 \text{ a.u.}$ vs. $1,53 \pm 0,34 \text{ a.u.}$ no SD+Sal; $n=10-12$, $p < 0,001$; Figura 20) e de aproximadamente duas vezes na expressão de BNP ($2,64 \pm 0,33 \text{ a.u.}$ vs. $1,32 \pm 0,14 \text{ a.u.}$ no SD+Sal; $n=10-12$, $p < 0,01$; Figura 20) no VE de ratos TG. No entanto, o tratamento com alamandina aumentou ainda mais a expressão desses dois marcadores de hipertrofia cardíaca (ANP- $89,53 \pm 10,90 \text{ a.u.}$ vs. $63,24 \pm 2,91 \text{ a.u.}$ no TG+Sal; $n=10-11$, $p < 0,05$; e BNP - $4,45 \pm 0,37 \text{ a.u.}$ vs. $2,64 \pm 0,33 \text{ a.u.}$ no TG+Sal; $n=10-11$, $p < 0,05$; Figura 20).

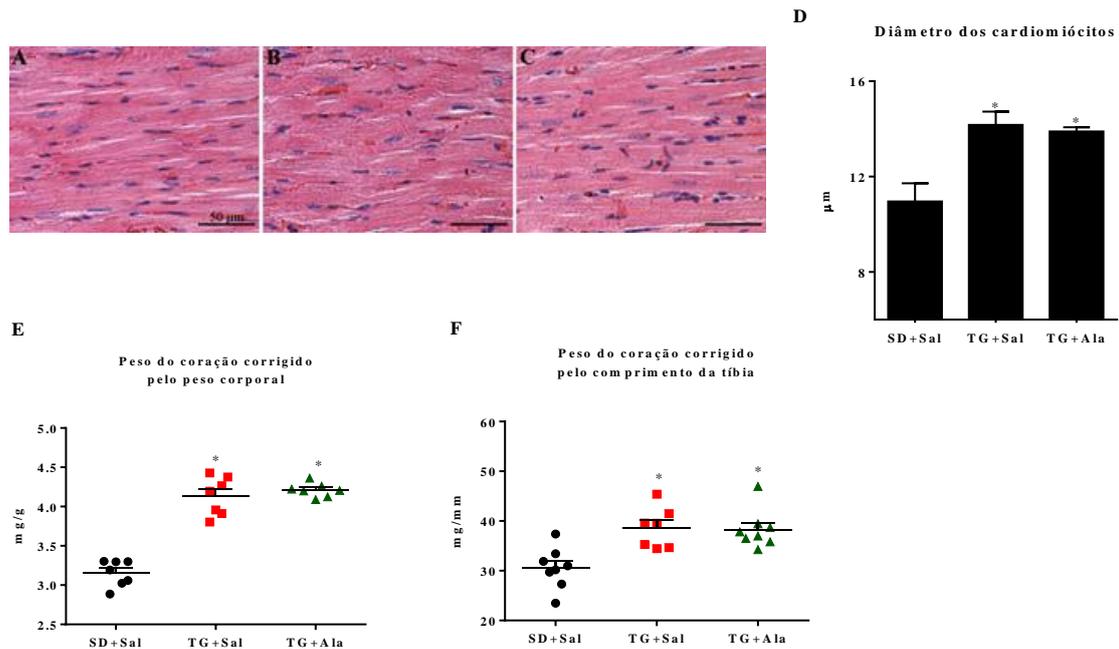


Figura 19 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a hipertrofia cardíaca em ratos hipertensos. Imagens representativas de cortes transversais (4 μm) do coração de ratos controle (A, SD+Sal, n=4), hipertensos (B, TG+Sal, n=4) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (C, TG+Ala, 200 ng/h, n=4). Em D, valores do diâmetro dos cardiomiócitos da parede livre do ventrículo esquerdo de ratos SD+Sal, TG+Sal e TG+Ala. Em E, valores do peso do coração corrigido pelo peso corporal de ratos SD+Sal (n=7), TG+Sal (n=7) e TG+Ala (n=7). Em F, valores do peso do coração corrigido pelo comprimento da tibia de ratos SD+Sal (n=8), TG+Sal (n=7) e TG+Ala (n=8). * $p < 0,05$ vs. SD+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

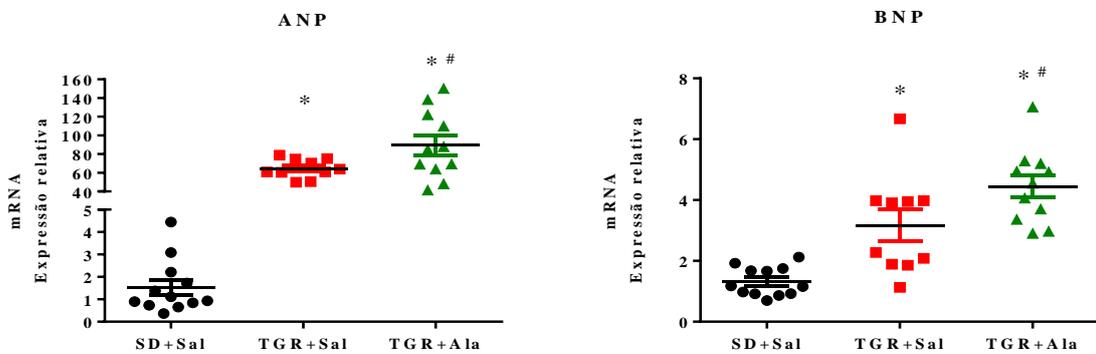


Figura 20 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão de ANP e BNP cardíacos em ratos hipertensos. Expressão (mRNA) do Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) e do Peptídeo Natriurético Cerebral (BNP) no VE de ratos controle (SD+Sal, n=12), hipertensos (TG+Sal, n=10) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=11). * $p < 0,05$ vs. SD+Sal; # $p < 0,05$ vs. TG+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Avaliação dos níveis de mediadores inflamatórios no VE

Como apresentado na Figura 21, os ratos TG apresentaram níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (43,24 \pm 5,53 pg/100 mg de proteína vs. 20,99 \pm 1,01 pg/100 mg de proteína no SD+Sal; n=4-7, $p < 0,001$; Figura 21), IL-6 (47,21 \pm 3,47 pg/100 mg de proteína vs. 23,61 \pm 1,84 pg/100 mg de proteína no SD+Sal; n=4-7, $p < 0,001$; Figura 21) e IL-1 β

(51,07±4,28 pg/100 mg de proteína vs. 21,64±1,42 pg/100 mg de proteína; n=4-7, $p<0,001$; Figura 21) no VE. A infusão de alamandina por longo prazo não alterou os níveis dessas citocinas (Figura 21). Não houve diferença entre os grupos com relação aos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 21).

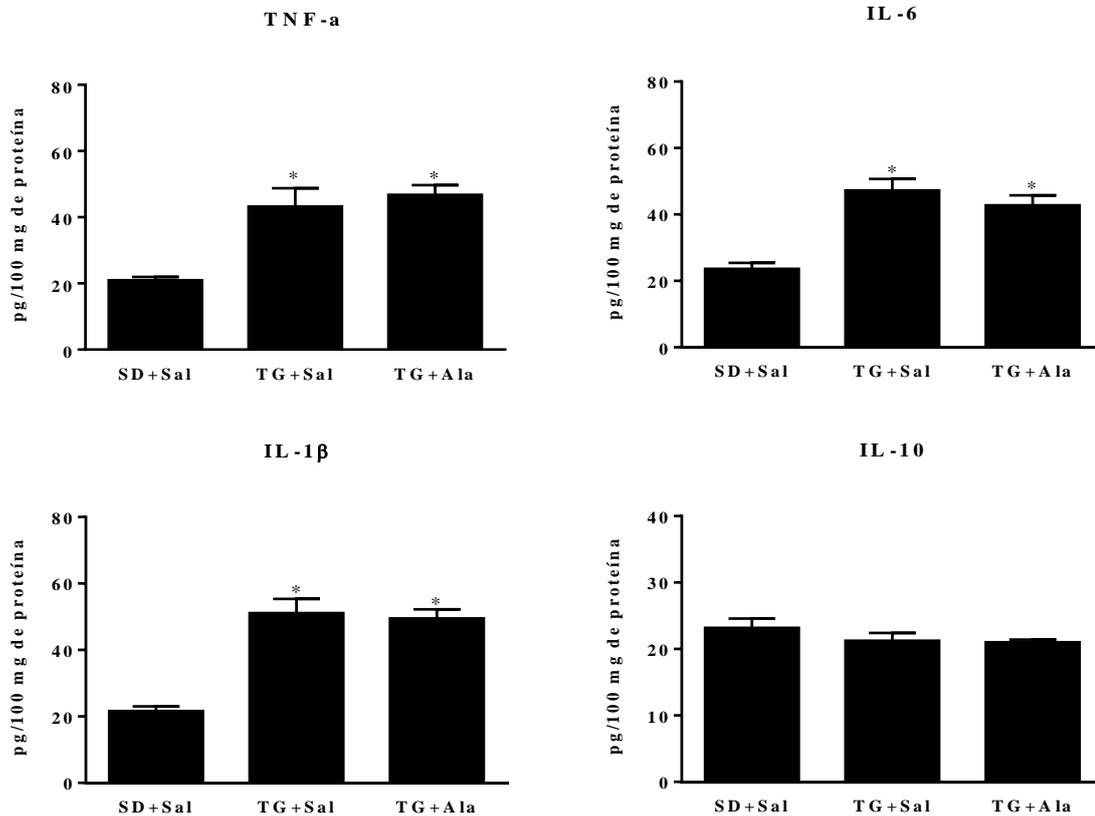


Figura 21 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre os níveis de citocinas no coração de ratos hipertensos TG. Níveis de citocinas inflamatórias no VE de ratos controle (SD+Sal, n=7), hipertensos (TG+Sal, n=4) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=6). * $p<0,001$ vs. SD+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Avaliação da deposição de matriz extracelular no VE

Ao avaliar a deposição de matriz extracelular a partir da análise de cortes do coração, observamos que os ratos TG apresentaram aumento na deposição de matriz extracelular no VE (14,74±0,94% vs. 8,56±0,54% no SD+Sal; n=4-5, $p<0,001$; Figura 22). A infusão ICV de alamandina por 28 dias atenuou essa alteração (12,08±0,56% vs. 8,56±0,54% no SD+Sal; n=4-5, $p<0,05$; Figura 22).

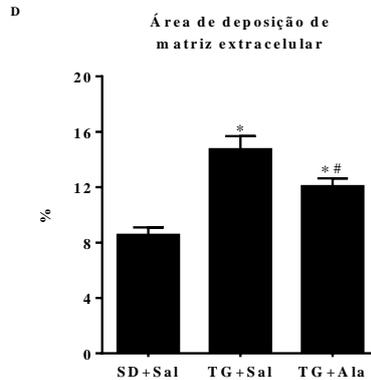
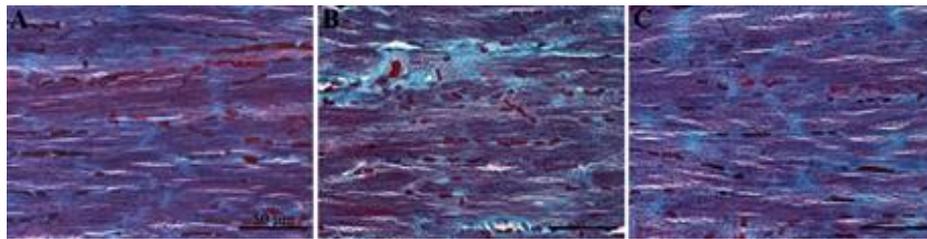


Figura 22 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a deposição de matriz extracelular no coração de ratos hipertensos.

Imagens representativas de cortes transversais (4 μ m) do coração de ratos controle (A, SD+Sal, n=4), hipertensos (B, TG+Sal, n=5) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (C, TG+Ala, 200 ng/h, n=5). Em D, a quantificação da área total de deposição de colágeno no VE de ratos SD+Sal, TG+Sal e TG+Ala. * p <0,001 vs. SD+Sal e # p <0,05 vs. TG+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Como pode ser observado na Figura 23, não houve diferença na expressão gênica dos colágenos I e III, fibronectina e TGF- β no VE entre os diferentes grupos experimentais. A expressão gênica de CTGF, entretanto, aumentou aproximadamente 5 vezes no VE dos ratos TG (6,93 \pm 1,02 a.u. vs. 1,36 \pm 0,22 a.u. no SD+Sal; n=10-12, p <0,001; Figura 23). O tratamento com alamandina aumentou ainda mais a expressão gênica de CTGF no VE dos ratos TG (11,44 \pm 1,09 a.u. vs. 1,36 \pm 0,22 a.u. no SD+Sal; n=10-11; p <0,05; Figura 23).

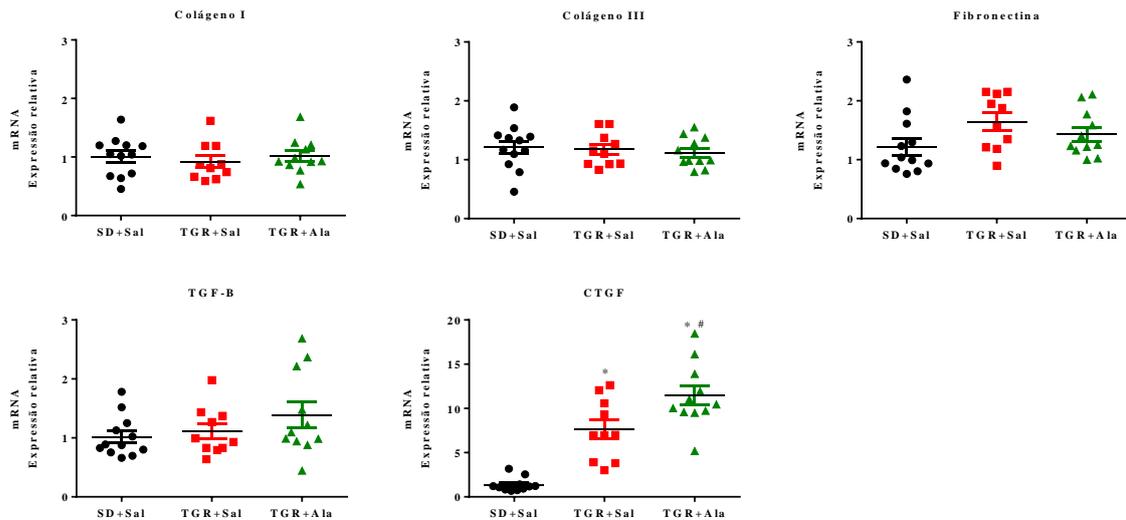


Figura 23 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão gênica de componentes da matriz extracelular no coração de ratos hipertensos.

Expressão (mRNA) de Colágeno I, III, fibronectina, CTGF e TGF- β no VE de ratos controle (SD+Sal, n=12), hipertensos (TG+Sal, n=10) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=11). * $p<0,05$ vs. grupo SD+Sal; # $p<0,05$ vs. grupo TG+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Avaliação da função cardíaca

Avaliamos a função cardíaca dos animais hipertensos TG a partir do exame ecocardiográfico. No entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais para nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros de função cardíaca de animais normotensos (SD), hipertensos (TG) e hipertensos tratados com alamandina (TG+Ala; 200 ng/h), por longo prazo.

Parâmetro	SD+Sal	TG+Sal	TG+Ala
Débito cardíaco, mL/min	69,20 \pm 4,54	85,52 \pm 9,94	83,73 \pm 10,41
DIVE (diástole), mm	7,71 \pm 0,19	8,12 \pm 0,26	8,25 \pm 0,45
DIVE (sístole), mm	4,87 \pm 0,21	5,07 \pm 0,24	5,24 \pm 0,30
Vd, μ L	329,0 \pm 17,10	371,1 \pm 22,40	382,6 \pm 39,82
Vs, μ L	114,8 \pm 12,69	125,3 \pm 13,32	131,9 \pm 16,23
Fração de ejeção, %	65,39 \pm 2,56	65,84 \pm 4,20	65,67 \pm 1,39
Fração de encurtamento, %	37,40 \pm 2,01	38,03 \pm 3,37	37,61 \pm 1,05
Índice Cardíaco, ml/g/min	0,20 \pm 0,01	0,24 \pm 0,03	0,23 \pm 0,02

Os valores são médias \pm erro padrão das médias. One-way ANOVA (n=4-6). DIVE: diâmetro interno do ventrículo esquerdo; Vd: volume diastólico; Vs: volume sistólico.

Avaliação da expressão gênica de componentes do SRA

Como pode ser observado na Figura 24, os ratos TG apresentaram redução na expressão gênica de ECA (0,76 \pm 0,07 a.u. vs. 1,04 \pm 0,10 a.u. no SD+Sal; n=9-12, $p<0,05$; Figura 24) e ECA2 (0,75 \pm 0,06 a.u. vs. 0,97 \pm 0,07 a.u. no SD+Sal; n=9-12, $p<0,05$; Figura 24) no VE. O

tratamento com alamandina não alterou a expressão dessas enzimas (Figura 24). A Tabela 6 sumariza os efeitos da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o coração de ratos TG.

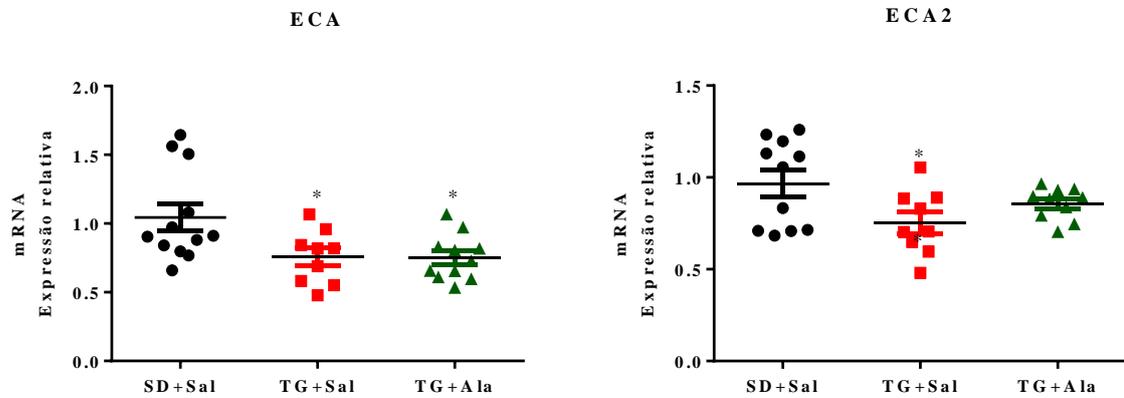


Figura 24 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão gênica de ECA e ECA2 no coração de ratos hipertensos TG.

Expressão (mRNA) das enzimas ECA e ECA2 no VE de animais controle (SD+Sal, n=12), hipertensos (TG+Sal, n=9) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=10). * $p < 0,05$ vs. SD+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Tabela 6 - Sumário dos efeitos da infusão ICV de alamandina (200 ng/h) sobre o coração de ratos TG.

Parâmetro avaliado	TG+Sal	TG+Ala	TG+Ala
	vs. SD+Sal	vs. TG+Sal	vs. SD+Sal
Diâmetro dos cardiomiócitos	↑	ND	↑
HW/BW	↑	ND	↑
HW/TL	↑	ND	↑
ANP (mRNA)	↑	↑	↑
BNP (mRNA)	↑	↑	↑
TNF- α	↑	ND	↑
IL-6	↑	ND	↑
IL-1 β	↑	ND	↑
IL-10	ND	ND	ND
Deposição de matriz extracelular	↑	↓	↑
Colágeno I (mRNA)	ND	ND	ND
Colágeno III (mRNA)	ND	ND	ND
Fibronectina (mRNA)	ND	ND	ND
TGF- β (mRNA)	ND	ND	ND
CTGF (mRNA)	↑	↑	↑
Função cardíaca	ND	ND	ND
ECA (mRNA)	↓	ND	↓
ECA2 (mRNA)	↓	ND	ND

HW/BW: peso do coração corrigido pelo peso corporal; HW/TL: peso do coração corrigido pelo comprimento da tíbia; ANP: peptídeo natriurético atrial; BNP: peptídeo natriurético cerebral; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina 6; IL-1 β : interleucina 1- β ; IL-10: interleucina 10; TGF- β : fator de transformação do crescimento beta; CTGF: fator de crescimento do tecido conjuntivo; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; ND: não há diferença entre os grupos; ↑ indica que o parâmetro está aumentado no primeiro grupo; ↓ indica que o parâmetro está reduzido no primeiro grupo

5.4. Efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o rim de animais hipertensos

Grupos experimentais e protocolo

Os grupos experimentais e o protocolo utilizado para a avaliação do efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o rim de animais hipertensos são os mesmos descritos no item 5.3.

Resultados

Hipertrofia renal

Os ratos TG apresentaram hipertrofia renal, como evidenciado pelo peso do rim corrigido pelo peso corporal ($3,38 \pm 0,05$ mg/g vs. $3,03 \pm 0,10$ mg/g no SD+Sal; $n=7$, $p<0,01$; Figura 25) e pelo comprimento da tibia ($32,97 \pm 0,65$ mg/mm vs. $28,21 \pm 0,54$ mg/mm no SD+Sal; $n=5-7$, $p<0,05$; Figura 25) e a infusão ICV de alamandina por longo prazo não alterou a hipertrofia renal (Figura 25).

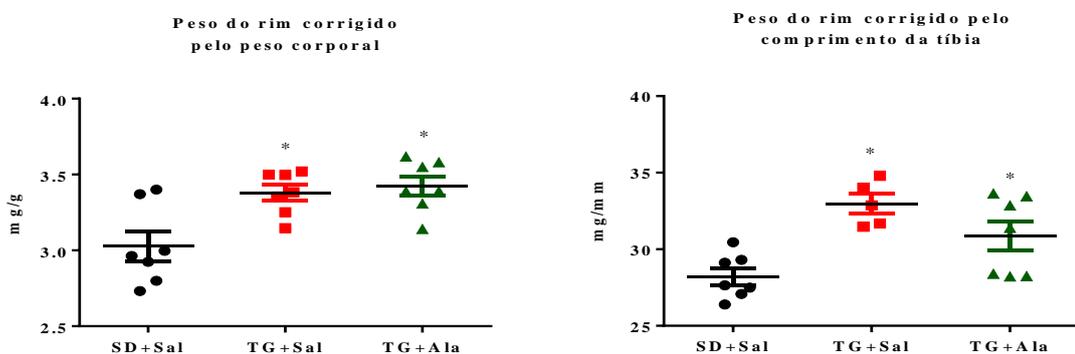


Figura 25 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre o peso do rim de ratos hipertensos TG. Peso do rim de ratos controle (SD+Sal; $n=7$), hipertensos (TG+Sal, $n=7$) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, $n=7$), * $p<0,05$ vs. SD+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Avaliação da inflamação e lesão tubulointersticial

Os ratos TG apresentaram infiltrado inflamatório e degeneração tubular no córtex renal caracterizada por necrose celular e descamação tubular, como avaliado pelo maior escore de Shih ($1,14 \pm 0,08$ vs. $0,06 \pm 0,02$ no SD+Sal; $n=5$, $p<0,001$; Figura 26). De forma relevante, a infusão ICV de alamandina por longo prazo atenuou essas alterações ($0,89 \pm 0,07$ vs. $1,14 \pm 0,08$ no TG+Sal; $n=5-6$, $p<0,05$; Figura 26).

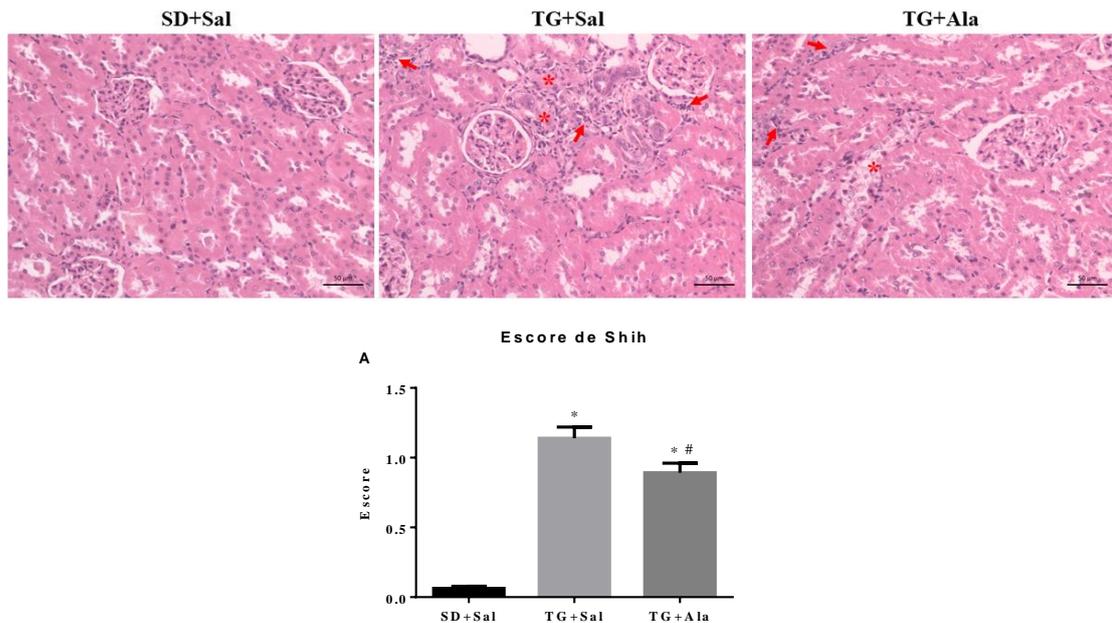


Figura 26 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a inflamação renal de ratos hipertensos TG. Imagens representativas de cortes longitudinais (4 μ m) do rim de ratos controle (SD+Sal, n=5), hipertensos (TG+Sal, n=5) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=6). Em A, valores do escore de Shih de ratos SD+Sal, TG+Sal e TG+Ala. As setas indicam infiltrado inflamatório. Os asteriscos indicam degeneração tubular. * p <0,001 vs. SD+Sal e # p <0,05 vs. TG+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Os ratos TG apresentaram ainda um aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (82,56 \pm 4,24 pg/100 mg de proteína vs. 26,18 \pm 1,66 pg/100 mg de proteína no SD+Sal; n=4-6, p <0,001; Figura 27), IL-6 (79,32 \pm 6,93 pg/100 mg de proteína vs. 28,30 \pm 2,69 pg/100 mg de proteína no SD+Sal; n=4-6, p <0,001; Figura 27) e IL-1 β (66,81 \pm 5,48 pg/100 mg de proteína vs. 19,80 \pm 2,18 pg/100 mg de proteína no SD+Sal; n=4-6, p <0,001; Figura 27). A infusão ICV de alamandina por longo prazo atenuou os níveis de TNF- α (59,01 \pm 2,16 pg/100 mg de proteína vs. 82,56 \pm 4,24 pg/100 mg de proteína no TG+Sal; n=6-7, p <0,001; Figura 27), IL-6 (41,92 \pm 1,92 pg/100 mg de proteína vs. 79,32 \pm 6,93 pg/100 mg de proteína no TG+Sal; n=6-7, p <0,001; Figura 27) e IL-1 β (52,78 \pm 2,80 pg/100 mg de proteína vs. 66,81 \pm 5,48 pg/100 mg de proteína no TG+Sal; n=6-7, p <0,05; Figura 27) no tecido renal. Os níveis de IL-10 não foram alterados nos grupos TG+Sal ou TG+Ala (Figura 27).

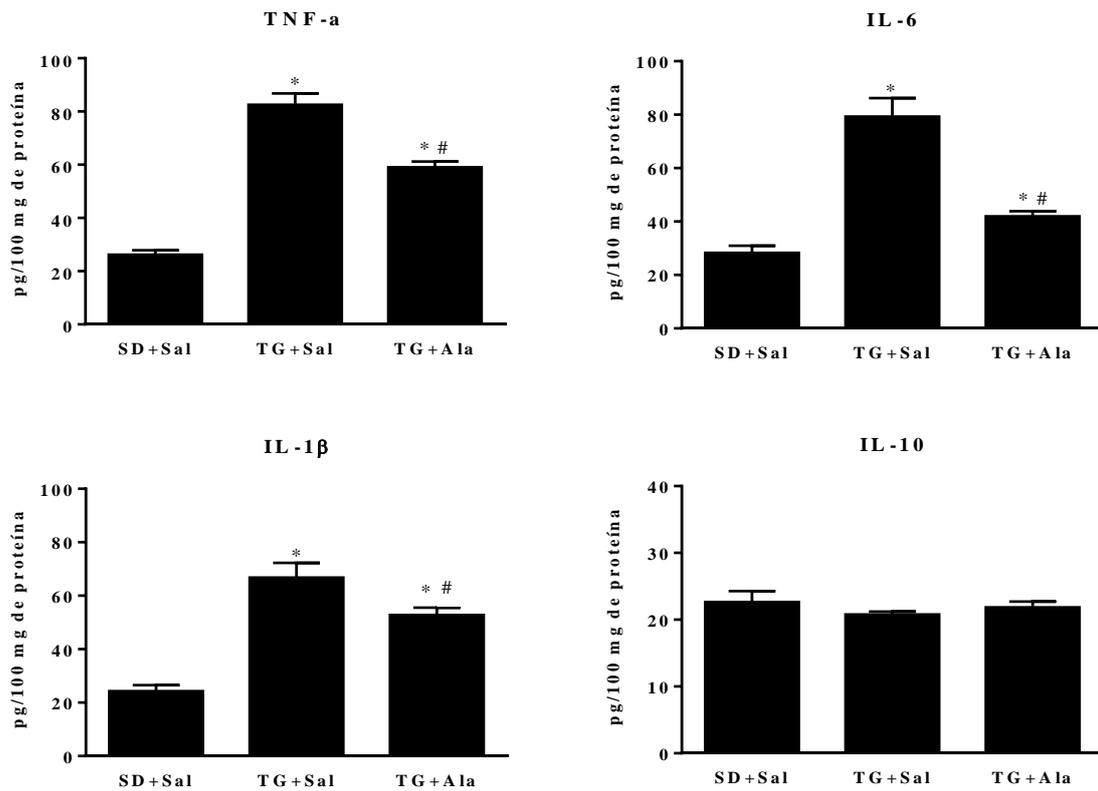


Figura 27 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre os níveis de citocinas no rim de ratos hipertensos TG. Níveis de TNF α , IL-6, IL-1 β e IL-10 no rim de ratos controle (SD+Sal, n=6), hipertensos (TG+Sal, n=4) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=7). * p <0,001 vs. SD+Sal e # p <0,01 vs. TG+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Avaliação da deposição de matriz extracelular

Os ratos TG apresentaram aumento na deposição de colágeno no rim ($22,80 \pm 1,94\%$ vs. $10,39 \pm 0,94\%$ no SD+Sal; n=5, p <0,001; Figura 28) e, de forma interessante, o tratamento com alamandina reverte essa alteração ($12,93 \pm 1,09\%$ vs. $22,80 \pm 1,94\%$ no TG+Sal; n=5, p <0,001; Figura 28).

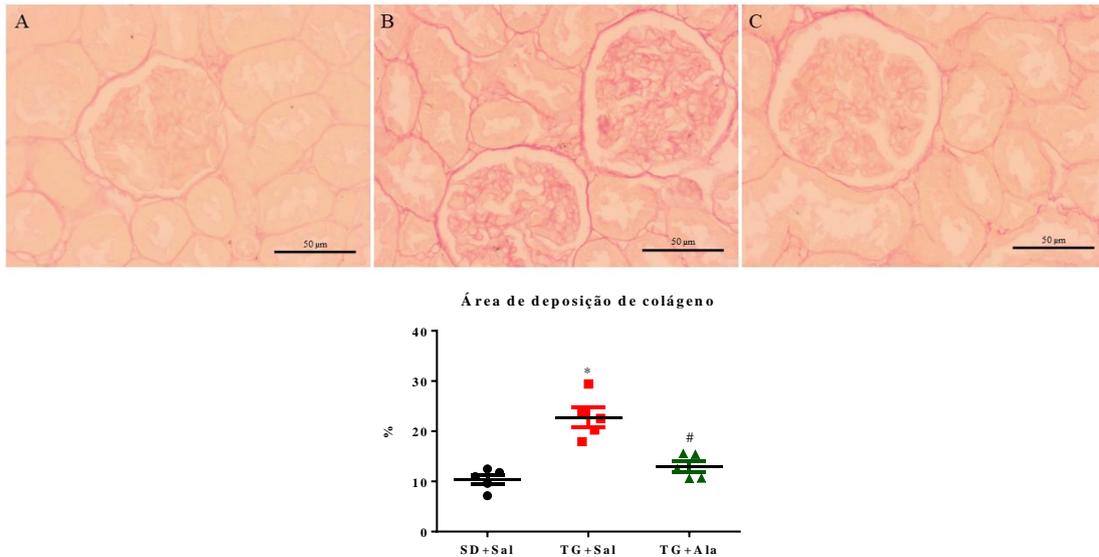


Figura 28 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre deposição de colágeno total no rim de ratos hipertensos TG.

Imagens representativas de cortes longitudinais (4 μ m) do rim de ratos controle (A, SD+Sal, n=5), hipertensos (B, TG+Sal, n=5) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (C, TG+Ala, 200 ng/h, n=5). Em D, quantificação da área total de deposição de colágeno. * $p < 0,001$ vs. SD+Sal, # $p < 0,001$ vs. TG+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste deTukey).

Não observamos diferença entre os grupos na expressão gênica dos colágenos tipos I e IV, fibronectina e TGF- β , conforme pode ser observado na Figura 29. Entretanto, houve aumento na expressão gênica de CTGF no rim dos ratos TG ($1,77 \pm 0,16$ a.u. vs. $1,18 \pm 0,11$ a.u. no SD+Sal; n=10-12 $p < 0,001$; Figura 29) e o tratamento com alamandina não alterou a expressão de CTGF no rim desses animais ($1,41 \pm 0,08$ a.u. vs. $1,77 \pm 0,16$ a.u. no TG+Sal, n=10-11, Figura 29). Além disso, não houve diferença entre os grupos na expressão (mRNA) de NGAL e CD68, marcadores de lesão renal e da presença de macrófagos, respectivamente (Figura 29).

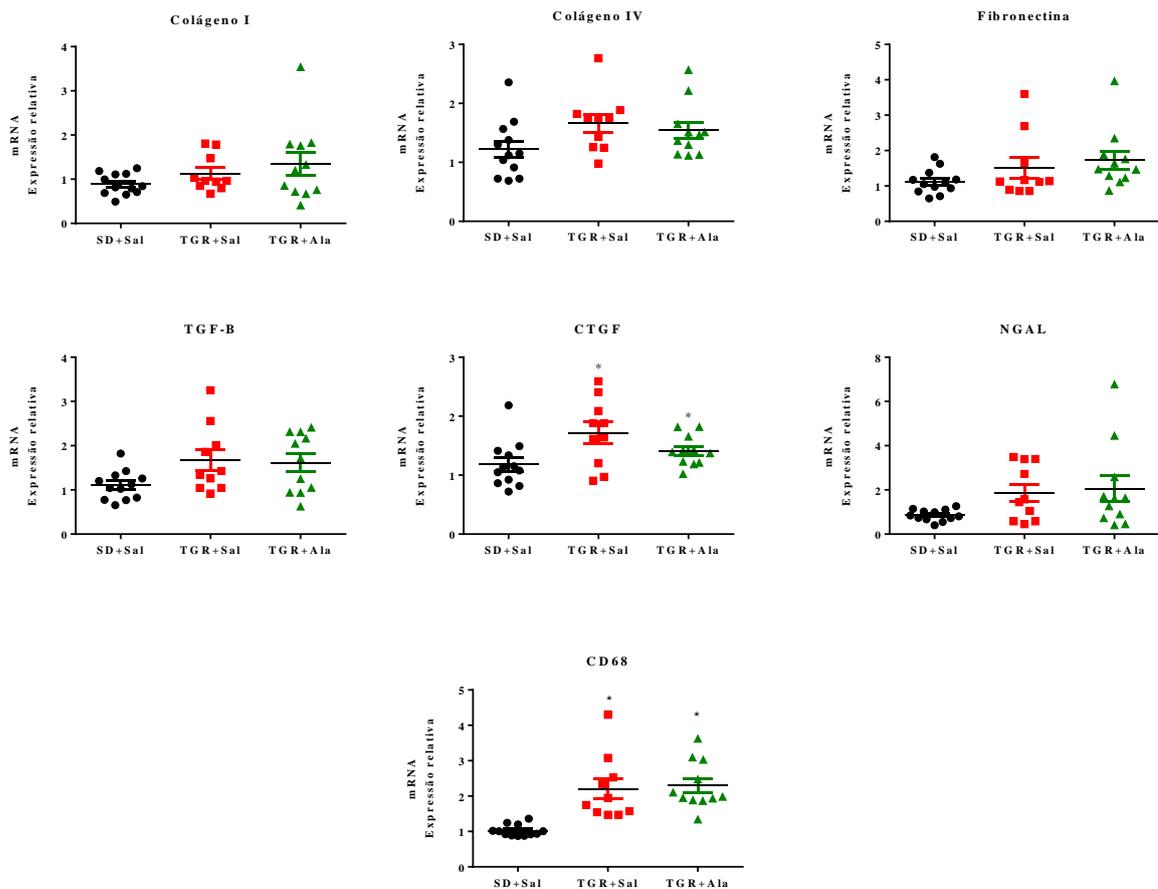


Figura 29 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão de componentes da matriz extracelular no rim de ratos hipertensos TG.

Expressão (mRNA) de colágeno I, III, fibronectina, TGF- β , CTGF, NGAL e CD68 no rim de ratos controle (SD+Sal, n=12), hipertensos (TG+Sal, n=10) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=11). * $p < 0,05$ vs. grupo SD+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Avaliação da função renal

Com o objetivo de avaliar o efeito da infusão ICV de alamandina sobre a função renal de ratos TG, avaliamos a albuminúria e a relação albumina/creatinina na urina dos animais. Não houve diferença entre grupos com relação a esses parâmetros de função renal (Figuras 30-A e 30-B).

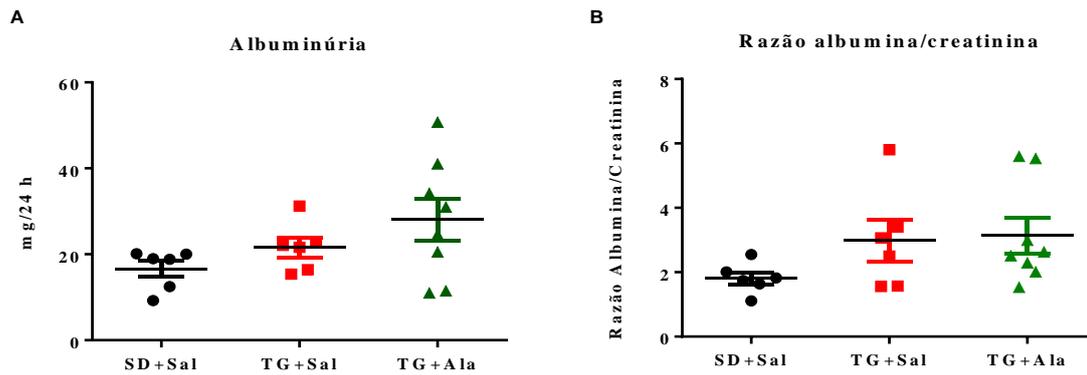


Figura 30 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a função renal de ratos hipertensos TG. Níveis de albumina (A) e razão albumina/creatinina (B) na urina de ratos controle (SD+Sal, n=6), hipertensos (TG+Sal, n=6) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=8). Não houve diferença entre os grupos (One-way ANOVA).

Avaliação da expressão gênica de componentes do SRA

Como pode ser observado na Figura 31, ratos TG apresentaram redução na expressão de ECA ($0.69 \pm 0,04$ a.u. vs. $0,97 \pm 0,04$ a.u. no SD+Sal; n=8-10, $p < 0,05$; Figura 31) e ECA2 ($0.62 \pm 0,05$ a.u. vs. $0,93 \pm 0,02$ a.u. no SD+Sal; n=8-10, $p < 0,0001$; Figura 31) no rim. O tratamento com alamandina atenuou a reduzida expressão de ECA2 observada no rim desses animais ($0.78 \pm 0,04$ a.u. vs. $0.62 \pm 0,05$ a.u. no TG+Sal; n=7-8, $p < 0,05$; Figura 31).

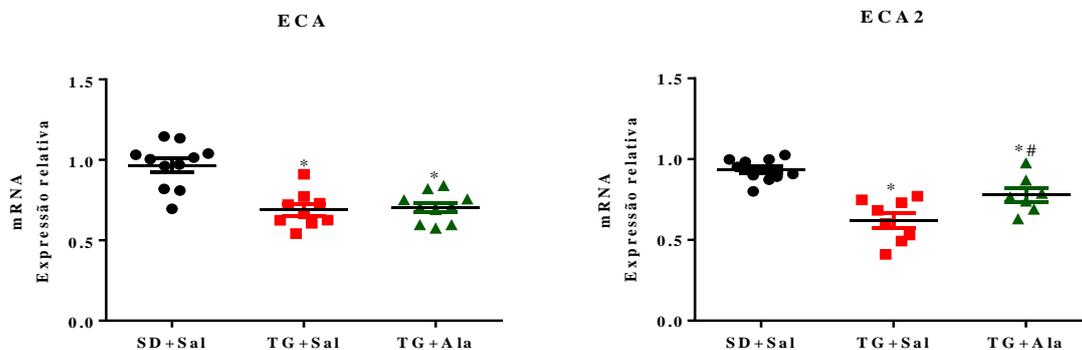


Figura 31 - Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão de componentes do SRA no rim de ratos hipertensos TG.

Expressão (mRNA) das enzimas ECA e ECA2 no rim de animais controle (SD+Sal, n=10), hipertensos (TG+Sal, n=8) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=7). * $p < 0,05$ vs. Grupo SD+Sal e # $p < 0,05$ vs. TG+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey). n=9-12,

A Tabela 7 sumariza os efeitos da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o rim de ratos TG.

Tabela 7 - Efeito da infusão ICV de alamandina (200 ng/h) por longo prazo sobre o rim de ratos TG.

Parâmetro avaliado	TG+Sal	TG+Ala	TG+Ala
	vs. SD+Sal	vs. TG+Sal	vs. SD+Sal
KW/BW	↑	ND	↑
KW/TL	↑	ND	↑
Escore de Shih	↑	↓	↑
TNF- α	↑	↓	↑
IL-6	↑	↓	↑
IL-1 β	↑	↓	↑
IL-10	ND	ND	ND
Deposição de matriz extracelular	↑	↓	ND
Colágeno I (mRNA)	ND	ND	ND
Colágeno IV (mRNA)	ND	ND	ND
Fibronectina (mRNA)	ND	ND	ND
TGF- β (mRNA)	ND	ND	ND
CTGF (mRNA)	↑	ND	↑
NGAL	ND	ND	ND
CD68	↑	ND	↑
Albuminúria	ND	ND	ND
Albumina/Creatinina	ND	ND	ND
ECA (mRNA)	↓	ND	↓
ECA2 (mRNA)	↓	↑	↓

KW/BW: peso do rim corrigido pelo peso corporal; KW/TL: peso do rim corrigido pelo comprimento da tibia; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina 6; IL-1 β : interleucina 1- β ; IL-10: interleucina 10; TGF- β : fator de transformação do crescimento beta; CTGF: fator de crescimento do tecido conjuntivo; NGAL: lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos; CD68: proteína presente em macrófagos; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; ND: não há diferença entre os grupos; ↑ indica que o parâmetro está aumentado no primeiro grupo; ↓ indica que o parâmetro está reduzido no primeiro grupo.

5.5. Avaliação do efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o cérebro de ratos hipertensos TGR(mREN2)27

5.5.1. RNASeq

5.5.1.1. Perfil de expressão gênica no SNC

Grupos experimentais

Para a realização desse protocolo, ratos SD e TG com 12 semanas de idade no início do tratamento foram divididos nos seguintes grupos:

SD+Sal: ratos SD submetidos à infusão ICV de salina estéril (0,25 μ L/h) por 28 dias.

TG+Sal: ratos TG submetidos à infusão ICV de salina estéril (0,25 μ L/h) por 28 dias.

TG+Ala: ratos TG submetidos à infusão ICV de alamandina (200 ng/h, 0,25 μ L/h) por 28 dias.

Protocolo

Inicialmente, a PA dos animais hipertensos foi mensurada a partir da pletismografia de cauda e os animais foram então divididos entre grupos de forma a manter a PA homogênea entre os grupos. Em seguida, foi realizada a cirurgia estereotáxica para a canulação do ventrículo lateral do cérebro e a infusão ICV de alamandina por longo prazo foi realizada a partir de mini-bombas osmóticas acopladas à cânula ICV. Após 28 dias de infusão, os animais foram eutanasiados e, o encéfalo dos animais, coletado. Posteriormente, o RNA total de todo o encéfalo foi extraído e utilizado para a avaliação do perfil de expressão gênica pela técnica de RNASeq (Figura 32).

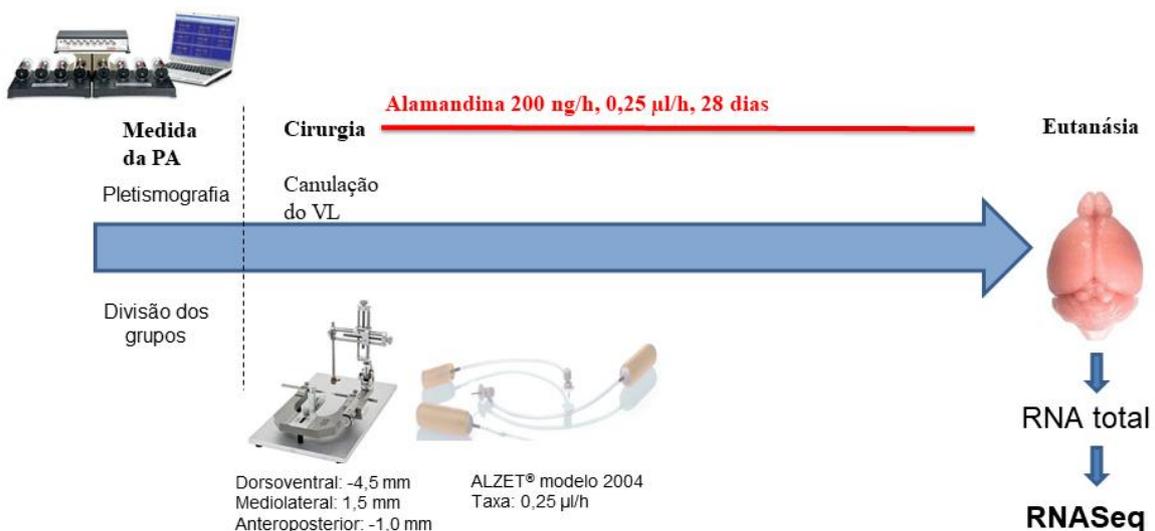


Figura 32 - Protocolo experimental para a avaliação do perfil de expressão gênica no SNC de ratos SD, TG e TG tratados com alamandina por 28 dias.

Protocolo experimental para a avaliação do perfil de expressão gênica no SNC de ratos SD (n=2), TG (n=3) e TG tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=3).

Resultados

Na tentativa de identificar mecanismos centrais envolvidos nos efeitos da infusão ICV de alamandina, investigamos o perfil de expressão gênica no encéfalo pela técnica de RNASeq. Identificamos 283 genes com expressão alterada no SNC de ratos TG em relação ao SNC de ratos SD, como pode ser observado na Figura 33 e Tabela 8.

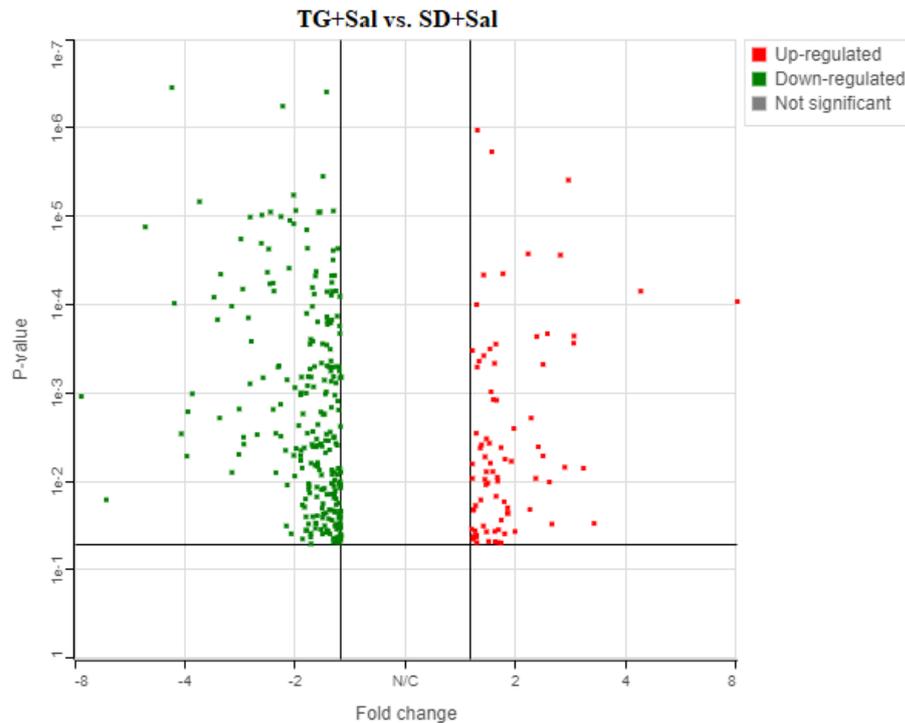


Figura 33 - Volcano plot mostrando o número genes com expressão aumentada (up-regulated, à direita, em vermelho) e diminuída (down regulated, à esquerda, em verde) no SNC de ratos TG (TG+Sal) em relação ao SNC de ratos SD (SD+Sal).

Tabela 8 - Genes com expressão alterada no encéfalo de ratos TG.

Gene Symbol	log2	Gene definition
	(fold change) TG+SalxSD+Sal	
FAM111A	-7.68	Family With Sequence Similarity 111 Member A
HSPA1A	-6.56	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1A
TMEM158	-5.14	Transmembrane Protein 158 (Gene/Pseudogene)
SCAND1	-4.35	SCAN Domain Containing 1
SLC6A2	-4.28	Solute Carrier Family 6 Member 2
RBM39	-4.10	RNA Binding Motif Protein 39
KBTBD7	-3.96	Kelch Repeat And BTB Domain Containing 7
SRM	-3.93	Spermidine Synthase
DBH	-3.83	Dopamine Beta-Hydroxylase
ZFP771	-3.66	Zinc finger protein 771
FAM43B	-3.34	Family With Sequence Similarity 43 Member B

Tabela 8 - Continuação

DR1	-3.26	Down-Regulator Of Transcription 1
TRNP1	-3.20	TMF1-Regulated Nuclear Protein 1
GPR62	-2.99	G Protein-Coupled Receptor 62
CCDC177	-2.86	Coiled-Coil Domain Containing 177
EXOSC6	-2.85	Exosome Component 6
PRR7	-2.82	Proline Rich 7, Synaptic
SHISA8	-2.79	Shisa Family Member 8
CEBPB	-2.77	CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta
GPR27	-2.77	G Protein-Coupled Receptor 27
KLF13	-2.69	Kruppel Like Factor 13
BASP1	-2.66	Brain Abundant Membrane Attached Signal Protein 1
SCRT2	-2.66	Scratch Family Transcriptional Repressor 2
PRR18	-2.64	Proline Rich 18
CITED4	-2.55	Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 4
PPP1R14A	-2.48	Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit 14A
KCNK12	-2.47	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 12
WBP11L1	-2.45	WW domain-binding protein 11-like 1
KCNG2	-2.39	Potassium Voltage-Gated Channel Modifier Subfamily G Member 2
ENDOG	-2.37	Endonuclease G
FSCN1	-2.34	Fascin Actin-Bundling Protein 1
IER5L	-2.30	Immediate Early Response 5 Like
INAFM1	-2.29	InaF Motif Containing 1
ANKRD63	-2.27	Ankyrin Repeat Domain 63
GTPBP6	-2.23	GTP Binding Protein 6 (Putative)
HNRNPA0	-2.22	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A0
EID2	-2.20	EP300 Interacting Inhibitor Of Differentiation 2
FOXO6	-2.19	Forkhead Box O6
BEST1	-2.17	Bestrophin 1
H2AFJ	-2.11	H2A Histone Family Member J
TBCB	-2.11	Tubulin Folding Cofactor B
NKX6-2	-2.08	NK6 Homeobox 2
C1QTNF4	-2.07	C1q And TNF Related 4
TRIM45	-2.06	Tripartite Motif Containing 45
EGR4	-2.03	Early Growth Response 4
CDK5R2	-2.02	Cyclin Dependent Kinase 5 Regulatory Subunit 2
SPRN	-2.01	Shadow Of Prion Protein
IGFBP2	-2.00	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2
TTR	-1.99	Transthyretin
UNCX	-1.96	UNC Homeobox
ADRB1	-1.94	Adrenoceptor Beta 1
CHI3L1	-1.94	Chitinase 3 Like 1

Tabela 8 - Continuação

MAP3K19	-1.94	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 19
LINGO3	-1.93	Leucine Rich Repeat And Ig Domain Containing 3
NPPA	-1.93	Natriuretic Peptide A
ZFP580	-1.93	Zinc finger protein 580
HOXB5	-1.92	Homeobox B5
MYH2	-1.92	Myosin Heavy Chain 2
ACTG1	-1.91	Actin Gamma 1
CECR6	-1.91	Cat eye syndrome chromosome region, candidate 6
CYB561A3	-1.89	Cytochrome B561 Family Member A3
SOX12	-1.88	SRY-Box 12
CHADL	-1.87	Chondroadherin Like
FAM109A	-1.87	Family With Sequence Similarity 109 Member A
HDAC6	-1.87	Histone Deacetylase 6
PDCD5	-1.87	Programmed Cell Death 5
PIM1	-1.87	Pim-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
CDKN1C	-1.86	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C
TPGS1	-1.86	Tubulin Polyglutamylase Complex Subunit 1
FBXL15	-1.85	F-Box And Leucine Rich Repeat Protein 15
CCDC92B	-1.84	Coiled-coil domain containing 92B
ZFP939	-1.84	Zinc finger protein 939
CYP27A1	-1.83	Cytochrome P450 Family 27 Subfamily A Member 1
NT5C	-1.83	5', 3'-Nucleotidase, Cytosolic
RPRML	-1.83	Reprimo Like
CHDH	-1.82	Choline Dehydrogenase
DNALI1	-1.82	Dynein Axonemal Light Intermediate Chain 1
LOXL1	-1.82	Lysyl Oxidase Like 1
SCX	-1.82	Scleraxis BHLH Transcription Factor
SOX11	-1.82	SRY-Box 11
HAUS4	-1.80	HAUS Augmin Like Complex Subunit 4
JUND	-1.80	JunD Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
PRDM8	-1.80	PR/SET Domain 8
ZBED5	-1.80	Zinc Finger BED-Type Containing 5
ZFP503	-1.80	Zinc finger protein 503
H1FX	-1.79	H1 Histone Family Member X
GPR26	-1.78	G Protein-Coupled Receptor 26
METRN	-1.78	Meteorin, Glial Cell Differentiation Regulator
LMX1A	-1.77	LIM Homeobox Transcription Factor 1 Alpha
OXT	-1.77	Oxytocin/Neurophysin I Prepropeptide
SOWAHA	-1.77	Sosondowah Ankyrin Repeat Domain Family Member A
CACNG8	-1.76	Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Gamma 8
KCNJ13	-1.76	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 13

Tabela 8 - Continuação

PRLR	-1.76	Prolactin Receptor
AVP	-1.75	Arginine Vasopressin
CD99	-1.75	CD99 Molecule (Xg Blood Group)
PNPLA1	-1.75	Patatin Like Phospholipase Domain Containing 1
SDR42E1	-1.75	Short Chain Dehydrogenase/Reductase Family 42E, Member 1
HTR6	-1.74	5-Hydroxytryptamine Receptor 6
MYH7	-1.74	Myosin Heavy Chain 7
SLC5A11	-1.74	Solute Carrier Family 5 Member 11
GJC2	-1.73	Gap Junction Protein Gamma 2
DAPK3	-1.72	Death Associated Protein Kinase 3
LRRC10B	-1.72	Leucine Rich Repeat Containing 10B
GSTM6	-1.71	Glutathione S-transferase, mu 6
MSX1	-1.71	Msh Homeobox 1
NEURL1B	-1.71	Neuralized E3 Ubiquitin Protein Ligase 1B
BTBD17	-1.70	BTB Domain Containing 17
CREG2	-1.70	Cellular Repressor of E1A Stimulated Genes 2
SDF2L1	-1.70	Stromal Cell Derived Factor 2 Like 1
ANKRD9	-1.69	Ankyrin Repeat Domain 9
LINGO4	-1.69	Leucine Rich Repeat And Ig Domain Containing 4
MAPK15	-1.69	Mitogen-Activated Protein Kinase 15
MFSD7	-1.69	Major Facilitator Superfamily Domain Containing 7
MXRA7	-1.69	Matrix Remodeling Associated 7
NEWGENE_1305281	-1.69	Hippocampus abundant transcript 1
SST	-1.69	Somatostatin
TMEM160	-1.69	Transmembrane Protein 160
SLC4A5	-1.68	Solute Carrier Family 4 Member 5
VSIG10L	-1.68	V-Set And Immunoglobulin Domain Containing 10 Like
LRRC46	-1.67	Leucine Rich Repeat Containing 46
OCEL1	-1.67	Occludin/ELL Domain Containing 1
PDF	-1.67	Peptide Deformylase, Mitochondrial
NUDT8	-1.66	Nudix Hydrolase 8
PIGZ	-1.66	Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class Z
PURA	-1.66	Purine Rich Element Binding Protein A
BOLA1	-1.65	BolA Family Member 1
CHCHD2	-1.65	Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 2
CHRNA3	-1.65	Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 3 Subunit
SIX3	-1.65	SIX Homeobox 3
ADRA1D	-1.64	Adrenoceptor Alpha 1D
ADRA2C	-1.64	Adrenoceptor Alpha 2C
FJX1	-1.64	Four Jointed Box 1
JPH4	-1.64	Junctophilin 4
KCNE5	-1.64	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 5

Tabela 8 - Continuação

SCRT1	-1.64	Scratch Family Transcriptional Repressor 1
SEC31B	-1.64	SEC31 Homolog B, COPII Coat Complex Component
LRRC56	-1.63	Leucine Rich Repeat Containing 56
MST1R	-1.63	Macrophage Stimulating 1 Receptor
APOC1	-1.62	Apolipoprotein C1
LRRC38	-1.62	Leucine Rich Repeat Containing 38
SEMA6C	-1.62	Semaphorin 6C
SOSTDC1	-1.62	Sclerostin Domain Containing 1
DNAI1	-1.61	Dynein Axonemal Intermediate Chain 1
SPRED3	-1.61	Sprouty Related EVH1 Domain Containing 3
TMEM151B	-1.61	Transmembrane Protein 151B
ZFP579	-1.61	Zinc finger protein 579
BORCS6	-1.60	BLOC-1 Related Complex Subunit 6
CLIC6	-1.60	Chloride Intracellular Channel 6
IRX1	-1.60	Iroquois Homeobox 1
KCNS1	-1.60	Potassium Voltage-Gated Channel Modifier Subfamily S Member 1
NFKBIL1	-1.60	NFKB Inhibitor Like 1
RBP4	-1.60	Retinol Binding Protein 4
RTN4RL2	-1.60	Reticulon 4 Receptor Like 2
TAF10	-1.60	TATA-Box Binding Protein Associated Factor 10
ALS2CL	-1.59	ALS2 C-Terminal Like
EIF4G1	-1.59	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 Gamma 1
KL	-1.59	Klotho
LHB	-1.59	Luteinizing Hormone Beta Polypeptide
MACROD1	-1.59	MACRO Domain Containing 1
NR2F6	-1.59	Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 6
STRA6	-1.59	Stimulated By Retinoic Acid 6
UBE3D	-1.59	Ubiquitin Protein Ligase E3D
CPZ	-1.58	Carboxypeptidase Z
CROCC	-1.58	Ciliary Rootlet Coiled-Coil, Rootletin
IRF2BP2	-1.58	Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 2
KCNJ10	-1.58	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 10
MAZ	-1.58	MYC Associated Zinc Finger Protein
MSL3L2	-1.58	Male-specific lethal 3-like 2
CYP2S1	-1.57	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily S Member 1
GPR150	-1.57	G Protein-Coupled Receptor 150
HAPLN2	-1.57	Hyaluronan And Proteoglycan Link Protein 2
NDUFAF6	-1.57	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Complex Assembly Factor 6
ZFP575	-1.57	Zinc finger protein 575
CARTPT	-1.56	CART Prepropeptide
CCDC153	-1.56	Coiled-Coil Domain Containing 153

Tabela 8 - Continuação

CFAP44	-1.56	Cilia And Flagella Associated Protein 44
SCARF2	-1.56	Scavenger Receptor Class F Member 2
BHLHE22	-1.55	Basic Helix-Loop-Helix Family Member E22
HBB	-1.55	Hemoglobin Subunit Beta
IL12RB2	-1.55	Interleukin 12 Receptor Subunit Beta 2
PHOSPHO1	-1.55	Phosphoethanolamine/Phosphocholine Phosphatase
RT1-DMB	-1.55	RT1 class II, locus DMb
TJP3	-1.55	Tight Junction Protein 3
TRIM67	-1.55	Tripartite Motif Containing 67
ZFP7	-1.55	Zinc finger protein 7
ZNRF1	-1.55	Zinc And Ring Finger 1
CERS1	-1.54	Ceramide Synthase 1
CRH	-1.54	Corticotropin Releasing Hormone
DLEC1	-1.54	Deleted In Lung And Esophageal Cancer 1
RSPH1	-1.54	Radial Spoke Head 1 Homolog
SYS1	-1.54	SYS1, Golgi Trafficking Protein
THEM6	-1.54	Thioesterase Superfamily Member 6
FAM171A2	-1.53	Family With Sequence Similarity 171 Member A2
FLVCR1	-1.53	Feline Leukemia Virus Subgroup C Cellular Receptor 1
KRT8	-1.53	Keratin 8
ZFP316	-1.53	Zinc finger protein
F8A1	-1.52	Coagulation Factor VIII Associated 1
FBRSL1	-1.52	Fibrosin Like 1
GLRX5	-1.52	Glutaredoxin 5
MFSD3	-1.52	Major Facilitator Superfamily Domain Containing 3
NDUFS5	-1.52	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit S5
PCDH8	-1.52	Protocadherin 8
PPP1R32	-1.52	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 32
PRR22	-1.52	Proline Rich 22
RAB11FIP1	-1.52	RAB11 Family Interacting Protein 1
TP53I13	-1.52	Tumor Protein P53 Inducible Protein 13
VMAC	-1.52	Vimentin Type Intermediate Filament Associated Coiled-Coil Protein
ASIC2	-1.51	Acid Sensing Ion Channel Subunit 2
BMYC	-1.51	Brain expressed myelocytomatosis oncogene
CCDC108	-1.51	Cilia and flagella associated protein 65
CFAP126	-1.51	Cilia And Flagella Associated Protein 126
CREB3L1	-1.51	CAMP Responsive Element Binding Protein 3 Like 1
HTR7	-1.51	5-Hydroxytryptamine Receptor 7
KCNE2	-1.51	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 2
MCART1	-1.51	Mitochondrial carrier triple repeat 1
PTGER1	-1.51	Prostaglandin E Receptor 1
SLC1A5	-1.51	Solute Carrier Family 1 Member 5

Tabela 8 - Continuação

TMEM203	-1.51	Transmembrane Protein 203
ZFP92	-1.51	ZFP92 Zinc Finger Protein
NDUFB2	-1.50	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B2
CLEC2G	1.52	C-type lectin domain family 2, member G
EEF2KMT	1.52	Eukaryotic Elongation Factor 2 Lysine Methyltransferase
PARP14	1.52	Poly(ADP-Ribose) Polymerase Family Member 14
PCDHGA2	1.52	Protocadherin Gamma Subfamily A, 2
PPARA	1.52	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha
CASP1	1.53	Caspase 1
SLFN2	1.53	Schlafen 2
PKMYT1	1.54	Protein Kinase, Membrane Associated Tyrosine/Threonine 1
DTX3L	1.55	Deltex E3 Ubiquitin Ligase 3L
P2RX4	1.55	Purinergic Receptor P2X 4
ACER2	1.56	Alkaline Ceramidase 2
BCHE	1.56	Butyrylcholinesterase
RPL10A	1.56	Ribosomal Protein L10a
SLC7A11	1.56	Solute Carrier Family 7 Member 11
STIL	1.56	STIL, Centriolar Assembly Protein
PEX11A	1.58	Peroxisomal Biogenesis Factor 11 Alpha
AADAT	1.59	Amino adipate Aminotransferase
CCDC191	1.60	Coiled-coil domain containing 191
CCNT1	1.60	Cyclin T1
BCL6B	1.62	B-Cell CLL/Lymphoma 6B
TNFRSF11B	1.63	TNF Receptor Superfamily Member 11b
FAM50A	1.64	Family With Sequence Similarity 50 Member A
IL18	1.64	Interleukin 18
SLC22A3	1.65	Solute Carrier Family 22 Member 3
TNFSF10	1.65	TNF Superfamily Member 10
WNT2B	1.66	Wnt Family Member 2B
SRPX	1.67	Sushi Repeat Containing Protein, X-Linked
B3GNT5	1.69	UDP-GlcNAc:BetaGal Beta-1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase 5
NR4A1	1.69	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1
ERG	1.70	ERG, ETS Transcription Factor
AGMO	1.72	Alkylglycerol Monooxygenase
KLF4	1.73	Kruppel Like Factor 4
ABCG3L3	1.74	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 3-like 3
HEPH	1.74	Hephaestin
OAS1A	1.75	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A
CYP4D3	1.76	Cytochrome P450, family 4, subfamily v, polypeptide 3
SULT1A1	1.76	Sulfotransferase Family 1A Member 1
SLFN3	1.78	Schlafen 3

Tabela 8 - Continuação

SH3RF2	1.79	SH3 Domain Containing Ring Finger 2
RPS10	1.81	Ribosomal Protein S10
MGC108823	1.82	Interferon-inducible GTPase 1-like
NFKBIZ	1.82	NFKB Inhibitor Zeta
ARC	1.84	Activity Regulated Cytoskeleton Associated Protein
CILP	1.85	Cartilage Intermediate Layer Protein
GBP5	1.86	Guanylate Binding Protein 5
SLC11A1	1.86	Solute Carrier Family 11 Member 1
MT1M	1.90	Metallothionein 1M
IGFBP6	1.97	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 6
CCDC142	1.98	Coiled-Coil Domain Containing 142
CRB1	2.17	Crumbs 1, Cell Polarity Complex Component
PARBPB	2.19	PARP1 Binding Protein
USP18	2.29	Ubiquitin Specific Peptidase 18
IRF7	2.36	Interferon Regulatory Factor 7
MEI1	2.43	Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 1
KBTBD6	2.46	Kelch Repeat And BTB Domain Containing 6
APOLD1	2.63	Apolipoprotein L Domain Containing 1
MT2A	2.71	Metallothionein 2A
NOSTRIN	2.77	Nitric Oxide Synthase Trafficking
IFIT3	2.86	Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 3
ZBTB33	3.04	Zinc Finger And BTB Domain Containing 33
PLAC8	3.25	Placenta Specific 8
CCDC77	4.36	Coiled-Coil Domain Containing 77

Valores negativos de 'Fold change' indicam que o gene está menos expresso no SNC de ratos TG em relação ao SNC de ratos SD. Valores positivos de 'Fold change' indicam que o gene está mais expresso no SNC de ratos TG em relação ao SNC de ratos SD.

É importante destacar que, de acordo com a análise de anotação funcional realizada na plataforma Panther (Tabela 9), alguns desses genes estão relacionados à regulação da PA: *KL*, que codifica a proteína *Klotho*, expressa em células nos túbulos contorcidos distais no rim e em células do plexo coriário no cérebro; *Crh*, que codifica o hormônio liberador de corticotrofina no hipotálamo; *Adra1d*, que codifica o receptor adrenérgico alfa 1D; *Adrb1*, que codifica o receptor adrenérgico beta 1; *Oxt*, que codifica o hormônio ocitocina/neurofisina; *Nppa*, que codifica os peptídeos natriuréticos; e *Ppara*, que codifica o “Peroxisome proliferator-activated receptor-alfa”, um fator de transcrição nuclear envolvido na inflamação; *Slc4a5*, que codifica o cotransportador sódio-bicarbonato; *P2rx4*, que codifica o receptor purinérgico P2X4; *Sult1a1*, que codifica a sulfotransferase *SULT1A1*, enzima envolvida no catabolismo da conjugação sulfato de muitos hormônios, neurotransmissores, drogas e xenobióticos; e *Avp*, o gene que

codifica o hormônio vasopressina. A expressão desses genes está reduzida no SNC dos ratos TG, com exceção dos genes Ppara, P2rx4 e Sult1A1, cuja expressão está aumentada no SNC desses ratos.

Tabela 9 - Anotação funcional dos genes com expressão alterada no SNC de ratos TG em relação ao encéfalo de ratos SD.

GO biological process complete	Rattus norvegicus (REF)		TG+Sal vs. SD+Sal				
	# of genes	# of genes in TG+Sal	Expected (#)	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
Negative regulation of blood pressure	61	8	.92	8.72	+	8.12x10 ⁻⁶	1.27x10 ⁻²
↳regulation of blood pressure	184	14	2.77	5.06	+	1.64x10 ⁻⁶	3.65x10 ⁻³
↳blood circulation	381	22	5.73	3.84	+	1.76x10 ⁻⁷	6.90x10 ⁻⁴
↳circulatory system process	386	22	5.80	3.79	+	2.18x10 ⁻⁷	6.82x10 ⁻⁴
learning or memory	293	16	4.41	3.63	+	1.66x10 ⁻⁵	2.17x10 ⁻²
↳behavior	661	25	9.94	2.52	+	3.62x10 ⁻⁵	4.04x10 ⁻²
regulation of ion transport	655	26	9.85	2.64	+	1.13x10 ⁻⁵	1.61x10 ⁻²
response to drug	1262	41	18.98	2.16	+	4.82x10 ⁻⁶	8.37x10 ⁻³
regulation of multicellular organismal process	2777	69	41.76	1.65	+	2.80x10 ⁻⁵	3.37x10 ⁻²
detection of chemical stimulus involved in sensory perception of smell	1149	0	17.28	< 0.01	-	4.45x10 ⁻⁸	2.32x10 ⁻⁴
↳detection of chemical stimulus involved in sensory perception	1203	0	18.09	< 0.01	-	1.97x10 ⁻⁸	1.54x10 ⁻⁴
↳sensory perception of chemical stimulus	1350	3	20.30	.15	-	3.62x10 ⁻⁶	7.08x10 ⁻³
↳detection of chemical stimulus	1232	0	18.53	< 0.01	-	1.32x10 ⁻⁸	2.07x10 ⁻⁴
↳sensory perception of smell	1186	1	17.84	.06	-	3.97x10 ⁻⁷	1.04x10 ⁻³

Foram identificados 122 genes com expressão alterada no SNC de ratos TG que receberam a infusão ICV de alamandina em relação ao SNC de ratos TG que receberam a infusão ICV de salina (Figura 34 e Tabela 10).

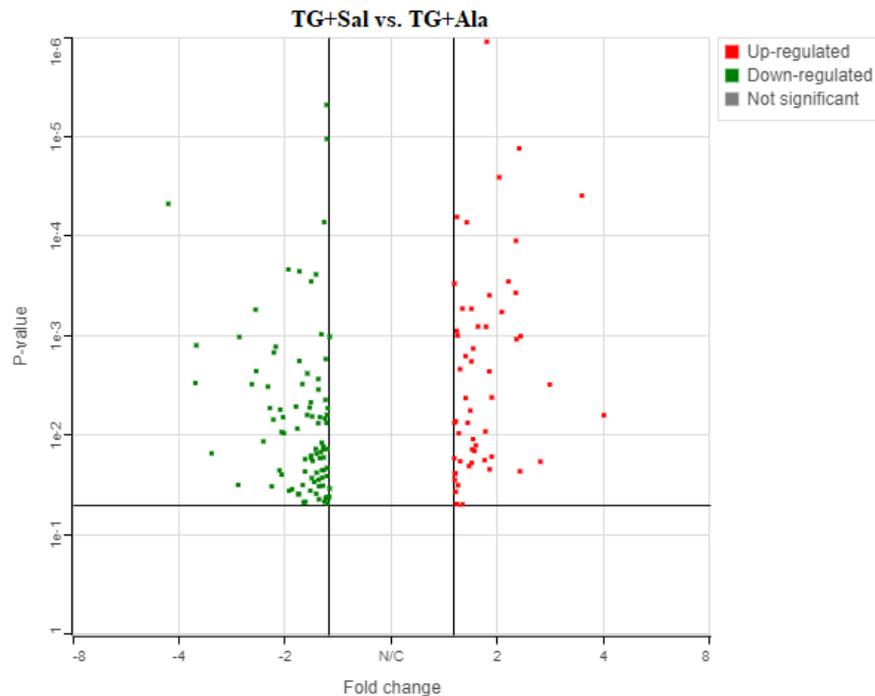


Figura 34 - Volcano plot mostrando o número de genes com expressão aumentada (up-regulated, à direita em vermelho) e diminuída (down regulated, à esquerda, em verde) no SNC de ratos TG (TG+Sal) em relação ao SNC de ratos TG tratados com alamandina (200 ng/h, TG+Ala) por 28 dias.

Tabela 10 - Genes com expressão alterada no encéfalo de ratos TG tratados com alamandina (200 ng/h; TG+Ala) por 28 dias.

Gene Symbol	log ₂ (fold change) TG+SalxTG+Ala	Gene definition
Slc6a2	-4.29	Solute Carrier Family 6 Member 2
Fam111a	-3.60	Family With Sequence Similarity 111 Member A
Dbh	-3.58	Dopamine Beta-Hydroxylase
Cyr61	-3.24	Cysteine Rich Angiogenic Inducer 61
Lrg1	-2.70	Leucine Rich Alpha-2-Glycoprotein 1
Hdac6	-2.49	Histone Deacetylase 6
Epsti1	-2.42	Epithelial Stromal Interaction 1
Mx1	-2.31	MX Dynamin Like GTPase 1
Ifi47	-2.21	Interferon gamma inducible protein 47
Slfn3	-2.19	Schlafen 3
Psmb8	-2.17	Proteasome Subunit Beta 8
Zfp939	-2.16	Zinc Finger Protein 29
Shisa3	-2.13	Shisa Family Member 3
Spi1	-2.08	Spi-1 Proto-Oncogene
Slc39a12	-2.07	Solute Carrier Family 39 Member 12

Tabela 10 - Continuação

Chdh	-2.05	Choline Dehydrogenase
Csf3r	-2.05	Colony Stimulating Factor 3 Receptor
Hoxb5	-2.03	Homeobox B5
Ccdc142	-2.02	Coiled-Coil Domain Containing 142
Cd93	-1.96	CD93 Molecule
Cebpd	-1.95	CCAAT/Enhancer Binding Protein Delta
Edn1	-1.87	Endothelin 1
C2	-1.84	Complement C2
Btg2	-1.83	BTG Anti-Proliferation Factor 2
Mmp14	-1.83	Matrix Metalloproteinase 14
Gbp2	-1.79	Guanylate Binding Protein 2
Ghdc	-1.79	GH3 Domain Containing
Cyp1b1	-1.76	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily B Member 1
Pik3ap1	-1.76	Phosphoinositide-3-Kinase Adaptor Protein 1
Tlr2	-1.76	Toll Like Receptor 2
Fzd6	-1.74	Frizzled Class Receptor 6
Rt1-ce4	-1.74	RT1 class I, locus CE4
Clca1	-1.71	Chloride Channel Accessory 1
Clic1	-1.70	Chloride Intracellular Channel 1
Slc15a3	-1.70	Solute Carrier Family 15 Member 3
Asap3	-1.69	ArfGAP With SH3 Domain, Ankyrin Repeat And PH Domain 3
Cyth4	-1.69	Cytohesin 4
Sncg	-1.69	Synuclein Gamma
Tifab	-1.69	TIFA Inhibitor
Med22	-1.68	Mediator Complex Subunit 22
Pcdh12	-1.68	Protocadherin 12
Abcc3	-1.64	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 3
Ndst2	-1.64	N-Deacetylase And N-Sulfotransferase 2
Tm4sf1	-1.64	Transmembrane 4 L Six Family Member 1
Adamts1	-1.62	ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif 1
Lox	-1.62	Lysyl Oxidase
Zfp36	-1.62	ZFP36 Ring Finger Protein
Gfap	-1.61	Glial Fibrillary Acidic Protein
Cdhr1	-1.60	Cadherin Related Family Member 1
Tgm2	-1.59	Transglutaminase 2
Cyp27a1	-1.58	Cytochrome P450 Family 27 Subfamily A Member 1
Slc1a5	-1.58	Solute Carrier Family 1 Member 5
Unc93b1	-1.58	Unc-93 Homolog B1, TLR Signaling Regulator
Ikzf1	-1.57	IKAROS Family Zinc Finger 1
Wisp2	-1.57	WNT1 Inducible Signaling Pathway Protein 2
Htr6	-1.56	5-Hydroxytryptamine Receptor 6
Igfbp6	-1.56	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 6
Kdr	-1.56	Kinase Insert Domain Receptor
Pmch	-1.56	Pro-Melanin Concentrating Hormone
Tmem88	-1.56	Transmembrane Protein 88
Mst1r	-1.55	Macrophage Stimulating 1 Receptor
Tuft1	-1.55	Tuftelin 1

Tabela 10 - Continuação

Ankra2	-1.54	Ankyrin Repeat Family A Member 2
Arhgef19	-1.54	Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 19
Bst2	-1.54	Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2
Creb3l1	-1.54	CAMP Responsive Element Binding Protein 3 Like 1
Cd200r1	-1.53	CD200 Receptor 1
Kcnj10	-1.53	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 10
Nt5c	-1.53	5', 3'-Nucleotidase, Cytosolic
Pdcd5	-1.53	Programmed Cell Death 5
Qdpr	-1.53	Quinoid Dihydropteridine Reductase
Tradd	-1.53	TNFRSF1A Associated Via Death Domain
Clec14a	-1.52	C-Type Lectin Domain Containing 14A
Evc2	-1.52	EvC Ciliary Complex Subunit 2
Ddit4l	-1.51	DNA Damage Inducible Transcript 4 Like
Nt5dc2	-1.50	5'-Nucleotidase Domain Containing 2
S1pr3	-1.50	Sphingosine-1-Phosphate Receptor 3
Sfrp4	-1.50	Secreted Frizzled Related Protein 4
Arid4b	1.50	AT-Rich Interaction Domain 4B
Eppin	1.50	Epididymal Peptidase Inhibitor
Lrriq1	1.50	Leucine Rich Repeats And IQ Motif Containing 1
Mertk	1.50	MER Proto-Oncogene, Tyrosine Kinase
Oxt	1.51	Oxytocin/Neurophysin I Prepropeptide
Ppara	1.51	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha
Hfm1	1.52	HFM1, ATP Dependent DNA Helicase Homolog
Wnt2b	1.52	Wnt Family Member 2B
Acacb	1.53	Acetyl-CoA Carboxylase Beta
Prr5	1.53	Proline Rich 5
Aadat	1.56	Amino adipate Aminotransferase
Prorsd1	1.56	prolyl-tRNA synthetase associated domain containing 1
Per2	1.58	Period Circadian Clock 2
Ptger3	1.58	Prostaglandin E Receptor 3
Ttl9	1.61	Tubulin Tyrosine Ligase Like 9
Eya1	1.62	EYA Transcriptional Coactivator And Phosphatase 1
Dbp	1.63	D-Box Binding PAR BZIP Transcription Factor
Rps2-ps2	1.67	Ribosomal protein S2, pseudogene 2
Ephx2	1.68	Epoxide Hydrolase 2
Lims2	1.68	LIM Zinc Finger Domain Containing 2
Mns1	1.70	Meiosis Specific Nuclear Structural 1
Tfcp2l1	1.70	Transcription Factor CP2 Like 1
Ccdc77	1.71	Coiled-Coil Domain Containing 77
Tc2n	1.73	Tandem C2 Domains, Nuclear
Eva1a	1.75	Eva-1 Homolog A, Regulator Of Programmed Cell Death
Cubn	1.84	Cubilin
Tinag1l	1.84	Tubulointerstitial Nephritis Antigen Like 1
Hmgcs2	1.86	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 2
Pdk4	1.88	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4
Ciart	1.89	Circadian Associated Repressor of Transcription

Tabela 10 - Continuação

Zfp14	1.89	ZFP14 Zinc Finger Protein
Map3k6	1.91	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 6
Sult5a1	1.92	Sulfotransferase family 5A, member 1
Zbtb16	2.13	Zinc Finger And BTB Domain Containing 16
Gpatch4	2.24	G-Patch Domain Containing 4
Rps10	2.24	Ribosomal Protein S10
Avp	2.25	Arginine Vasopressin
Sult1a1	2.29	Sulfotransferase Family 1A Member 1
Zmiz2	2.30	Zinc Finger MIZ-Type Containing 2
Gpd1	2.31	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1
Fmo2	2.63	Flavin Containing Monooxygenase 2
Eif5b	2.79	Eukaryotic Translation Initiation Factor 5B
Slc19a3	3.45	Solute Carrier Family 19 Member 3
Rbm39	3.98	RNA Binding Motif Protein 39

Valores negativos de 'Fold change' indicam que o gene está mais expresso no SNC de ratos TG+Ala em relação ao SNC de ratos TG+Sal. Valores positivos de 'Fold change' indicam que o gene está menos expresso no SNC de ratos TG+Ala em relação ao SNC de ratos TG+Sal.

A partir da análise de anotação funcional, identificamos alguns genes relacionados à regulação da PA. Destaca-se os seguintes genes: *Dbh*, que codifica a enzima dopamina beta-hidroxilase, enzima responsável pela síntese de noradrenalina a partir de dopamina; *Oxt*; *Ppara*; *Avp*; *Edn1*, que codifica o peptídeo endotelina; e *Per2*, relacionado ao ritmo circadiano (Tabela 11). A infusão ICV de alamandina reduziu a expressão desses genes no SNC de ratos TG, com exceção dos genes *Dbh* e *Edn1*, cuja expressão foi aumentada pela infusão do peptídeo.

Tabela 11 - Anotação funcional dos genes com expressão alterada no SNC de ratos TG em relação ao encéfalo de ratos TG tratados com alamandina (200 ng/h; TG+Ala) por 28 dias.

GO biological process complete	Rattus norvegicus (REF)		TG+Sal vs. TG+Ala				
	# of genes	# of genes in TG+Sal	Expected (#)	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
regulation of blood pressure	184	8	1.20	6.65	+	3.76x10 ⁻⁵	4.90x10 ⁻²
↳blood circulation	381	12	2.49	4.82	+	1.02x10 ⁻⁵	2.29x10 ⁻²
↳circulatory system process	386	12	2.52	4.75	+	1.16x10 ⁻⁵	2.27x10 ⁻²
response to steroid hormone	474	15	3.10	4.84	+	7.16x10 ⁻⁷	3.73x10 ⁻³
↳response to lipid	1160	22	7.58	2.90	+	7.75x10 ⁻⁶	2.02x10 ⁻²
↳response to organic cyclic compound	1250	25	8.17	3.06	+	6.56x10 ⁻⁷	5.13x10 ⁻³
↳response to hormone	1161	24	7.59	3.16	+	6.40x10 ⁻⁷	1.00x10 ⁻²
↳response to endogenous stimulus	1616	26	10.57	2.46	+	1.87x10 ⁻⁵	3.25x10 ⁻²
regulation of body fluid levels	363	11	2.37	4.63	+	3.41x10 ⁻⁵	4.85x10 ⁻²
response to drug	1262	24	8.25	2.91	+	2.69x10 ⁻⁶	8.41x10 ⁻³
regulation of multicellular organismal development	1852	28	12.11	2.31	+	2.85x10 ⁻⁵	4.46x10 ⁻²
↳regulation of multicellular organismal process	2777	40	18.16	2.20	+	9.93x10 ⁻⁷	3.88x10 ⁻³
response to stress	2969	38	19.41	1.96	+	3.85x10 ⁻⁵	4.63x10 ⁻²

5.5.1.2. Efeito do aumento dos níveis de alamandina no SNC sobre a expressão de vasopressina

Como observado a partir da técnica de RNASeq, a infusão ICV de alamandina por longo prazo reduziu a expressão (mRNA) de Avp no SNC de ratos TG. Para confirmar esse resultado, avaliamos a expressão de Avp também a partir da técnica de RT-qPCR. Da mesma forma, observamos que a infusão ICV de alamandina por longo prazo reduziu a expressão de Avp ($0,33 \pm 0,03$ a.u. vs. $1,31 \pm 0,09$ a.u. no TG+Sal; $n=3-4$, $p < 0,001$; Figura 35) no SNC de ratos TG. Sendo assim, a nossa hipótese era que o tratamento com alamandina poderia reduzir a síntese e secreção de vasopressina e, com isso, aumentar o fluxo urinário desses animais. Para testar essa hipótese, estamos avaliando a expressão de vasopressina no hipotálamo por imunofluorescência e investigamos: a) o efeito da injeção ICV de alamandina sobre o fluxo urinário de ratos SD submetidos à restrição de água; b) o efeito da deleção genética do receptor MrgD sobre o fluxo urinário basal de camundongos e sobre o fluxo urinário após a restrição de água; e c) o efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o fluxo urinário de ratos TG.

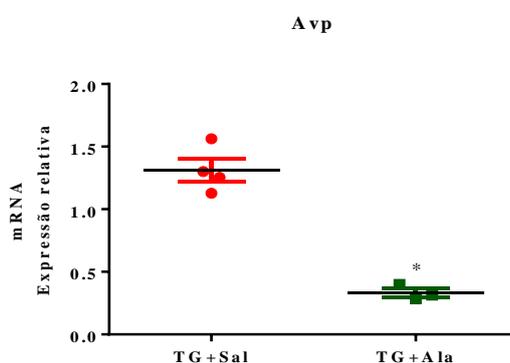


Figura 35 – Expressão gênica de Avp no SNC de ratos TG.

Expressão de mRNA de Avp no SNC de ratos hipertensos (TG+Sal, $n=4$) e hipertensos tratados com alamandina (TG+Ala, 200 ng/h, $n=3$) por 28 dias. * $p < 0,001$ vs. TG+Sal (teste t não-pareado).

5.5.1.2.1. Efeito da injeção ICV de alamandina sobre o volume urinário de ratos SD submetidos à restrição de água por 24 h

Grupos experimentais

Para a realização desse protocolo, ratos SD 12 semanas de idade foram divididos nos seguintes grupos:

SD+Sal: ratos SD submetidos à restrição de água por 24 h e injeção ICV de salina estéril (8 μ l).

SD+Ala: ratos SD submetidos à restrição de água por 24 h e injeção ICV de alamandina (2 μ g, 8 μ l).

Protocolo

Para avaliar os efeitos da injeção ICV de alamandina sobre a excreção urinária de animais normotensos, os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para canulação do VL do cérebro, permaneceram por três dias em recuperação e foram então colocados em gaiolas metabólicas para a obtenção da ingesta de água e do volume urinário e para a coleta da urina, a qual foi centrifugada e congelada a -20°C . Os animais permaneceram nas gaiolas metabólicas por 48 h para adaptação e, em seguida, a coleta basal (24 h) dos parâmetros acima mencionados foi realizada. Após a coleta basal, os animais permaneceram mais 24 h nas gaiolas metabólicas com restrição de água com o objetivo de aumentar a expressão de vasopressina no SNC desses animais e avaliar os efeitos da alamandina. A seguir, foi realizada a injeção ICV de salina estéril (SD+Sal, controle, $8\ \mu\text{L}$) ou alamandina (SD+Ala, $0,25\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $8\ \mu\text{L}$) e, após 6 h, ainda em restrição de água, a excreção urinária dos animais foi avaliada (Figura 36) e a urina coletada, centrifugada e congelada a -20°C . Logo depois, os animais foram retirados das gaiolas metabólicas e então eutanasiados para a coleta do soro, hipotálamo e glândula hipófise.

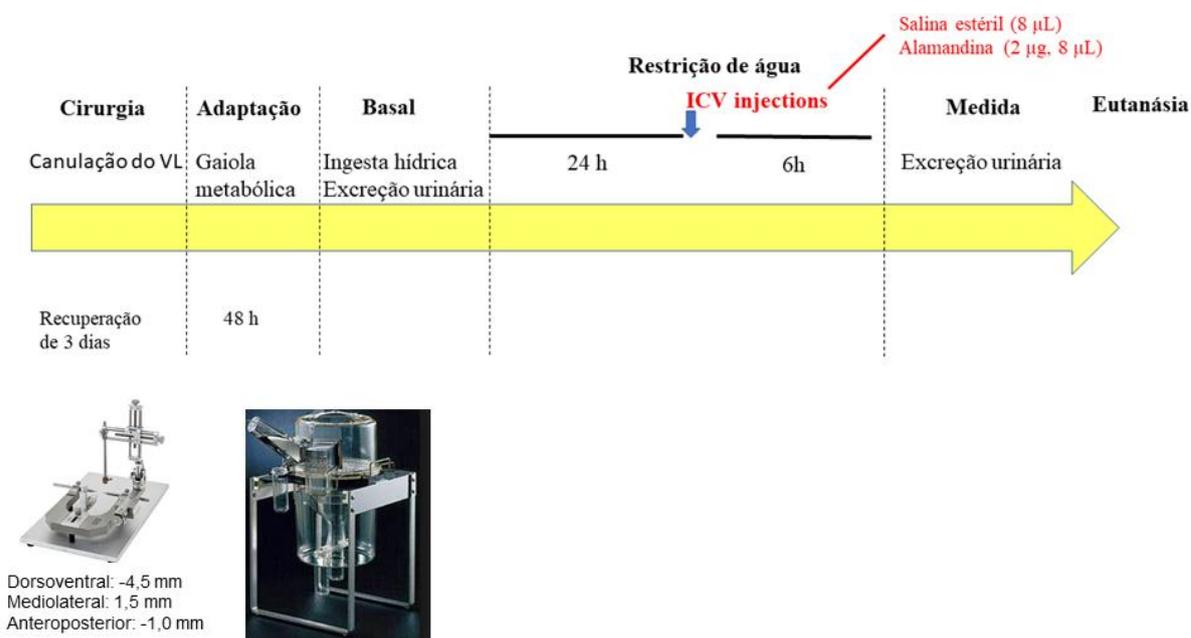


Figura 36 - Protocolo experimental para a avaliação do efeito da injeção ICV de alamandina ($2\ \mu\text{g}$, $8\ \mu\text{l}$) sobre o volume urinário de ratos SD submetidos à restrição de água por 24 h.

Resultados

A injeção ICV de alamandina não alterou o volume urinário de ratos SD submetidos à restrição de água por 24 h (Figura 37). É importante destacar que não houve diferença

significativa entre os grupos com relação à ingestão hídrica, volume urinário e balanço hídrico basais (Figura 38).

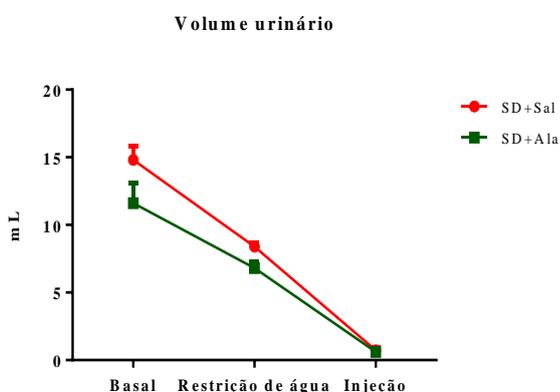


Figura 37 – Volume urinário basal e após a restrição de água por 24 horas em ratos SD. Volume urinário (ml) de ratos controle (SD+Sal, n=5) e ratos SD tratados com injeção ICV de alamandina (SD+Ala, 2 µg, n=5) (Two-way ANOVA).

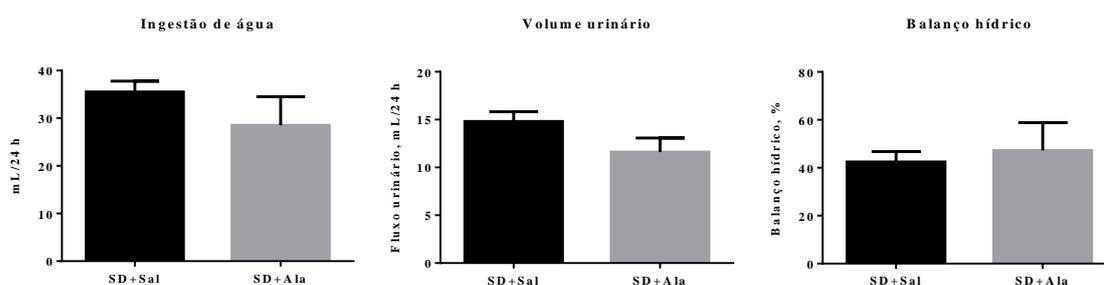


Figura 38 – Ingestão de água, volume urinário e balanço hídrico basal de ratos SD. Ingestão de água (mL/24 h), volume urinário (mL/24 h) e balanço hídrico (%) basal de ratos controle (SD+Sal, n=5) e ratos SD tratados com injeção ICV de alamandina (SD+Ala, 2 µg, n=5) (teste t não-pareado).

5.5.1.2.2. Efeito da deleção genética do receptor MrgD sobre o volume urinário de camundongos

Grupos experimentais

Para avaliar os efeitos cardiovasculares da deleção genética do receptor MrgD sobre a ingestão hídrica e excreção urinária de camundongos C57BL6/J, camundongos com 12-14 semanas de idade foram divididos nos seguintes grupos:

C57BL6/J WT: camundongos selvagens.

C57BL6/J MrgD-KO: camundongos com a deleção genética do receptor MrgD.

Protocolo

Para avaliar os efeitos da deleção genética do receptor MrgD sobre a ingestão hídrica e excreção urinária de camundongos normotensos, os animais C57BL6/J WT e MrgD-KO foram colocados em gaiolas metabólicas por 48 h para adaptação e posterior registro dos parâmetros

acima mencionados (24 h) e coleta de urina (Figura 39). No final desse dia, foi realizada a restrição de água overnight aos animais com o objetivo de aumentar a expressão de vasopressina no SNC desses animais e avaliar os efeitos da alamandina. No dia seguinte, a excreção urinária dos animais foi avaliada e procedeu-se com a eutanásia dos mesmos. Após a eutanásia dos animais, o rim foi coletado e seu peso mensurado.

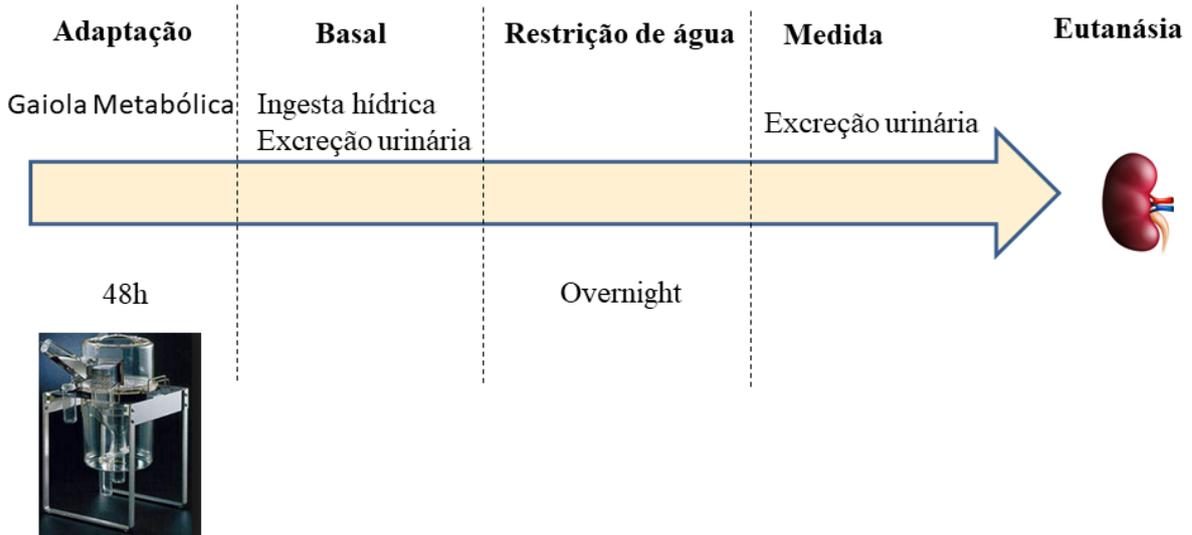


Figura 39 - Protocolo experimental para a avaliação do efeito da deleção genética do receptor MrgD sobre o fluxo urinário basal e após a restrição de água overnight.

Resultados

Volume urinário basal e após a restrição de água overnight em camundongos

Não houve diferença significativa entre camundongos WT e MrgD-KO no que diz respeito à ingestão hídrica, volume urinário e balanço hídrico basais (Figura 40), assim como no fluxo urinário após a restrição de água overnight (Figura 41).

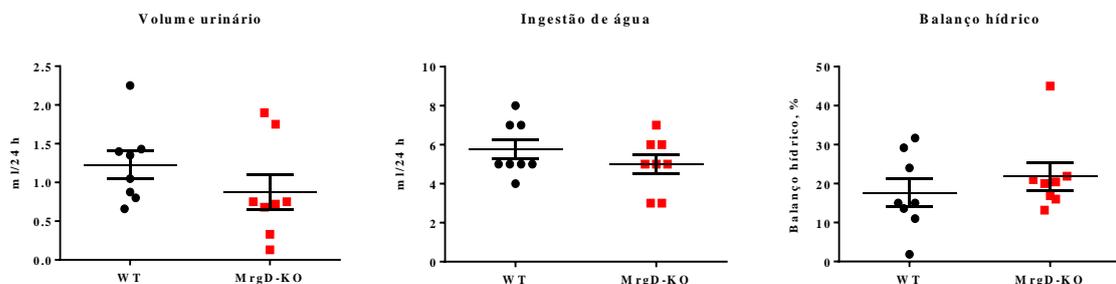


Figura 40 – Volume urinário, ingestão hídrica e balanço hídrico basal de camundongos WT e MrgD-KO. Ingestão hídrica (ml/24 h), volume urinário (ml/24 h) e balanço hídrico (%) basal de camundongos controle (WT, n=8) e com deleção genética do receptor MrgD (MrgD-KO, n=8) (teste t não-pareado).

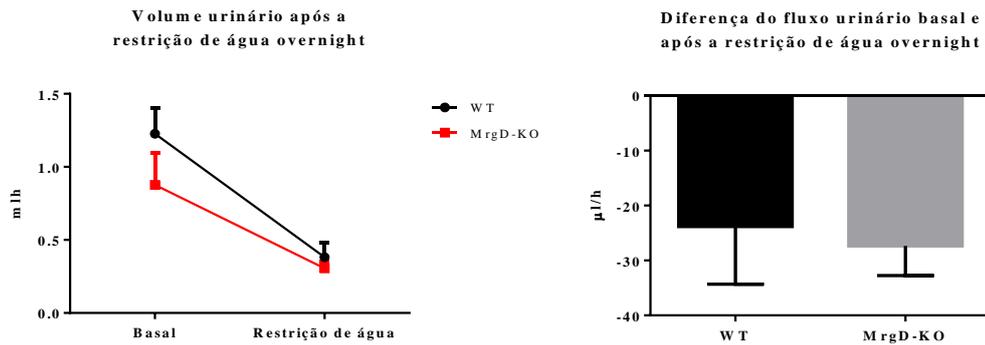


Figura 41 – Volume urinário após a restrição de água overnight em camundongos WT e MrgD-KO. Volume urinário (ml) após a restrição de água em camundongos controle (WT, n=8) e com deleção genética do receptor MrgD (MrgD-KO, n=8) (Two-way ANOVA e teste t não-pareado).

Avaliação do peso do rim

Com o objetivo de avaliar se camundongos com deleção genética do receptor MrgD apresentam aumento no peso do rim, nós avaliamos o peso do rim corrigido tanto pelo peso corporal quanto pelo comprimento da tíbia. De forma interessante, observamos que camundongos MrgD-KO apresentam hipertrofia renal, evidenciada pelo peso do rim corrigido pelo peso corporal ($6,79 \pm 0,15$ mg/g vs. $5,94 \pm 0,10$ mg/g no WT; n=7-8, $p < 0,001$; Figura 42) e pelo comprimento da tíbia ($8,13 \pm 0,25$ mg/mm vs. $7,14 \pm 0,27$ mg/mm no WT; n=7-8, $p < 0,05$; Figura 42).

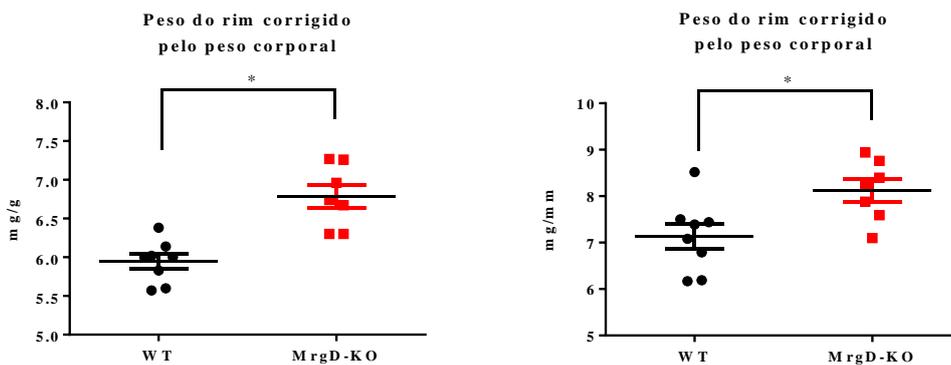


Figura 42 – Peso do rim de camundongos WT e MrgD-KO. Peso do rim (mg/g ou mg/mm) de camundongos controle (WT, n=8) e com deleção genética do receptor MrgD (MrgD-KO, n=7). * $p < 0,05$ vs. WT (teste t não-pareado).

5.5.1.2.3. Efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o volume urinário de ratos hipertensos TGR(mREN2)27

Grupos experimentais

Para a realização desse protocolo, ratos SD e TG com 12 semanas de idade no início do tratamento foram divididos nos seguintes grupos:

SD+Sal: ratos SD submetidos à infusão ICV de salina estéril (0,25 $\mu\text{L/h}$) por 28 dias.

TG+Sal: ratos TG submetidos à infusão ICV de salina estéril (0,25 $\mu\text{L/h}$) por 28 dias.

TG+Ala: ratos TG submetidos à infusão ICV de alamandina (200 ng/h, 0,25 $\mu\text{L/h}$) por 28 dias.

Protocolo

Para avaliação dos efeitos da infusão ICV de alamandina por longo prazo (28 dias) sobre a ingesta hídrica e excreção urinária de ratos TG, os animais foram inicialmente submetidos à cirurgia estereotáxica para a canulação do VL do cérebro e infusão de salina estéril (0,25 $\mu\text{L/h}$) ou alamandina (200 ng/h, 0,25 $\mu\text{L/h}$). Após 25 dias de infusão, os animais foram então colocados em gaiolas metabólicas para a obtenção da ingesta de água e do volume urinário e para a coleta da urina, onde permaneceram por 48 h para adaptação e mais 24 h para a coleta basal dos parâmetros acima mencionados (Figura 43).

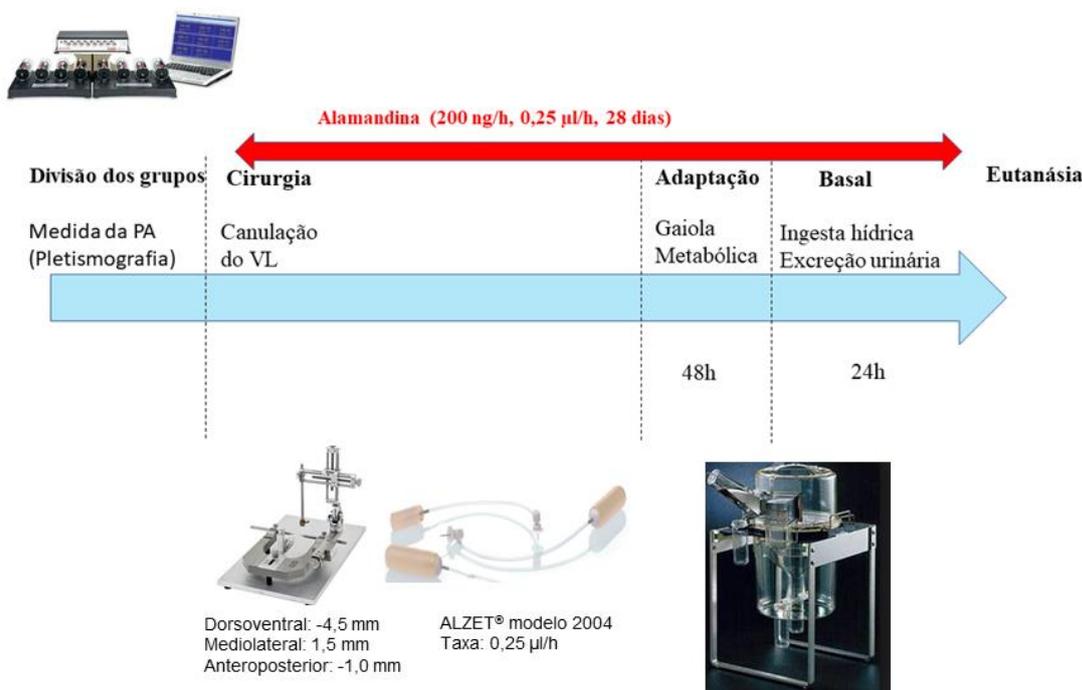


Figura 43 - Protocolo para a avaliação do efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre o volume urinário de ratos hipertensos TG.

Resultados

Não houve diferença significativa entre os grupos com relação à ingestão hídrica, volume urinário e balanço hídrico basal (Figura 44).

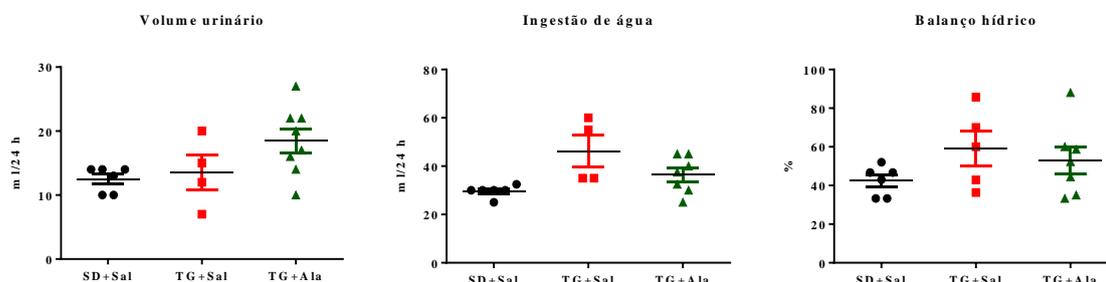


Figura 44 – Volume urinário, ingestão de água e balanço hídrico basal de ratos SD, TG e TG tratados com alamandina.

Volume urinário (ml/24 h), ingestão de água (ml/24 h) e balanço hídrico (%) basal de ratos controle (SD+Sal, n=6), hipertensos (TG+Sal, n=5) e hipertensos tratados com alamandina (200 ng/h; TG+Ala, n=7) por 28 dias (One-way ANOVA).

Em seguida, com o objetivo de confirmar os resultados obtidos com o RNASeq, selecionamos alguns dos genes com expressão alterada e avaliamos a expressão desses genes a partir da técnica de RT-qPCR. Os genes selecionados foram: o *Avp*; o *Slc6a2*, que codifica o transportador de norepinefrina; o *Crh*; o *Adra1d*, que codifica o receptor adrenérgico alfa 1D; o *Adra2c*, que codifica o receptor adrenérgico 2C; e o *Nostrin*, que codifica o óxido nítrico sintase traficante, uma proteína responsável pela translocação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) da membrana plasmática para estruturas subcelulares. Entretanto, a maior parte dos resultados não foram confirmados com o RT-qPCR. Dessa forma, os resultados obtidos com esta análise não permitiram avançar no entendimento dos mecanismos centrais envolvidos nos efeitos da alamandina no SNC. A seguir, ainda na tentativa de identificar mecanismos cerebrais envolvidos, avaliamos aqueles classicamente relacionados às ações centrais do SRA.

5.5.2. Efeito da infusão ICV de alamandina sobre mecanismos relacionados às ações centrais do SRA

Grupos experimentais

Para a realização desse protocolo, ratos SD e TG com 12 semanas de idade no início do tratamento foram divididos nos seguintes grupos:

SD+Sal: ratos SD submetidos à infusão ICV de salina estéril (0,25 μ L/h) por 28 dias.

TG+Sal: ratos TG submetidos à infusão ICV de salina estéril (0,25 μ L/h) por 28 dias.

TG+Ala: ratos TG submetidos à infusão ICV de alamandina (200 ng/h, 0,25 μ L/h) por 28 dias.

Protocolo

Inicialmente, a PA dos animais hipertensos foi mensurada a partir da pletismografia de cauda e os animais foram então divididos entre grupos de forma a manter a PA homogênea entre os grupos. Em seguida, foi realizada a cirurgia estereotáxica para a canulação do ventrículo lateral do cérebro e a infusão ICV de alamandina por longo prazo foi realizada a partir de mini-bombas osmóticas acopladas à cânula ICV. Após 28 dias de infusão, os animais foram eutanasiados e, o encéfalo dos animais, coletado. Posteriormente, o RNA total de todo o encéfalo foi extraído e utilizado para a avaliação da expressão gênica de componentes do sistema glutamatérgico, nitrérgico e SRA a partir da técnica de RT-qPCR (Figura 45).

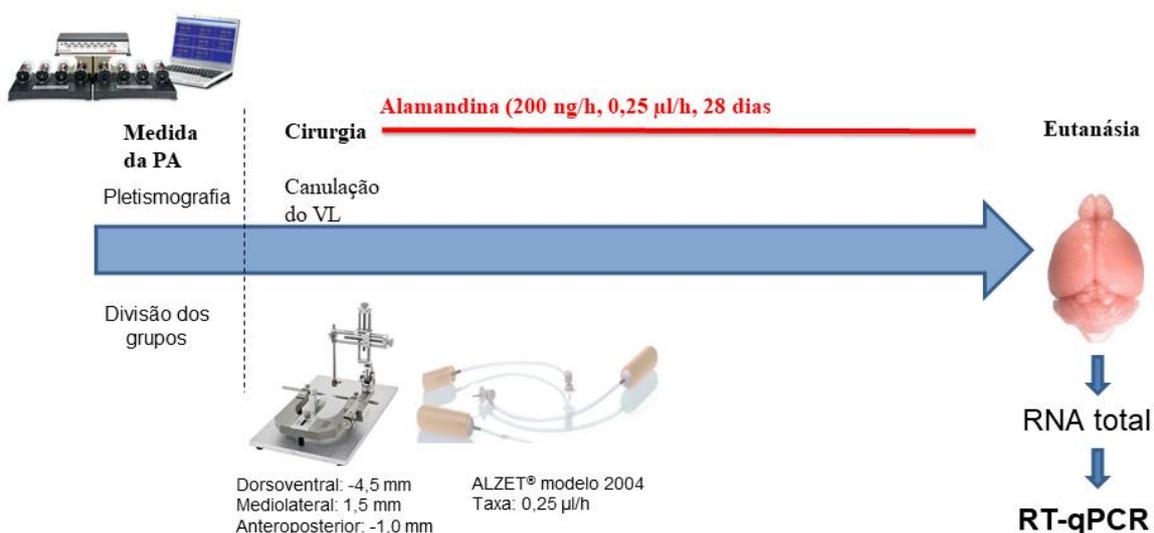


Figura 45 - Protocolo para a avaliação do efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre mecanismos relacionados às ações centrais do SRA.

Resultados

Sistema glutamatérgico

Avaliamos se a infusão ICV de alamandina por longo prazo poderia modular a sinalização glutamatérgica no SNC de animais hipertensos. Diversos estudos já mostraram que animais hipertensos apresentam aumento do neurotransmissor excitatório glutamato no SNC, o que está associado com maior ativação do sistema nervoso simpático e aumento da PA. Para isso, avaliamos a expressão gênica de alguns componentes da via glutamatérgica: a glutaminase, enzima que realiza a conversão do aminoácido glutamina em glutamato; o transportador de aminoácido excitatório, o qual realiza a recaptação do glutamato da fenda sináptica; e a subunidade NR1 do receptor NMDA, de glutamato. Observamos que o tratamento com alamandina aumenta a expressão de glutaminase ($1,17 \pm 0,05$ a.u. vs. $0,90 \pm 0,06$ a.u. no

SD+Sal; n=4-5, $p<0,05$; Figura 46) no SNC de ratos TG, ou seja, o tratamento com alamandina poderia aumentar os níveis de glutamato no SNC. Por outro lado, o tratamento com alamandina também aumentou a expressão do transportador de aminoácido excitatório ($1,33\pm 0,04$ a.u. vs. $1,01\pm 0,05$ a.u. no SD+Sal; n=4-5, $p<0,05$; Figura 46) no SNC de ratos TG, o que possivelmente aumentaria a recaptção desse neurotransmissor. Não houve diferença entre os grupos com relação à expressão da subunidade NR1 do receptor NMDA (Figura 46).

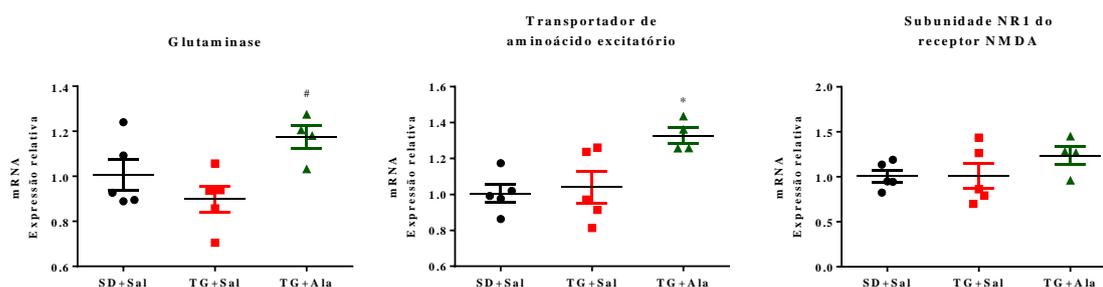


Figura 46 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão gênica de componentes da via glutamatérgica no SNC de ratos hipertensos TG.

Expressão (mRNA) de glutaminase, transportador de aminoácido excitatório e subunidade NR1 do receptor NMDA no SNC de ratos controle (SD+Sal, n=5), hipertensos (TG+Sal, n=5) e hipertensos tratados com alamandina (200 ng/h; TG+Ala, n=4) por 28 dias. * $p<0,05$ vs. grupo SD+Sal e # $p<0,05$ vs. grupo TG+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Sistema nitrérgico

Avaliamos a seguir a expressão gênica da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) no SNC dos animais hipertensos. Estudos mostraram, em outros modelos de hipertensão, que animais hipertensos apresentam redução da expressão e atividade dessa enzima no SNC, o que leva a um aumento da atividade do sistema nervoso simpático, aumento da PA e perpetuação da HA nesses animais. Nossos dados mostraram, entretanto, que não houve diferença significativa entre os grupos com relação à expressão de nNOS (Figura 47). É importante destacar que a expressão dessa enzima foi avaliada a partir da extração do mRNA de todo o cérebro, a qual, possivelmente, é diferente da expressão da enzima apenas em áreas do SNC relacionadas ao controle cardiovascular.

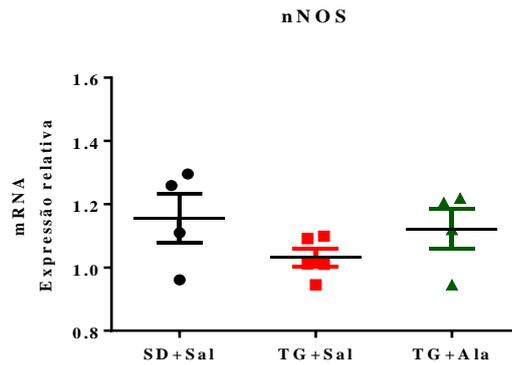


Figura 47 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão gênica de nNOS no SNC de ratos hipertensos TG.

Expressão (mRNA) da enzima Óxido Nítrico Sintase Neuronal no SNC de ratos controle (SD+Sal, n=4), hipertensos (TG+Sal, n=5) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=4). Não houve diferença entre os grupos (One-way ANOVA).

Sistema renina-angiotensina

Os ratos TG apresentaram redução da expressão de ECA ($0,85 \pm 0,06$ a.u. vs. $1,05 \pm 0,05$ a.u. no SD+Sal; n=4-5, $p < 0,05$; Figura 48) e aumento da expressão do receptor MrgD ($1,69 \pm 0,14$ a.u. vs. $0,82 \pm 0,14$ a.u. no SD+Sal; n=3-5, $p < 0,05$; Figura 48). O tratamento com alamandina não alterou a expressão desses componentes no SNC dos ratos TG (Figura 48). Não houve diferença na expressão de angiotensinogênio, ECA2 e do receptor Mas entre os diferentes grupos experimentais (Figura 48).

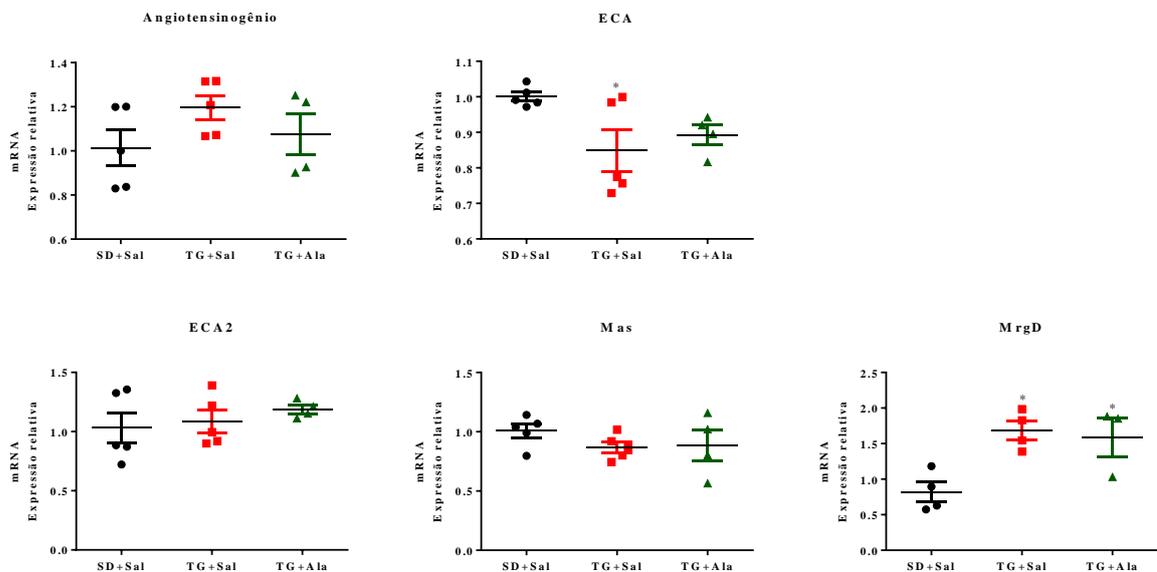


Figura 48 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre a expressão gênica de componentes do SRA no SNC de ratos hipertensos TG.

Expressão (mRNA) de componentes do SRA no SNC de ratos controle (SD+Sal, n=5), hipertensos (TG+Sal, n=5) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+Ala, 200 ng/h, n=4). * $p < 0,05$ vs. SD+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

5.5.2.1. Avaliação de citocinas no SNC

Grupos experimentais

Para a realização desse protocolo, ratos SD e TG com 12 semanas de idade no início do tratamento foram divididos nos seguintes grupos:

SD+Sal: ratos SD submetidos à infusão ICV de salina estéril (0,25 μ L/h) por 28 dias.

TG+Sal: ratos TG submetidos à infusão ICV de salina estéril (0,25 μ L/h) por 28 dias.

TG+Ala: ratos TG submetidos à infusão ICV de alamandina (200 ng/h, 0,25 μ L/h) por 28 dias.

Protocolo

Inicialmente, a PA dos animais hipertensos foi mensurada a partir da pletismografia de cauda e os animais foram então divididos entre grupos de forma a manter a PA homogênea entre os grupos. Em seguida, foi realizada a cirurgia estereotáxica para a canulação do ventrículo lateral do cérebro e a infusão ICV de alamandina por longo prazo foi realizada a partir de mini-bombas osmóticas acopladas à cânula ICV. Após 28 dias de infusão, os animais foram eutanasiados e, o encéfalo dos animais, coletado. Logo após, o hipotálamo e o bulbo dos animais foram isolados e congelados a -80° C. Posteriormente, a proteína dessas regiões foi extraída e os níveis das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 mensurados a partir da técnica de ELISA (Figura 49).

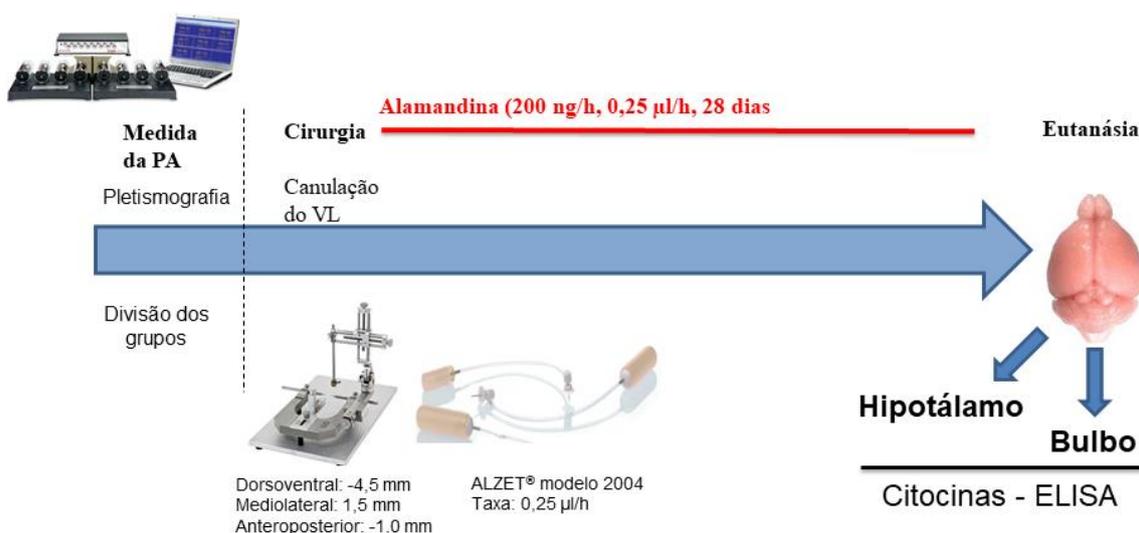


Figura 49 - Protocolo para a avaliação do efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre os níveis de citocinas inflamatórias no hipotálamo e no bulbo de ratos hipertensos TG.

Resultados

Como observado na Figura 50, ratos TG apresentaram aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α ($73,07 \pm 2,96$ pg/100 mg de proteína vs. $29,18 \pm 3,06$ pg/100 mg de proteína

no SD+Sal; $n=4-7$, $p<0,001$; Figura 50), IL-6 ($65,54\pm 4,34$ pg/100 mg de proteína vs. $26,82\pm 1,17$ pg/100 mg de proteína no SD+Sal; $n=4-7$, $p<0,001$; Figura 50) e IL-1 β ($44,63\pm 1,51$ pg/100 mg de proteína vs. $18,64\pm 0,58$ pg/100 mg de proteína; $n=4-7$, $p<0,001$; Figura 50) no hipotálamo. No entanto, a infusão ICV de alamandina por longo prazo (28 dias) reduziu os níveis de TNF- α ($49,28\pm 0,38$ pg/100 mg de proteína vs. $73,07\pm 2,96$ pg/100 mg de proteína no TG+Sal; $n=4-7$, $p<0,001$; Figura 50) e IL-6 ($42,35\pm 1,85$ pg/100 mg de proteína vs. $65,54\pm 4,34$ pg/100 mg de proteína no TG+Sal; $n=4-7$, $p<0,001$; Figura 50). Além disso, a infusão de alamandina aumentou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 ($24,16\pm 1,44$ pg/100 mg de proteína vs. $19,98\pm 0,70$ pg/100 mg de proteína no SD+Sal; $n=4-7$, $p<0,001$; Figura 50). No bulbo, como pode ser observado na Figura 46, os ratos TG apresentaram níveis aumentados de TNF- α ($56,93\pm 4,54$ pg/100 mg de proteína vs. $23,54\pm 2,04$ pg/100 mg de proteína no SD+Sal; $n=4-7$, $p<0,001$; Figura 50), IL-6 ($57,58\pm 6,77$ pg/100 mg de proteína vs. $25,38\pm 3,33$ pg/100 mg de proteína no SD+Sal; $n=4-7$, $p<0,001$; Figura 50) e IL-1 β ($45,60\pm 5,79$ pg/100 mg de proteína vs. $19,76\pm 0,90$ pg/100 mg de proteína no SD+Sal; $n=4-7$, $p<0,001$; Figura 50). O tratamento com alamandina atenuou os níveis de TNF- α ($40,23\pm 1,21$ pg/100 mg de proteína vs. $56,93\pm 4,54$ pg/100 mg de proteína no TG+Sal; $n=4-7$, $p<0,05$; Figura 50) nessa região. Não houve diferença entre os grupos com relação aos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 50).

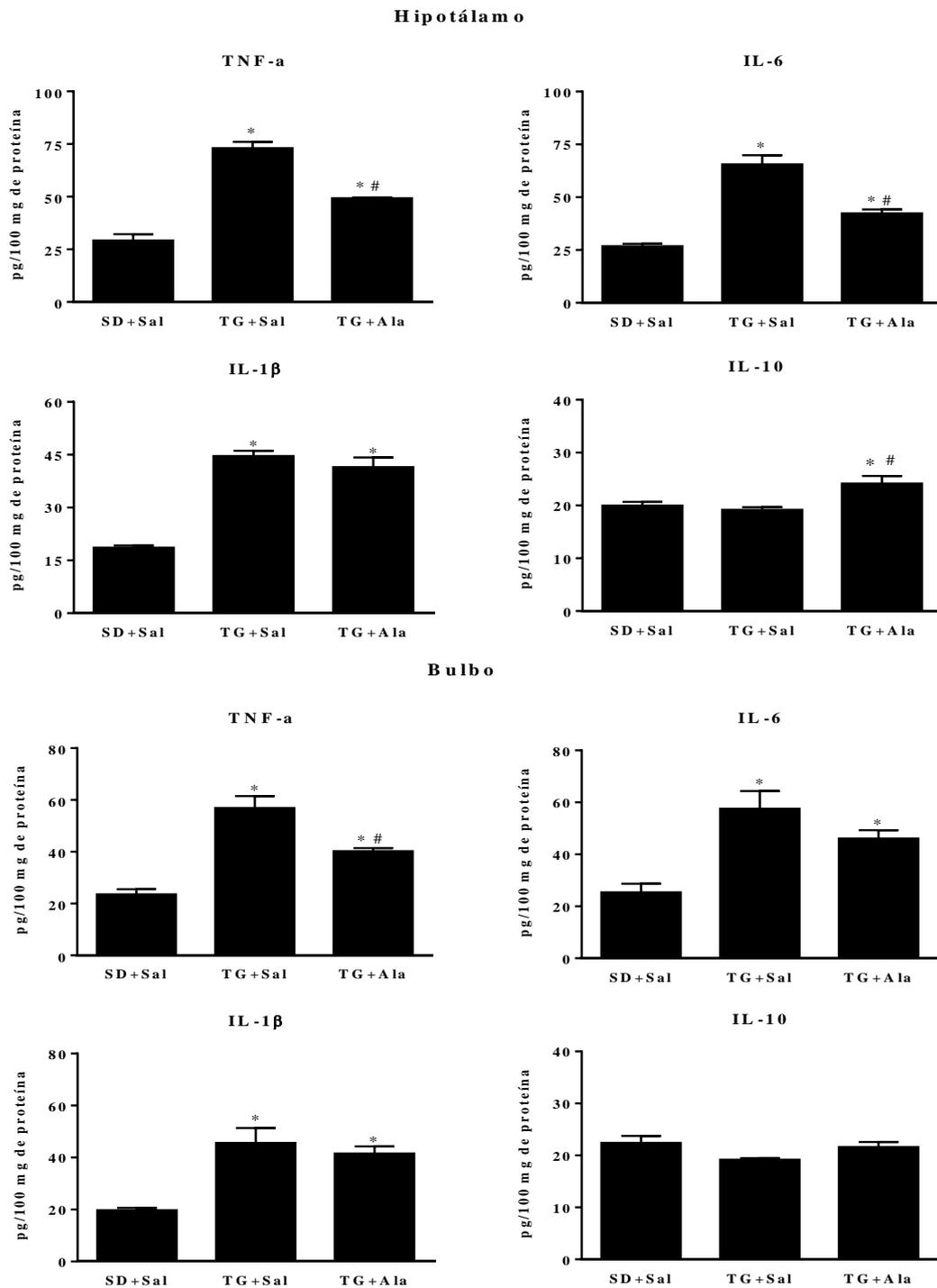


Figura 50 – Efeito da infusão ICV de alamandina sobre citocinas no SNC de ratos hipertensos TG. Níveis de citocinas no hipotálamo e bulbo de ratos controle (SD+Sal, n=7), hipertensos (TG+ Sal, n=4) e hipertensos tratados com alamandina por 28 dias (TG+A1a, 200 ng/h, n=7). * $p < 0,001$ vs. SD+Sal e # $p < 0,01$ vs. TG+Sal (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Esses dados mostram que a infusão ICV de alamandina por longo prazo atenua a inflamação em duas importantes áreas do SNC relacionadas ao controle cardiovascular: o hipotálamo e o bulbo.

A Tabela 12 sumariza os mecanismos centrais desencadeados pela infusão ICV de alamandina por longo prazo em ratos TG.

Tabela 12 - Sumário dos mecanismos centrais desencadeados pela infusão ICV de alamandina (200 ng/h) por longo prazo em ratos TG.

Parâmetro avaliado	Região avaliada	TG+Sal vs. SD+Sal	TG+Ala vs. TG+Sal	TG+Ala vs. SD+Sal
TNF- α	Hipotálamo	↑	↓	↑
IL-6		↑	↓	↑
IL-1 β		↑	ND	↑
IL-10		ND	↑	↑
TNF- α	Bulbo	↑	↓	↑
IL-6		↑	ND	↑
IL-1 β		↑	ND	↑
IL-10		ND	ND	ND
Glutaminase (mRNA)	SNC	ND	↑	↑
EAAT (mRNA)		ND	↑	↑
NR1 (mRNA)		ND	ND	ND
nNOS (mRNA)		ND	ND	ND
Aogen (mRNA)		ND	ND	ND
ECA (mRNA)		↓	ND	ND
ECA2 (mRNA)		ND	ND	ND
Mas (mRNA)		ND	ND	ND
MrgD (mRNA)		↑	ND	↑
Avp (mRNA)		--	↓	--
Fluxo urinário		ND	ND	ND
Ingestão hídrica	ND	ND	ND	

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina 6; IL-1 β : interleucina 1- β ; IL-10: interleucina 10; EAAT: transportador de aminoácido excitatório; NR1: subunidade NR1 do receptor NMDA; nNOS: óxido nítrico sintase neuronal; Aogen: angiotensinogênio; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; Avp: gene que codifica o hormônio vasopressina; ND: não há diferença entre os grupos; ↑ indica que o parâmetro está aumentado no primeiro grupo; ↓ indica que o parâmetro está reduzido no primeiro grupo.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que o aumento de longo prazo de alamandina no cérebro atenua a hipertensão arterial, melhora a sensibilidade do controle barorreflexo da FC e atenua a inflamação e deposição de colágeno no rim de animais hipertensos. Estes resultados estão associados a redução dos níveis de citocinas no SNC, que pode ser um dos mecanismos centrais desencadeados pela alamandina. Nossos dados indicam que a alamandina faz parte de uma via alternativa contrareguladora do SRA clássico.

Inicialmente, mostramos que o aumento dos níveis de alamandina no SNC a curto prazo (90 min) melhora a sensibilidade do componente bradicárdico do barorreflexo em animais normotensos e hipertensos, sem alterar a PA e a FC dos animais normotensos. Além disso, a infusão ICV de curto prazo de alamandina reduz a PA de animais hipertensos transgênicos. O efeito da infusão ICV de alamandina por curto prazo sobre a sensibilidade do barorreflexo de animais normotensos já havia sido demonstrado previamente (VILLELA; PASSOS-SILVA; SANTOS, 2014). Esses autores mostraram que o aumento dos níveis de alamandina no SNC melhorou apenas a sensibilidade do componente bradicárdico do barorreflexo após uma hora de infusão de alamandina, não sendo observado o mesmo efeito após três horas de infusão do peptídeo. Não foi mostrada alteração do componente taquicárdico (VILLELA; PASSOS-SILVA; SANTOS, 2014). Nossos dados estendem esta observação para animais hipertensos.

Levando em consideração a redução da PA em animais hipertensos e a melhora da sensibilidade do barorreflexo em animais normotensos e hipertensos após a infusão ICV de alamandina por curto prazo, nós decidimos investigar os efeitos cardiovasculares do aumento dos níveis de alamandina por longo prazo no SNC de animais hipertensos transgênicos. Observamos então que a alamandina não alterou o desenvolvimento de hipertensão nos animais mais jovens (9 semanas) e não alterou os elevados níveis pressóricos apresentados pelos animais mais velhos (16 semanas). Entretanto, de forma interessante e curiosa, o aumento dos níveis de alamandina por longo prazo reduziu a pressão arterial dos animais hipertensos com 12 semanas no início do tratamento. Neste estudo, não investigamos os mecanismos pelos quais observamos esses efeitos apenas em animais hipertensos com essa idade. Entretanto, a nossa hipótese é de que possam existir variações na expressão (mRNA e proteína), atividade enzimática e níveis de componentes do SRA, inclusive do receptor MrgD, no SNC de animais hipertensos com diferentes idades, o que poderia alterar a resposta desses animais ao tratamento (DIZ; VARAGIC; GROBAN, 2008).

Com o objetivo de comparar os efeitos cardiovasculares do aumento dos níveis de alamandina no SNC em dois diferentes modelos experimentais de hipertensão, optamos por utilizar então os animais hipertensos DOCA-Sal, já que trata-se de um modelo de hipertensão neurogênica (LAMPRECHT *et al.*, 1977; TAKEDA; BUÑAG, 1980) com hiperatividade do SRA cerebral (ITAYA *et al.*, 1986; SCHENK; MCNEILL, 1992). Nós mostramos que o aumento dos níveis de alamandina por longo prazo (14 dias) no SNC não alterou a PA e a FC desses animais. Entretanto, os ratos DOCA apresentaram disfunção do barorreflexo e, de forma interessante, a infusão ICV de alamandina atenuou essa alteração. Isso indica um efeito consistente da alamandina sobre o barorreflexo.

Como a infusão ICV de alamandina por curto prazo reduziu a PA apenas de animais hipertensos e os efeitos da alamandina em animais hipertensos DOCA-Sal não foram acompanhados de redução na PA, é provável que a melhora na sensibilidade do barorreflexo promovida pelo aumento dos níveis de alamandina no SNC seja um efeito independente de alterações na PA. Apesar de não termos avaliado o efeito da infusão de alamandina por longo prazo (28 dias) sobre a sensibilidade do barorreflexo de ratos hipertensos TGR(mREN2)27, a melhora da sensibilidade do barorreflexo observada após a infusão de curto prazo (90 min) da alamandina em animais normotensos e hipertensos TG e de longo prazo (14 dias) em ratos hipertensos DOCA-Sal, podem ser consideradas evidências para uma possível melhora da sensibilidade do barorreflexo após a infusão de alamandina por longo prazo em animais hipertensos transgênicos.

O barorreflexo é um dos principais mecanismos de controle da atividade do sistema nervoso autônomo (THRASHER, 2004). O aumento da atividade do sistema nervoso simpático em animais hipertensos tem sido associado ao desenvolvimento de lesões em órgãos-alvo, como o coração, o rim e os vasos. Em situações de demanda elevada, como é o caso da hipertensão, o ventrículo esquerdo do coração passa por um processo de remodelamento, composto principalmente pela hipertrofia dos cardiomiócitos, inflamação e fibrose cardíaca (BURCHFIELD; XIE; HILL, 2013). A hipertrofia cardíaca é considerada uma resposta adaptativa ao aumento da pós-carga em animais hipertensos, mas tem sido sugerido que ela também precede a insuficiência cardíaca. Uma das hipóteses para explicar a transição da hipertrofia cardíaca compensada para a insuficiência cardíaca seria o aumento sustentado da atividade simpática para o coração em indivíduos e animais hipertensos, que está associado a dessensibilização da adenilato ciclase e desenvolvimento de disfunção contrátil (CASTELLANO; BÖHM, 1997). Considerando a importância do barorreflexo na regulação do sistema nervoso autônomo (LOHMEIER; ILIESCU, 2015; THRASHER, 2004) e os

resultados deste estudo, a nossa hipótese é que a melhora da sensibilidade do baroreflexo induzida pelo aumento dos níveis de alamandina no SNC, poderia atenuar as lesões em órgãos-alvo observadas em animais hipertensos (BADER, M. *et al.*, 2000; BÖHM *et al.*, 1996; BURCHFIELD; XIE; HILL, 2013; DÍEZ, 2007; GUIMARAES *et al.*, 2012; KANGUSSU *et al.*, 2015).

Nós investigamos então o efeito da infusão ICV de alamandina por longo prazo sobre a hipertrofia cardíaca, inflamação e deposição de matriz extracelular no VE de animais hipertensos. Os ratos DOCA e TG apresentam aumento no peso do coração corrigido pelo peso corporal e pelo comprimento da tíbia e do diâmetro dos cardiomiócitos. Entretanto, o tratamento com alamandina não atenuou essas alterações. De forma interessante, os ratos TG apresentaram aumento na expressão gênica de ANP e BNP no VE e o tratamento com alamandina aumentou ainda mais a expressão desses marcadores. Como o ANP e o BNP são também considerados marcadores de insuficiência cardíaca (FALCÃO *et al.*, 2004; LANGENICKEL *et al.*, 2000), esses resultados sugerem que o aumento dos níveis de alamandina no SNC têm um efeito deletério no coração de animais hipertensos. Para descartarmos essa possibilidade, avaliamos a função cardíaca de ratos SD e TG e observamos que não houve diferença entre os grupos com relação a importantes parâmetros de função cardíaca, como a fração de ejeção, a fração de encurtamento e o débito cardíaco (BENAVIDES-VALLVE *et al.*, 2012; KOSARAJU; MAKARYUS, 2018), o que afasta a possibilidade de que o tratamento com alamandina apresente efeitos deletérios no coração. Por outro lado, o aumento na expressão de ANP e BNP e, com isso, a natriurese e a diurese, poderia ser um dos mecanismos responsáveis pela redução da PA (BRENNER *et al.*, 1990; CURRY, 2005) promovida pela infusão ICV de alamandina. No entanto, não observamos diferença no volume urinário desses animais.

O tratamento com alamandina atenuou a deposição de matriz extracelular no VE dos ratos TG, avaliada por histologia. Entretanto, diferentemente dos resultados encontrados a partir da análise histológica do coração, não houve diferença entre os grupos com relação à expressão gênica de componentes da matriz extracelular, como os colágenos I e III, fibronectina e TGF- β . Alguns estudos têm mostrado que nem sempre existe uma associação entre a expressão de um gene e os níveis da proteína, o que poderia explicar a divergência desses resultados (SERGEEVA; CHRISTOFFELS, 2013). Outra possível explicação é que o aumento da deposição de matriz extracelular não é causado apenas pelo aumento na síntese dessas proteínas, mas também pela redução na degradação das mesmas pelas metaloproteinases

(DÍEZ, 2007; KONG; CHRISTIA; FRANGOIANNIS, 2014), o que não foi avaliado neste estudo.

Os animais hipertensos, de forma curiosa, apresentaram um aumento de aproximadamente 5 vezes na expressão de CTGF no VE e, o tratamento com alamandina, aumentou ainda mais a expressão desse componente. Isso poderia indicar que o aumento dos níveis de alamandina no SNC de ratos TG poderia induzir um efeito pró-fibrótico no VE, o que não foi observado a partir da análise histológica do tecido. No entanto, faltam estudos que mostrem o papel pró-fibrótico do CTGF *in vivo*. Alguns estudos sugerem que o CTGF apresenta papel pró-fibrótico apenas quando induzido por TGF- β (PANEK *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2017), o qual não teve sua expressão alterada no VE dos nossos animais. Além disso, Panek e colaboradores (2009) induziram superexpressão de CTGF apenas em cardiomiócitos de camundongos e não observaram efeito pró-fibrótico, mas um efeito pró-hipertrofico. Quando os animais foram tratados com Ang II, os camundongos WT apresentaram redução significativa da função sistólica, enquanto os camundongos transgênicos foram protegidos. Além disso, os camundongos com superexpressão de CTGF não apresentaram maior fibrose no VE após o tratamento com Ang II, não havendo diferença entre camundongos WT e transgênicos. Esses dados sugerem que o CTGF isoladamente não tenha papel pró-fibrótico nem mesmo em situações de aumento da pós-carga, como a hipertensão (PANEK *et al.*, 2009). Assim, na fase de hipertensão arterial dos animais TG em nosso estudo, é possível que o aumento de CTGF observado nos ratos tratados com alamandina esteja contribuindo para a hipertrofia cardíaca compensatória frente ao aumento de pós-carga. Com relação à inflamação no VE, o tratamento com alamandina não alterou os níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

Com relação as alterações renais decorrentes da hipertensão arterial, a infusão ICV de alamandina por longo prazo atenuou a hipertrofia renal, o infiltrado inflamatório, as lesões tubulointersticiais e os níveis das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-6 e IL-1 β . No entanto, o tratamento com alamandina não alterou a expressão aumentada de CTGF. Esses dados indicam um efeito anti-inflamatório e protetor renal exercido pelo aumento dos níveis de alamandina no SNC de animais hipertensos. De acordo com esses dados, a análise de secções do rim coradas com Picrosirius Red, mostrou que o tratamento com alamandina reverteu a aumentada deposição de colágeno no rim de ratos hipertensos. Alguns estudos mostraram que a ativação simpática pode aumentar a inflamação e a deposição de matriz extracelular no rim (HOCH *et al.*, 2015) e em outros tecidos (LORTON; BELLINGER, 2015). Estudo anterior de nosso grupo mostrou que a infusão ICV de Ang-(1-7) melhora o controle barorreflexo da

atividade simpática renal em ratos hipertensos DOCA-Sal (GUIMARAES *et al.*, 2012). Embora, no presente estudo, não tenhamos avaliado a atividade simpática renal basal ou reflexa, a melhora da sensibilidade do barorreflexo cardíaco sugere que o aumento dos níveis de alamandina no SNC de animais hipertensos melhore também a atividade simpática renal e, dessa forma, exerça um efeito protetor no rim.

Observamos que os ratos TG apresentam redução na expressão de ECA2 no rim. De forma interessante, o tratamento com alamandina atenua essa alteração. É possível que a modulação da atividade da ECA2 no rim de animais tratados também esteja relacionada à modulação da atividade simpática renal. De acordo com esta hipótese, estudo anterior de nosso grupo mostrou que a infusão ICV de Ang-(1-7) por longo prazo em ratos hipertensos transgênicos modula a atividade do sistema nervoso autônomo e a expressão e atividade das enzimas ECA e ECA2 no coração (KANGUSSU *et al.*, 2015).

Uma limitação deste estudo é que o tônus autonômico para o coração e para o rim não foram avaliados. Entretanto, como a alamandina e a Ang-(1-7) apresentam estruturas e efeitos biológicos similares até o momento (GUIMARAES *et al.*, 2012; KANGUSSU *et al.*, 2015), acreditamos que a alamandina também possa modular o tônus autonômico. Outra limitação deste estudo é que não avaliamos o efeito do bloqueio do receptor MrgD sobre os efeitos promovidos pela alamandina. Sendo assim, não é possível afirmar que os efeitos observados com a infusão ICV de alamandina sejam mediados pelo receptor MrgD, conforme tem sido descrito na literatura (DE JESUS *et al.*, 2018; LAUTNER *et al.*, 2013; SHEN, YI-HUI *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2017).

Os efeitos protetores decorrentes da infusão ICV de alamandina em animais hipertensos foram mais pronunciados no rim em relação ao coração. Esta diferença pode estar relacionada às áreas cerebrais específicas que foram ativadas pela infusão ICV de alamandina, o que não foi avaliado neste estudo. Embora o estudo de Oliveira e colaboradores (2015) mostre que a expressão do receptor MrgD está presente em praticamente todas as áreas do SNC, não há dados quanto a densidade desse receptor nas diferentes áreas. Um outro aspecto, é que a infusão ICV atenuou a hipertensão arterial, no entanto, os níveis de PA ainda se apresentaram elevados, o que pode ter impacto distinto no coração e no rim.

Diversos estudos têm mostrado que os ratos TG apresentam prejuízo da função renal (GROSS *et al.*, 1996; SPRINGATE, J. E.; FELD; GANTEN, 1994; SPRINGATE, JAMES E.; FELD; GANTEN, 1997; WITTE *et al.*, 1999). Com o objetivo de investigar se a infusão ICV de alamandina estaria associada também à melhora da função renal, nós avaliamos a

albuminúria desses animais. Não houve diferença entre os grupos em relação à proteinúria de 24 horas. Entretanto, levando em consideração que o volume urinário é um parâmetro com elevada variabilidade (HAAS *et al.*, 1997), inclusive neste estudo, precisaríamos aumentar o tamanho amostral para uma adequada avaliação desse parâmetro nesses animais (SAMPAIO, 2015). Outro parâmetro utilizado para se estimar a função renal e que não depende do parâmetro volume urinário, é a relação albumina/creatinina na urina (FISHER, HERRICK *et al.*, 2013; METHVEN *et al.*, 2010). Entretanto, não observamos diferença entre os grupos com relação a esse parâmetro, o que sugere que esses animais, pelo menos na fase em que foram avaliados neste estudo, não apresentam alterações evidentes da função renal.

Uma outra limitação deste estudo é que não mensuramos os níveis de alamandina na circulação dos animais tratados e, embora um estudo anterior tenha medido os níveis de Ang-(1-7) na circulação após a sua infusão ICV por 14 dias e mostrado que os níveis do peptídeo não se alteram (GUIMARAES *et al.*, 2012), não podemos descartar a possibilidade de que parte dos efeitos seja decorrente da ação da alamandina em tecidos periféricos.

Com o objetivo de avançar no conhecimento dos possíveis mediadores cerebrais envolvidos na resposta da alamandina, nós avaliamos, a partir da técnica de RNASeq, os genes com expressão alterada no encéfalo de ratos TG tratados com alamandina quando comparado ao encéfalo de ratos TG. Diversos genes apresentaram expressão alterada pela infusão de alamandina. A partir da análise de anotação funcional, agrupamos parte desses genes relacionada à hipertensão arterial de acordo com estudos publicados previamente. Estudos futuros precisam ser realizados com o objetivo de investigar o papel desses genes nos efeitos produzidos pelo aumento dos níveis de alamandina no SNC. Entretanto, o *Avp*, o gene que codifica o hormônio vasopressina, é um dos genes que se destaca nessa lista por ser conhecidamente modulado por peptídeos do SRA e ser muito importante no contexto da hipertensão arterial (SZCZEPANSKA-SADOWSKA; CZARZASTA; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, 2018). Nós confirmamos, a partir da técnica de RT-qPCR, que o tratamento com alamandina reduz a expressão de *Avp*. No entanto, a expressão de vasopressina no hipotálamo e os níveis plasmáticos de vasopressina nos ratos TG ainda precisa ser quantificado, com o objetivo de avaliar se a síntese e secreção de vasopressina é alterada pelo tratamento com alamandina.

Além dos efeitos classicamente descritos para a vasopressina, alguns estudos mostraram que indivíduos com insuficiência cardíaca apresentam níveis elevados de vasopressina (FRANCIS *et al.*, 1990; GOLDSMITH *et al.*, 1983) e que o bloqueio dos receptores de vasopressina reduz o dano no coração e no rim de animais hipertensos (IKEDA *et al.*, 2015;

MOROOKA *et al.*, 2012). Sendo assim, é possível que a redução dos níveis de vasopressina seja um dos mecanismos pelos quais a alamandina atenua as alterações observadas no coração e no rim dos animais hipertensos.

Alguns estudos fisiológicos foram realizados com o objetivo de testar a hipótese de que o aumento dos níveis de alamandina por longo prazo no SNC de ratos TG reduziria também a síntese e a secreção de vasopressina. Levando em consideração os efeitos biológicos já bem descritos para a vasopressina, a hipótese era de que a infusão ou injeção ICV de alamandina reduziria os níveis de vasopressina no plasma e aumentaria o volume urinário dos animais. De forma semelhante, camundongos com deleção genética do receptor da alamandina, o MrgD, deveriam apresentar maior volume urinário em relação aos seus controles. Entretanto, não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais nos três diferentes experimentos, o que sugere que, apesar de a alamandina reduzir a expressão gênica de Avp, não ocorre alteração na síntese e/ou secreção da proteína. Alguns mecanismos de regulação, como a existência de RNAs de interferência, poderiam explicar esses resultados (KALANTARI; CHIANG; COREY, 2016; VALINEZHAD ORANG; SAFARALIZADEH; KAZEMZADEH-BAVILI, 2014). Entretanto, estudos futuros serão necessários para se avaliar essa possibilidade.

Na tentativa de avançar no entendimento dos mecanismos centrais envolvidos nos efeitos da alamandina no SNC, avaliamos aqueles classicamente relacionados às ações centrais do SRA, como as vias glutamatérgica e nitrérgica, a neuroinflamação e a expressão de componentes do SRA no SNC.

A importância e papel da via glutamatérgica no SNC de animais hipertensos foi mostrada em diferentes estudos na literatura. Alguns estudos indicam que a hipertensão é acompanhada por aumento dos níveis do neurotransmissor excitatório glutamato em áreas do SNC relacionadas ao controle cardiovascular, como o PVN, o que está associado ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático (JIA *et al.*, 2014; LI, DE-PEI; PAN, 2017; STERN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2013). Gabor e Leenen (2013) demonstraram que a infusão de ácido quinurênico, antagonista dos receptores NMDA, no PVN de ratos Wistar com hipertensão induzida pela infusão subcutânea de Ang II por 15 dias, normaliza a PA desses animais, sugerindo uma interrelação entre o SRA e o sistema glutamatérgico no SNC (GABOR; LEENEN, 2013). Utilizando o mesmo modelo para indução de hipertensão em camundongos, Wang e colaboradores (2013) mostraram que a infusão subcutânea de Ang II aumenta as correntes mediadas pelo receptor NMDA em neurônios do PVN e sugerem que esse achado

esteja associado ao aumento da atividade de neurônios pré-simpáticos no PVN (WANG *et al.*, 2013). Neste sentido, investigamos no presente estudo, o efeito da alamandina na expressão de glutaminase, enzima responsável pela formação de glutamato a partir da glutamina, do transportador de aminoácido excitatório (EAAT), responsável pela recaptação de glutamato, e da subunidade NR1 do receptor NMDA, e observamos que a alamandina aumenta a expressão de glutaminase, e do transportador de aminoácido excitatório, no SNC de animais hipertensos, o que sugere um aumento na síntese mas também na recaptação do glutamato, possivelmente não alterando os níveis desse neurotransmissor no SNC dos ratos TG. Além disso, não houve diferença entre grupos na expressão da subunidade NR1 do receptor NMDA.

Outro importante neurotransmissor no SNC é o óxido nítrico (NO), alvo de intensa investigação na literatura relacionada a animais hipertensos (HIROOKA *et al.*, 2011; HOJNÁ; KUNEŠ; ZICHA, 2010; KISHI, 2013; KISHI *et al.*, 2001; MARQUES; MORRIS, 2012; NORTHCOTT *et al.*, 2012; SAKIMA *et al.*, 1998; SHINOHARA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013). Os estudos mostraram que o NO exerce um efeito inibitório em áreas do SNC relacionadas ao controle cardiovascular, como o PVN e a RVLM, reduzindo a PA de animais hipertensos. Neste sentido, Gironacci e colaboradores (2004) mostraram que a Ang-(1-7) reduz a liberação de norepinefrina a partir de um mecanismo dependente da liberação de óxido nítrico, em preparação de hipotálamo de animais normotensos, hipertensos SHR e em ratos com hipertensão induzida pela coarctação da aorta (GIRONACCI, MARIELA M. *et al.*, 2004; GIRONACCI, MARIELA MERCEDES *et al.*, 2004). No presente estudo, não observamos diferença na expressão (mRNA) da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) entre os diferentes grupos experimentais. Entretanto, seria interessante investigar os níveis de NO, assim como a expressão de nNOS, em áreas ou núcleos específicos do SNC relacionadas ao controle autonômico.

Estudos mostram relação clara entre níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias e hipertensão, além de associação entre níveis aumentados dessas citocinas, de Ang II e do estresse oxidativo no SNC de animais hipertensos e a atividade do sistema nervoso simpático (HASPULA; CLARK, 2018; SHI *et al.*, 2010; SHI; RAIZADA; SUMNERS, 2010; WEI *et al.*, 2015). Shi e colaboradores (2010) mostraram que a infusão ICV a curto prazo de IL-1 β aumenta a PA de ratos e que o aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 no PVN por longo prazo atenua a hipertensão em um modelo de hipertensão induzida pela infusão crônica de Ang II administrada por via subcutânea. Um dado ainda mais interessante é que a infusão ICV de minociclina por longo prazo reduz a PA e os níveis de norepinefrina no plasma desses animais (Shi, 2010).

A atividade de citocinas pró-inflamatórias como neuromoduladores em áreas relacionadas ao controle cardiovascular tem sido muito estudada em animais hipertensos, (AVOLIO *et al.*, 2018; CARMICHAEL; WAINFORD, 2015; JIANG, ENSHE *et al.*, 2018; KHOR; CAI, 2017). No presente estudo, mostramos que o tratamento com alamandina atenuou os níveis elevados de TNF- α e IL-6 no hipotálamo e de TNF- α no bulbo dos animais hipertensos. Além disso, os animais tratados com alamandina apresentaram um aumento dos níveis de IL-10 no hipotálamo, mostrando um efeito anti-inflamatório da alamandina no SNC desses animais.

Diversos estudos mostraram alteração do balanço entre os diferentes eixos do SRA no SNC de animais hipertensos, com predomínio do eixo ECA/ Ang II/ AT1 (CAMPBELL, D. J. *et al.*, 1995; CAMPBELL, DUNCAN J. *et al.*, 1995; GUTKIND; KURIHARA; SAAVEDRA, 1988; ITAYA *et al.*, 1986; SUN *et al.*, 2012)- No presente este estudo, investigamos se o aumento dos níveis de alamandina, por longo prazo no SNC, poderia alterar a expressão de componentes do SRA. No entanto, nossos resultados mostram que o tratamento com alamandina não modificou a expressão reduzida do mRNA da ECA. De forma inédita, mostramos que a expressão do receptor MrgD no SNC de ratos TG está aumentada e que o tratamento com alamandina não alterou a expressão de seu receptor, sugerindo que a expressão aumentada do receptor MrgD no SNC dos animais hipertensos contribui para os efeitos observados neste estudo, se tornando um alvo terapêutico muito interessante para o tratamento da hipertensão arterial e suas consequências.

7. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

7. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

Em síntese, nossos resultados mostram que a infusão ICV de alamandina por curto prazo (horas) reduz a pressão arterial de ratos hipertensos transgênicos e melhora a sensibilidade do barorreflexo de ratos normotensos e hipertensos. Por outro lado, o aumento dos níveis de alamandina por longo prazo (semanas) induz redução da pressão arterial em ratos TG, com 12 semanas de idade no início do tratamento, além de melhorar a sensibilidade do barorreflexo de ratos hipertensos DOCA. Estes dados sugerem que a melhora do barorreflexo, que é o principal modulador da atividade simpática, antecede a atenuação da hipertensão arterial.

Este estudo mostrou ainda que o aumento dos níveis de alamandina por longo prazo não altera a hipertrofia, a função cardíaca e o nível aumentado de citocinas no ventrículo esquerdo de animais hipertensos. No entanto, alamandina atenuou a deposição de matriz extracelular no VE de ratos TG. Por outro lado, infusão ICV de alamandina atenuou o infiltrado inflamatório, a lesão tubulointersticial e o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no rim dos ratos TG. Mais importante, alamandina reverteu o aumento na deposição de colágeno no córtex renal de ratos TG. Esses resultados estão associados a um aumento na expressão (mRNA) da ECA2 no rim desses animais. Estudos futuros são necessários para caracterizar os mecanismos pelos quais o aumento dos níveis de alamandina no SNC exerce efeitos protetores nos rins desses animais.

Em relação aos mecanismos centrais pelos quais a alamandina exerce seus efeitos, observamos que alamandina por longo prazo atenua os níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias no hipotálamo e no bulbo de ratos TG. Além disso, alamandina aumentou os níveis de IL-10 no hipotálamo. Numa tentativa de identificar mecanismos centrais que poderiam mediar os efeitos da alamandina, avaliamos através de RNAseq expressão genes no SNC de ratos TG. Identificamos alteração de diversos genes, sendo alguns deles relacionados ao controle da pressão arterial. Estudos futuros serão necessários para investigar o papel e a importância desses genes na regulação da pressão arterial desses animais.

Em conjunto, nossos dados reforçam a importância do SRA cerebral na fisiopatologia da hipertensão arterial e indicam a alamandina como uma importante via alternativa e contraregulatória do SRA. .

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

AGUILERA, G.; KISS, A. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and vasopressin secretion. Role of angiotensin II. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 396, p. 105–112, 1996.

ALENINA, N. *et al.* Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). **Experimental Physiology**, v. 93, n. 5, p. 528–537, 2008.

ALLEN, A. M. Blockade of angiotensin AT1-receptors in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats reduces blood pressure and sympathetic nerve discharge. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS*, v. 2, n. 1_suppl, p. S120–S124, 2001.

ANDRESEN, M. C.; YANG, M. Arterial baroreceptor resetting: contributions of chronic and acute processes. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 15, p. 19–30, 1989.

AVERILL, D. B.; DIZ, D. I. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. **Brain Research Bulletin**, v. 51, n. 2, p. 119–128, 2000.

AVOLIO, E. *et al.* Role of Brain Neuroinflammatory Factors on Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat. **Neuroscience**, v. 375, p. 158–168, 2018.

BADER, M. *et al.* Role of tissue renin in the pathophysiology of hypertension in TGR(mREN2)27 rats. **Hypertension**, v. 19, n. 6, p. 681–686, 1992.

BADER, M. *et al.* Transgenic animals in cardiovascular disease research. **Experimental Physiology**, v. 85, n. 6, p. 713–731, 2000.

BADER, M.; GANTEN, D. It's renin in the brain: transgenic animals elucidate the brain renin angiotensin system. **Circ Res**, v. 90, n. 1, p. 8–10, 2002.

BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 50, p. 439–465, 2010.

BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 86, n. 6, p. 615–621, 2008.

BALTATU, O. *et al.* Alterations in Blood Pressure and Heart Rate Variability in Transgenic Rats With Low Brain Angiotensinogen. **Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 408–413, 2001.

BALTATU, O. *et al.* The Brain Renin-Angiotensin System Modulates Angiotensin II–Induced Hypertension and Cardiac Hypertrophy. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 409–412, 2000.

BAUM, N.; DICHOSO, C. C.; CARLTON, C. E. Blood urea nitrogen and serum creatinine: Physiology and interpretations. **Urology**, v. 5, n. 5, p. 583–588, 1975.

BECKER, B. K.; WANG, H.; ZUCKER, I. H. Central TrkB blockade attenuates ICV angiotensin II-hypertension and sympathetic nerve activity in male Sprague-Dawley rats. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 205, p. 77–86, 2017.

BEEVERS, G.; LIP, Gregory Y. H.; O'BRIEN, E. The pathophysiology of hypertension. **BMJ : British Medical Journal**, v. 322, n. 7291, p. 912–916, 2001.

BENAVIDES-VALLVE, C. *et al.* New Strategies for Echocardiographic Evaluation of Left Ventricular Function in a Mouse Model of Long-Term Myocardial Infarction. **PLoS One**, v. 7, n. 7, 2012.

BERECEK, K. H.; ROBERTSON, J. D.; THORSTAD, M. H. Central administration of a specific angiotensin II receptor antagonist on baroreflex function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 9, n. 4, p. 365–371, 1991.

BHAT, S. *et al.* Platelet CD40L induces activation of astrocytes and microglia in hypertension. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 59, p. 173–189, 2017.

BICKERTON, R. K.; BUCKLEY, J. P. Evidence for a Central Mechanism in Angiotensin Induced Hypertension. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 106, n. 4, p. 834–836, 1961.

BLOCK, C. H. *et al.* Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. **Peptides**, v. 9, n. 6, p. 1395–401, 1988.

BÖHM, M. *et al.* Reduction of cardiac hypertrophy in TGR(mREN2)27 by angiotensin II receptor blockade. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 163–164, p. 217–221, 1996.

BRAUN-MENENDEZ, E. *et al.* The substance causing renal hypertension. **The Journal of Physiology**, v. 98, n. 3, p. 283–298, 1940.

BRAUN-MENENDEZ, E.; PAGE, I. H. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. **Science**, v. 127, n. 3292, p. 242, 1958.

BRENNER, B. M. *et al.* Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. **Physiological Reviews**, v. 70, n. 3, p. 665–699, 1990.

BRITTO, R. R. *et al.* Role of Angiotensin-(1-7) in the Modulation of the Baroreflex in Renovascular Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 549–556, 1997.

BURCHFIELD, J. S.; XIE, M.; HILL, J. A. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. **Circulation**, v. 128, n. 4, p. 388–400, 2013.

CABASSI, A. *et al.* Sympathetic Activation in Adipose Tissue and Skeletal Muscle of Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 656–661, 2002.

CALIGIORNE, S. M. *et al.* Baroreflex control of heart rate and renal sympathetic nerve activity in rats with low brain angiotensinogen. **Neuropeptides**, v. 42, n. 2, p. 159–168, 2008.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. *et al.* Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. **American Journal of Physiology**, v. 257, n. 1 Pt 2, p. H324-329, 1989.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. *et al.* Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. **American Journal of Physiology**, v. 263, n. 1, p. R89-94, 1992.

CAMPBELL, D. J. *et al.* Angiotensin and Bradykinin Peptides in the TGR(mRen-2)²⁷ Rat. **Hypertension**, v. 25, n. 5, p. 1014–1020, 1995.

CAMPBELL, D. J. *et al.* Angiotensin peptides in spontaneously hypertensive and normotensive Donryu rats. **Hypertension**, v. 25, n. 5, p. 928–934, 1995.

CAMPBELL, D. J. *et al.* Identity of angiotensinogen precursors of rat brain and liver. **Nature**, v. 308, n. 5955, p. 206–208, 1984.

CAREY, R. M. Newly discovered components and actions of the renin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 62, n. 5, p. 818–22, 2013.

CARMICHAEL, C. Y.; WAINFORD, R. D. Hypothalamic Signaling Mechanisms in Hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 17, n. 5, p.39, 2015.

CASTELLANO, M.; BÖHM, M. The Cardiac β -Adrenoceptor–Mediated Signaling Pathway and Its Alterations in Hypertensive Heart Disease. **Hypertension**, v. 29, n. 3, p. 715–722, 1997.

CHAI, S. Y.; MENDELSON, F. A.; PAXINOS, G. Angiotensin converting enzyme in rat brain visualized by quantitative in vitro autoradiography. **Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 615–627, 1987.

CLARK, M. A.; GONZALEZ, N. Angiotensin II stimulates rat astrocyte mitogen-activated protein kinase activity and growth through EGF and PDGF receptor transactivation. **Regulatory Peptides**, v. 144, n. 1–3, p. 115–122, 2007a.

CLARK, M. A.; GONZALEZ, N. Src and Pyk2 mediate angiotensin II effects in cultured rat astrocytes. **Regulatory Peptides**, v. 143, n. 1–3, p. 47–55, 2007b.

CLARK, M. A.; GUILLAUME, G.; PIERRE-LOUIS, H. C. Angiotensin II induces proliferation of cultured rat astrocytes through c-Jun N-terminal kinase. **Brain Research Bulletin**, v. 75, n. 1, p. 101–106, 2008.

COUTO, A. S. *et al.* Differential effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) at the nucleus tractus solitarii of transgenic rats with low brain angiotensinogen. **Journal of Hypertension**, v. 20, n. 5, p. 919–925, 2002.

CURRY, Fitz-Roy E. Atrial natriuretic peptide: an essential physiological regulator of transvascular fluid, protein transport, and plasma volume. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 6, p. 1458–1461, 2005.

CUSHMAN, D. W. *et al.* Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**, v. 16, n. 25, p. 5484–5491, 1977.

JESUS, I. C. G. *et al.* Alamandine acts via MrgD to induce AMPK/NO activation against Ang II hypertrophy in cardiomyocytes. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, 2018.

DE KLOET, A. D. *et al.* Role of neurons and glia in the CNS actions of the renin-angiotensin system in cardiovascular control. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 5, p. R444–R458, 2015.

DE MOURA, M. M. *et al.* Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin-(1-7) receptor Mas-knockout mice. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1934–1939, 2010.

DIBONA, G. F. Central sympathoexcitatory actions of angiotensin II: role of type 1 angiotensin II receptors. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 10 Suppl 11, p. S90–94, 1999.

DÍEZ, J. Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension. **Journal of Clinical Hypertension**, v. 9, n. 7, p. 546–550, 2007.

DIZ, D. I.; VARAGIC, J.; GROBAN, L. Aging and the brain renin-angiotensin system. **Future cardiology**, v. 4, n. 3, p. 237–245, 2008.

DONOGHUE, M. *et al.* A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. e1–e9, 2000.

DZAU, V. J. *et al.* Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. **Hypertension**, v. 8, n. 6, p. 544–548, 1986.

EPSTEIN, A. N.; FITZSIMONS, J. T.; SIMONS, B. J. Drinking caused by the intracranial injection of angiotensin into the rat. **Journal of Physiology**, v. 200, n. 2, p. 98P-100P, 1969.

ESLER, M. The 2009 Carl Ludwig Lecture: pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 2, p. 227–237, 2010.

ETELVINO, G. M.; PELUSO, A. A.; SANTOS, R. A. New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. **Curr Hypertens Rep**, v. 16, n. 6, p. 433, 2014.

FALCÃO, L. M. *et al.* BNP and ANP as diagnostic and predictive markers in heart failure with left ventricular systolic dysfunction. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS**, v. 5, n. 3, p. 121–129, 2004.

FERRARIO, C. M.; DICKINSON, C. J.; MCCUBBIN, J. W. Central vasomotor stimulation by angiotensin. **Clinical Science**, v. 39, n. 2, p. 239–245, 1970.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of bothrops jararaca. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 163–169, 1965.

FERREIRA, S. H. *et al.* Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. **Nature**, v. 225, n. 5230, p. 379–380, 1970.

FINK, Gregory D. Long-Term Sympatho-Excitatory Effect of Angiotensin II: A Mechanism of Spontaneous and Renovascular Hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 24, n. 1, p. 91–95, 1997.

FISHER, J. P.; PATON, J. F. The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: implications for hypertension. **J Hum Hypertens**, v. 26, n. 8, p. 463–75, 2012.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, Thirst, and Sodium Appetite. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 3, p. 583–686, 1998.

FOULQUIER, S.; STECKELINGS, U. M.; UNGER, T. Impact of the AT(2) receptor agonist C21 on blood pressure and beyond. **Current Hypertension Reports**, v. 14, n. 5, p. 403–409, 2012.

FRAGA-SILVA, R. A.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor pathway in hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 15, n. 1, p. 31–8, 2013.

FREITAS, I. M. G. *et al.* Baroreflex gain and vasomotor sympathetic modulation in resistant hypertension. **Clinical Autonomic Research**, v. 27, n. 3, p. 175–184, 2017.

GABOR, A.; LEENEN, F. H. H. Central Mineralocorticoid Receptors and the Role of Angiotensin II and Glutamate in the Paraventricular Nucleus of Rats With Angiotensin II-Induced Hypertension Novelty and Significance. **Hypertension**, v. 61, n. 5, p. 1083–1090, 2013.

GANTEN, D.; HUTCHINSON, J. S.; SCHELLING, P. The intrinsic brain iso-renin-angiotensin system in the rat: its possible role in central mechanisms of blood pressure regulation. **Clinical Science and Molecular Medicine**, v. 2, p. 265s-268s, 1975.

GANTEN, D. *et al.* Angiotensin-Forming Enzyme in Brain Tissue. **Science**, v. 173, n. 3991, p. 64–65, 1971.

GIRONACCI, M. M. *et al.* Angiotensin-(1–7) Inhibitory Mechanism of Norepinephrine Release in Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 44, n. 5, p. 783–787, 2004.

GIRONACCI, M. M. *et al.* Angiotensin-(1-7) inhibits the angiotensin II-enhanced norepinephrine release in coarcted hypertensive rats. **Regulatory Peptides**, v. 118, n. 1–2, p. 45–49, 2004.

GOLDBLATT, H. *et al.* Studies on experimental hypertension. **Journal of Experimental Medicine**, v. 59, n. 3, p. 347–379, 1934.

GOWRISANKAR, Y. V.; CLARK, M. A. Angiotensin II induces interleukin-6 expression in astrocytes: Role of reactive oxygen species and NF- κ B. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 437, p. 130–141, 2016.

GROSS, V. *et al.* The renin-angiotensin system and renal function in transgenic (mRen2)27 rats. **Experimental Nephrology**, v. 4 Suppl 1, p. 20–26, 1996.

GUIMARAES, P. S. *et al.* Chronic infusion of angiotensin-(1-7) into the lateral ventricle of the brain attenuates hypertension in DOCA-salt rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 303, n. 3, p. H393-400, 2012.

GUIMARAES, P. S. *et al.* Increasing angiotensin-(1-7) levels in the brain attenuates metabolic syndrome-related risks in fructose-fed rats. **Hypertension**, v. 63, n. 5, p. 1078–85, 2014.

GUTKIND, J. S.; KURIHARA, M.; SAAVEDRA, J. M. Increased angiotensin II receptors in brain nuclei of DOCA-salt hypertensive rats. **American Journal of Physiology**, v. 255, n. 3, p. H646-650, 1988.

HAAS, M. *et al.* Urine collection in the freely moving rat: reliability for measurement of short-term renal effects. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 38, n. 1, p. 47–51, 1997.

HASPULA, D.; CLARK, M. A. Neuroinflammation and sympathetic overactivity: Mechanisms and implications in hypertension. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 210, p. 10–17, 2018.

HERINGER-WALTHER, S. *et al.* Baroreflex Improvement in SHR After ACE Inhibition Involves Angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 37, n. 5, p. 1309–1314, 2001.

HIROOKA, Y. *et al.* Imbalance of central nitric oxide and reactive oxygen species in the regulation of sympathetic activity and neural mechanisms of hypertension. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 4, p. R818-826, 2011.

HOCH, H. *et al.* Sympathetic nervous system drives renal inflammation by alpha(2a)-adrenoceptors. **Journal of Hypertension**, v. 33 Suppl 1, p. e118, 2015.

HOJNÁ, S.; KUNEŠ, J.; ZICHA, J. Alterations of NO synthase isoforms in brain and kidney of rats with genetic and salt hypertension. **Physiological Research**, v. 59, n. 6, p. 997–1009, 2010.

HUTCHINSON, J. S.; MENDELSON, F. A.; DOYLE, A. E. Blood pressure responses of conscious normotensive and spontaneously hypertensive rats to intracerebroventricular and peripheral administration of captopril. **Hypertension**, v. 2, n. 4, p. 546–550, 1980.

IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M.. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n.1, p. 55-62, 2001.

ISA, K. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition, but not AT(1) receptor blockade, in the solitary tract nucleus improves baroreflex sensitivity in anesthetized transgenic hypertensive (mRen2)²⁷ rats. **Hypertension Research**, v. 34, n. 12, p. 1257–1262, 2011.

ITAYA, Y. *et al.* Central renin-angiotensin system and the pathogenesis of DOCA-salt hypertension in rats. **American Journal of Physiology**, v. 251, n. 2, p. H261-268, 1986.

JANKOWSKI, V. *et al.* Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 2, p. 297–302, 2007.

JENSEN, L. L.; HARDING, J. W.; WRIGHT, J. W. Central effects of a specific angiotensin receptor antagonist, sarthran (Sar1, Thr8AII) in normotensive and spontaneously hypertensive rat strains. **Brain Research**, v. 448, n. 2, p. 359–363, 1988.

JIA, Lin-Lin *et al.* Exercise training attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating neurotransmitters and cytokines in hypothalamic paraventricular nucleus. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85481, 2014.

JIANG, E. *et al.* Expression of Proinflammatory Cytokines Is Upregulated in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 104, 2018.

JIANG, T.; GAO, L.; ZHU, Xi-Chen; *et al.* Angiotensin-(1-7) inhibits autophagy in the brain of spontaneously hypertensive rats. **Pharmacological Research**, v. 71, p. 61–68, 2013.

JIANG, T.; GAO, L.; SHI, J.; *et al.* Angiotensin-(1-7) modulates renin-angiotensin system associated with reducing oxidative stress and attenuating neuronal apoptosis in the brain of hypertensive rats. **Pharmacological Research**, v. 67, n. 1, p. 84–93, 2013.

KANGUSSU, L. M. *et al.* 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, 2015.

KEPPLER, A. *et al.* Plasma creatinine determination in mice and rats: An enzymatic method compares favorably with a high-performance liquid chromatography assay. **Kidney International**, v. 71, n. 1, p. 74–78, 2007.

KHOR, S.; CAI, D. Hypothalamic and inflammatory basis of hypertension. **Clinical Science**, v. 131, n. 3, p. 211–223, 2017.

KISHI, T. *et al.* Overexpression of eNOS in the RVLM Causes Hypotension and Bradycardia Via GABA Release. **Hypertension**, v. 38, n. 4, p. 896–901, 2001.

KISHI, T. Regulation of the sympathetic nervous system by nitric oxide and oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla: 2012 Academic Conference Award from the Japanese Society of Hypertension. **Hypertension Research**, v. 36, n. 10, p. 845–851, 2013.

KONG, P.; CHRISTIA, P.; FRANGOIANNIS, N. G. The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis. **Cellular and molecular life sciences**, v. 71, n. 4, p. 549–574, 2014.

KORPAL, A. K.; BROWN, C. H.; SCHWENKE, D. O. Assessing the role of hypothalamic microglia and blood vessel disruption in the development of angiotensin II-dependent hypertension in Cyp1a1-Ren2 rats. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, p. 1–13, 2018.

KOSARAJU, A.; MAKARYUS, A. N. Left Ventricular Ejection Fraction. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459131/>>. Acesso em: 27 abr. 2018.

KRIEGER, E. M.; SALGADO, H. C.; ASSAN, C. J. Greene LL, Ferreira SH: Potential screening test for detection of overactivity of renin-angiotensin system. **Lancet**, v. 1, n. 7693, p. 269–271, 1971.

KRIEGER, E. M. *Hipertensão Arterial: Bases Fisiopatológicas e prática clínica*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

LAMPRECHT, F. *et al.* 6-hydroxydopamine destruction of central adrenergic neurones prevents or reverses developing DOCA-salt hypertension in rats. **Journal of Neural Transmission**, v. 40, n. 2, p. 149–158, 1977.

LANGENICKEL, T. *et al.* Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 278, n. 5, p. H1500-1506, 2000.

LAUTNER, R. Q. *et al.* Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. **Circ Res**, v. 112, n. 8, p. 1104–11, 2013.

LI, De-Pei; PAN, Hui-Lin. Glutamatergic Regulation of Hypothalamic Presympathetic Neurons in Hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 19, n. 10, p. 78, 2017.

LI, W. *et al.* Neuron-specific (pro)renin receptor knockout prevents the development of salt-sensitive hypertension. **Hypertension**, v. 63, n. 2, p. 316–23, 2014.

LI, W. *et al.* Brain-Targeted (Pro)renin Receptor Knockdown Attenuates Angiotensin II-Dependent Hypertension. **Hypertension**, v. 59, n. 6, p. 1188–1194, 2012.

LIN, S. Y.; GOODFRIEND, T. L. Angiotensin receptors. **American Journal of Physiology**, v. 218, n. 5, p. 1319–1328, 1970.

LIPPI, G. *et al.* Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, n. 3, p. 311–316, 2006.

LIU, M.; SHI, P.; SUMNERS, C.. Direct anti-inflammatory effects of angiotensin-(1–7) on microglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 136, n. 1, p. 163–171, 2016.

LOHMEIER, T. E.; ILIESCU, R. The Baroreflex as a Long-Term Controller of Arterial Pressure. **Physiology**, v. 30, n. 2, p. 148–158, 2015.

LORTON, D.; BELLINGER, D. L. Molecular Mechanisms Underlying β -Adrenergic Receptor-Mediated Cross-Talk between Sympathetic Neurons and Immune Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5635–5665, 2015.

MARINA, N *et al.* Glia, sympathetic activity and cardiovascular disease. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 5, p. 565–576, 2016.

MARKS, L. S.; MAXWELL, M. H. Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. **Hypertension**, v. 1, n. 4, p. 384–388, 1979.

MARQUES, F. Z.; MORRIS, B. J. Neurogenic hypertension: revelations from genome-wide gene expression profiling. **Current Hypertension Reports**, v. 14, n. 6, p. 485–491, 2012.

MASSON, G.; AOKI, K.; PAGE, I. Effects of sinoaortic denervation on renal and adrenal hypertension. **American Journal of Physiology**, v. 211, n. 1, p. 99–104, 1966.

MCCUBBIN, J. W.; GREEN, J. H.; PAGE, I. H. Baroreceptor Function in Chronic Renal Hypertension. **Circulation Research**, v. 4, n. 2, p. 205–210, 1956.

MICHELINI, L. C. Regulação da Pressão Arterial: Mecanismos Neuro-hormonais. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 566–585.

MIN, Li-Juan *et al.* Angiotensin II and aldosterone-induced neuronal damage in neurons through an astrocyte-dependent mechanism. **Hypertension Research**, v. 34, n. 6, p. 773–778, 2011.

MORIGUCHI, A. *et al.* Opposing Actions of Angiotensin-(1-7) and Angiotensin II in the Brain of Transgenic Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 25, n. 6, p. 1260–1265, 1995.

MULLINS, J. J.; PETERS, J.; GANTEN, D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. **Nature**, v. 344, n. 6266, p. 541–544, 1990.

NGUYEN, G. *et al.* Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 11, p. 1417–1427, 2002.

NORTHCOTT, C. A. *et al.* Nitric oxide synthase, ADMA, SDMA, and nitric oxide activity in the paraventricular nucleus throughout the etiology of renal wrap hypertension. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 11, p. H2276-2284, 2012.

OHKUBO, H. *et al.* Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 1, p. 319–323, 1986.

OKUNO, T. *et al.* Attenuation of the development of spontaneous hypertension in rats by chronic central administration of captopril. **Hypertension**, v. 5, n. 5, p. 653–662, 1983.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* *Mrgd* Expression in Cardiovascular Related Areas. In: Council on Hypertension, 2015. Washington. Anais. Washington: American Heart Association, 2015. P110.

OLIVEIRA, D. R. *et al.* Changes in the Baroreflex Control of Heart Rate Produced by Central Infusion of Selective Angiotensin Antagonists in Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 27, n. 6, p. 1284–1290, 1996.

OPARIL, S.; ZAMAN, M. A.; CALHOUN, D. A. Pathogenesis of hypertension. **Annals of Internal Medicine**, v. 139, n. 9, p. 761–776, 2003.

PAGE, I. H.; HELMER, O. M. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. **Journal of Experimental Medicine**, v. 71, n. 1, p. 29–42, 1940.

PANEK, A. N. *et al.* Connective Tissue Growth Factor Overexpression in Cardiomyocytes Promotes Cardiac Hypertrophy and Protection against Pressure Overload. **Plos One**, v. 4, n. 8, p. e6743, 2009.

PARK, C. G.; LEEN, F. H. H. Effects of Centrally Administered Losartan on Deoxycorticosterone-salt Hypertension Rats. **Journal of Korean Medical Science**, v. 16, n. 5, p. 553–557, 2001.

PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev**, v. 86, n. 3, p. 747–803, 2006.

PHILLIPS, M. I.; STENSTROM, B. Angiotensin II in rat brain comigrates with authentic angiotensin II in high pressure liquid chromatography. **Circulation Research**, v. 56, n. 2, p. 212–219, 1985.

QARADAKHI, T. *et al.* Alamandine reverses hyperhomocysteinemia-induced vascular dysfunction via PKA-dependent mechanisms. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 35, n. 6, 2017.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **American Journal of Physiology**, v. 156, n. 2, p. 261–273, 1949.

ROGERSON, F. M. *et al.* Localization of angiotensin converting enzyme by in vitro autoradiography in the rabbit brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 8, n. 4, p. 227–243, 1995.

SAKIMA, A. *et al.* Prolonged NOS inhibition in the brain elevates blood pressure in normotensive rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 275, n. 2, p. R410–R417, 1998.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 4. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2015.

SANTOS, R. A. *et al.* Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, v. 11, n. 2, p. 1153–1157, 1988.

SANTOS, RA. Angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 63, p. 1138–1147, 2014.

SANTOS, R. A. S. *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 2003.

SCHELLING, P. *et al.* Impermeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier for angiotensin II in rats. **Clin Sci Mol Med Suppl**, v. 3, p. 399s-402s, 1976.

SCHENK, J.; MCNEILL, J. H. The pathogenesis of DOCA-salt hypertension. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 27, n. 3, p. 161–170, 1992.

SCHIAVONE, M. T. *et al.* Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 11, p. 4095–4098, 1988.

SCHINKE, M. *et al.* Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 7, p. 3975–3980, 1999.

SENANAYAKE, P. D. *et al.* Increased expression of angiotensin peptides in the brain of transgenic hypertensive rats. **Peptides**, v. 15, n. 5, p. 919–926, 1994.

SERGEEVA, I. A.; CHRISTOFFELS, V. M. Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1832, n. 12, p. 2403–2413, 2013.

SEVERS, W. B. *et al.* Interrelationship between angiotensin II and the sympathetic nervous system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 153, n. 3, p. 530–537, 1966.

SHEN, X. Z. *et al.* Microglia Participate in Neurogenic Regulation of Hypertension. **Hypertension**, v. 66, p. 309–316, 2015.

SHEN, Yi-Hui *et al.* Alamandine injected into the paraventricular nucleus increases blood pressure and sympathetic activation in spontaneously hypertensive rats. **Peptides**, 2018.

SHI, P. *et al.* Brain Microglial Cytokines in Neurogenic Hypertension. **Hypertension**, v. 56, n. 2, p. 297–303, 2010.

SHI, P. *et al.* Direct Pro-Inflammatory Effects of Prorenin on Microglia. **Plos One**, v. 9, n. 10, e92937, 2014.

SHI, P.; RAIZADA, M. K.; SUMNERS, C. Brain cytokines as neuromodulators in cardiovascular control. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 37, n. 2, p. e52-57, 2010.

SHIH, W.; HINES, W. H.; NEILSON, E. G. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. **Kidney International**, v. 33, n. 6, p. 1113–1118, 1988.

SHINOHARA, K. *et al.* Reduction of nitric oxide-mediated γ -amino butyric acid release in rostral ventrolateral medulla is involved in superoxide-induced sympathoexcitation of hypertensive rats. **Circulation Journal**, v. 76, n. 12, p. 2814–2821, 2012.

SKEGGS, L. T. *et al.* The existence of two forms of hypertensin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 99, n. 3, p. 275–282, 1954.

SKEGGS, L. T.; KAHN, J. R.; SHUMWAY, N. P. The Isolation of Hypertensin from the Circulating Blood of Normal Dogs with Experimental Renal Hypertension by Dialysis in an Artificial Kidney. **Circulation**, v. 3, n. 3, p. 384–389, 1951.

SOARES, E. R. *et al.* Hypotensive effect induced by microinjection of Alamandine, a derivative of angiotensin-(1-7), into caudal ventrolateral medulla of 2K1C hypertensive rats. **Peptides**, v. 96, p. 67–75, 2017.

SOLTANI HEKMAT, A. *et al.* Differences in Cardiovascular Responses to Alamandine in Two-Kidney, One Clip Hypertensive and Normotensive Rats. **Circulation Journal**, v. 81, n. 3, p. 405–412, 2017.

SONG, K. *et al.* Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 316, n. 4, p. 467–484, 1992.

SPRINGATE, J. E.; FELD, L. G.; GANTEN, D. Renal function in hypertensive rats transgenic for mouse renin gene. **American Journal of Physiology**, v. 266, n. 5, p. F731-737, 1994.

SPRINGATE, J. E.; FELD, L. G.; GANTEN, D. Enalapril and Renal Function in Hypertensive Rats Transgenic for Mouse Renin Gene. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 868–872, 1997.

STERN, J. E. *et al.* Astrocytes Contribute to Angiotensin II Stimulation of Hypothalamic Neuronal Activity and Sympathetic Outflow. **Hypertension**, v. 68, n. 6, p. 1483–1493, 2016.

STRITTMATTER, S. M. *et al.* Autoradiographic visualization of angiotensin-converting enzyme in rat brain with [3H]captopril: localization to a striatonigral pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 5, p. 1599–1603, 1984.

SUN, Hai-Jian *et al.* Angiotensin II and angiotensin-(1-7) in paraventricular nucleus modulate cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. **PloS One**, v. 7, n. 12, p. e52557, 2012.

SUZUKI, H. *et al.* Role of the brain iso-renin--angiotensin system in experimental hypertension in rats. **Clinical Science**, v. 61, n. 2, p. 175–180, 1981.

SZCZEPAŃSKA-SADOWSKA, E. *et al.* Increased pressor function of central vasopressinergic system in hypertensive renin transgenic rats. **Journal of Hypertension**, v. 16, n. 10, p. 1505–1514, 1998.

SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E.; CZARZASTA, K.; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A. Dysregulation of the Renin-Angiotensin System and the Vasopressinergic System Interactions in Cardiovascular Disorders. **Current Hypertension Reports**, v. 20, n. 3, p. 19, 2018.

TAKEDA, K.; BUÑAG, R. D. Augmented sympathetic nerve activity and pressor responsiveness in DOCA hypertensive rats. **Hypertension**, v. 2, n. 1, p. 97–101, 1980.

THRASHER, T. N. Baroreceptors and the long-term control of blood pressure. **Experimental Physiology**, v. 89, n. 4, p. 331–335, 2004.

TIMMERMANS, P. B. *et al.* Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. **Pharmacological Reviews**, v. 45, n. 2, p. 205–251, 1993.

TRASK, A. J. *et al.* Angiotensin-(1-12) is an alternate substrate for angiotensin peptide production in the heart. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 5, p. H2242–H2247, 2008.

TSUTSUMI, K.; SAAVEDRA, J. M. Quantitative Autoradiography Reveals Different Angiotensin II Receptor Subtypes in Selected Rat Brain Nuclei. **Journal of Neurochemistry**, v. 56, n. 1, p. 348–351, 1991.

VEERASINGHAM, S. J.; RAIZADA, M. K. Brain renin–angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 191–202, 2003.

VILLELA, D. C.; PASSOS-SILVA, D. G.; SANTOS, R. A. Alamandine: a new member of the angiotensin family. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 23, n. 2, p. 130–4, 2014.

VOLICER, L.; LOEW, C. G. Penetration of angiotensin II into the brain. **Neuropharmacology**, v. 10, n. 5, p. 631–634, 1971.

WANG, G. *et al.* Angiotensin II slow-pressor hypertension enhances NMDA currents and NOX2-dependent superoxide production in hypothalamic paraventricular neurons. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 12, p. R1096–R1106, 2013.

WEI, Shun-Guang *et al.* Proinflammatory Cytokines Upregulate. Sympathoexcitatory Mechanisms in the Subfornical Organ of the Rat. **Hypertension**, p. 1126–33, 2015.

WEYHENMEYER, J. A.; PHILLIPS, M. I. Angiotensin-like immunoreactivity in the brain of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 4, n. 4, p. 514–523, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A global brief on hypertension. Geneva, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/>. Acesso em: 11 mar. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Atlas of Heart Disease and Stroke. Geneva, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/>. Acesso em: 11 mar. 2018.

WITTE, K. *et al.* Cardiovascular risk, renal hypertensive damage, and effects of amlodipine treatment in transgenic TGR(mREN2)27 rats. **General Pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 423–430, 1999.

XIA, H. *et al.* Angiotensin II Type 1 Receptor–Mediated Reduction of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activity in the Brain Impairs Baroreflex Function in Hypertensive Mice. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 210–216, 2009.

XIA, H. *et al.* Brain Angiotensin-Converting Enzyme Type 2 Shedding Contributes to the Development of Neurogenic Hypertension Novelty and Significance. **Circulation Research**, v. 113, n. 9, p. 1087–1096, 2013.

XU, J. *et al.* Clinical Relevance and Role of Neuronal AT1 Receptors in ADAM17-Mediated ACE2 Shedding in Neurogenic Hypertension: Novelty and Significance. **Circulation Research**, v. 121, n. 1, p. 43–55, 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Overexpressed connective tissue growth factor in cardiomyocytes attenuates left ventricular remodeling induced by angiotensin II perfusion. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 168–174, 2017.

ZHAO, Y. *et al.* Ontogenetic regulation of mouse Ren-2d renin gene in transgenic hypertensive rats, TGR(mREN2)27. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 5, p. E699-707, 1993.

ANEXO I – Termo de aprovação do CEUA/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "EFEITO DA INFUSÃO INTRACEREBROVENTRICULAR AGUDA E CRÔNICA DE ALAMANDINA SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E FUNÇÃO CARDÍACA DE ANIMAIS HIPERTENSOS", protocolo do CEUA: 239/2016 sob a responsabilidade de Maria Jose Campagnole dos Santos que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 25/10/2016.

Vigência do Projeto	01/10/2016 a 31/10/2020
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico114
Nº de animais	9
Peso/Idade	300g / 12(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Laboratório de Hipertensão, ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico138
Nº de animais	36
Peso/Idade	300g / 12(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Laboratório de Hipertensão, ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico139
Nº de animais	36
Peso/Idade	300g / 12(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Laboratório de Hipertensão, ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Rato transgênico148
Nº de animais	9
Peso/Idade	300g / 12(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Laboratório de Hipertensão, ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Rato transgênico149
Nº de animais	36
Peso/Idade	300g / 12(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Laboratório de Hipertensão, ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Rato transgênico150
Nº de animais	36
Peso/Idade	300g / 12(semanas)