



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS CENTRAIS E PERIFÉRICOS ENVOLVIDOS
NO FENÓTIPO CARDIOVASCULAR DE RATOS TGR(A1-7)7371 QUE
SUPEREXPRESSAM ANGIOTENSINA-(1-7) NO CÉREBRO**

DANIELE TEIXEIRA ALVES

BELO HORIZONTE – MG

2018

DANIELE TEIXEIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS CENTRAIS E PERIFÉRICOS ENVOLVIDOS
NO FENÓTIPO CARDIOVASCULAR DE RATOS TGR(A1-7)7371 QUE
SUPEREXPRESSAM ANGIOTENSINA-(1-7) NO CÉREBRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Fisiologia.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria José Campagnole-Santos

BELO HORIZONTE – MG

2018

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica e no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI), ambos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e através do Programa de Doutorado Sanduiche do CNPQ no Max Delbrück Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association (MDC), Berlim, Alemanha. Esse trabalho contou com auxílio financeiro de CAPES, CNPq, FAPEMIG, e INCT-NANOBiofar.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre iluminando o meu caminho e presenteando com suas graças.

Aos animais que com toda inocência contribuí de forma significativa para o avanço da ciência e aumento da expectativa de vida mundial.

À minha amada família, por me ensinar a ter valores e princípios com amor e incentivo em toda essa caminhada.

À Professora Maria José Campagnole-Santos, pela amizade, confiança, oportunidades e exemplo de profissional e pesquisadora.

Ao Professor Robson Augusto Souza Santos pelos ensinamentos e pronta disponibilidade em ajudar.

Ao Professor Michael Bader e seu grupo de pesquisa no MDC-Berlin pela oportunidade e conhecimentos adquiridos.

Aos Professores, técnicos e secretárias do Departamento de fisiologia e biofísica, pelos auxílios e conhecimentos adquiridos.

Aos meus amigos e colegas do laboratório de hipertensão, pela amizade e boas risadas ao longo do caminho.

Aos órgãos de fomento à pesquisa e a este Programa de Pós-Graduação por apoiar a realização deste estudo.

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.”
(Louis Pasteur)*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	1
Lista de figuras	5
Lista de tabelas	7
Resumo	8
Abstract	10
I Revisão de Literatura	12
1.1 Sistema Renina Angiotensina.....	12
1.2 Sistema Renina Angiotensina Cerebral	19
1.3 Animal Transgênico [TGR(A1-7)7371].....	31
II Justificativa	33
III Objetivo Geral	35
3.1 Objetivos específicos.....	35
IV Material e Métodos	36
4.1 Animais	36
4.2 Avaliação do fluxo sanguíneo em diferentes territórios	36
4.2.1 Preparo do Animal.....	36
4.2.2 Experimento.....	37
4.2.3 Cálculo para determinar parâmetros hemodinâmicos	38
4.3 Avaliação dos níveis plasmáticos do peptídeo natriurético Atrial (ANP).....	39
4.4 Avaliação da expressão da proteína de fusão por imunofluorescência (IF)	39
4.4.1 Expressão da proteína de fusão por IF em áreas do cérebro	39
4.4.1.1 Protocolo do ensaio de IF.....	40
4.4.2 Expressão da proteína de fusão por IF em tecidos periféricos.....	41
4.4.2.1 Tecidos congelados	41
4.4.2.2 Tecidos parafinados	41
4.4.2.3 Protocolo do ensaio de IF.....	42
4.4.3 Análise das imagens	43
4.5 Avaliação da expressão do mRNA por reação em cadeia da polimerase, qualitativa (RT-PCR) e semi-quantitativa ou em tempo real (qRT-PCR)	44
4.5.1 Extração de RNA total	44
4.5.2 Tratamento do RNA total com DNase.....	45
4.5.3 Transcrição reversa (RT)	45
4.5.4 RT-PCR qualitativo	45

4.5.5 qRT-PCR ou RT-PCR em tempo real, semi-quantitativo	46
4.6 Sequenciamento do promotor	47
4.7 Análise estatística	48
V Resultados	49
5.1 Determinação de parâmetros hemodinâmicos	49
5.2 Nível plasmático do peptídeo natriurético atrial (ANP)	53
5.3 Verificação da marcação imunofluorescente da proteína de fusão com o anticorpo anti-IgG2b de camundongo	54
5.4 Avaliação da presença da proteína de fusão em Astrócitos e/ou Neurônios.....	58
5.5 Análise e sequenciamento do promotor	60
5.6 Análise da expressão do transgene determinado por RT-PCR e qRT-PCR.....	61
5.7 Avaliação da presença da proteína de fusão em tecidos não-cerebrais por IF..	63
5.8 Expressão da proteína de fusão em áreas cerebrais envolvidas com o controle cardiovascular da pressão arterial	67
5.8.1 Bulbo e Hipotálamo	68
VI Discussão	78
6.1 Considerações Gerais e parâmetros hemodinâmicos	78
6.2 Identificação da proteína de fusão em áreas bulbares e suprabulbares	80
6.3 Identificação da proteína de fusão em neurônios e expressão do transgene em tecidos não-cerebrais	85
VII Referências Bibliográficas.....	92
VIII Anexos	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - Serotonina
7-NI – 7-nitroindazole
A-779 – Antagonista sintético para o receptor Mas
Ala – Alanina
Amb – Núcleo ambíguo
Ang – Angiotensina
Ang II – Angiotensina II
Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)
ANP – Peptídeo natriurético atrial
AOGEN – Angiotensinogênio
AP – Aminopeptidase
APA – Aminopeptidase A
APB – Aminopeptidase B
APN – Aminopeptidase N
Asp – Aspartato
AT1 – Receptor tipo 1 de Ang II
AT2 – Receptor tipo 2 de Ang II
AVE – Acidente vascular encefálico
AVP – Arginina – Vasopressina
BHE – Barreira hemato-encefálica
CA – Corno de Amon ou hipocampo
CMV – Citomegalovírus
CP – Carboxipeptidase
CVLM – Área caudoventrolateral do bulbo
CVOs – Órgãos circumventriculares
DAPI – Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole
DC – Débito cardíaco
Dcase – Descarboxilase
DEPC – Dietilpirocarbonato
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DOCA – Desoxicorticosterona
ECA – Enzima conversora de angiotensina
ECA2 – Enzima conversora de angiotensina 2

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIA – Ensaio imunoenzimático
EPM – Erro padrão da média
FC – Frequência cardíaca
FST – Teste de natação forçada
GD – Giro denteado
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GDR1 – Região reguladora 1 do gene GFAP
GDR2 – Região reguladora 2 do gene GFAP
GFAP – Proteína ácida fibrilar glial
GFP – Proteína verde fluorescente
GMPc – Guanosina monofosfato cíclico
HA – Hipotálamo anterior
His – Histidina
hRENEX – Fragmento humano de prorenina
IO – Núcleo olivar inferior
IC – Índice cardíaco
ICV – Intracerebroventricular
IECA – Inibidor da enzima conversora de angotensina
IF – Imunofluorescência
IG5 – Fragmento de IgG
IgG – Imunoglobulina G
IRAP – Aminopeptidase insulina-regulada, receptor da Ang IV
KO - Knockout
KOH – Hidróxido de sódio
lacZ – genes que codificam a β -galactosidase
L-NAME – NG-nitro-L-arginina metil éster, inibidor de NOS
LCE – Labirinto em cruz elevado
NEP – Endopeptidase neutra
NF- κ β – Fator nuclear Kappa β
nls-lacZ – *lacZ* nuclear
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal

NSE – Enolase neurônio específica
NTS – Núcleo do trato solitário
nX – Núcleo motor dorsal do nervo vago
nXII – Núcleo hipoglosso
PA – Pressão arterial
PAG – Substância cinzenta periaquedutal
PAM – Pressão arterial média
pb – Pares de bases
PBS – Tampão fosfato-salino
PCP – Prolilcarboxipeptidase
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PE – Polietileno
PEP – Prolilendopeptidase
PFA – Paraformaldeído
Phe – Fenilalanina
PKA – Proteína quinase A
PKC – Proteína quinase C
PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PO4 – Fosfato
PRCP – Prolilendopeptidase
PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo
RNA – Ácido ribonucleico
RP – Resistência periférica
RPa – Núcleos da rafe ou Rafe pallidus
RPT – Resistência periférica total
RT-PCR – Reação de polimerização em cadeia catalisada pela transcriptase reversa
qRT-PCR – RT-PCR em tempo real ou quantitativo
RVLM – Área rostroventrolateral do bulbo ou bulbo ventrolateral rostral
SD – Sprague Dawley
SHR – Rato espontaneamente hipertenso
SNA – Sistema nervoso autônomo
SNC – Sistema nervoso central
SON – Núcleo supra-óptico
SRA – Sistema renina-angiotensina

SV40 – Adenovírus vacuolante símio 40
SYBR – Corante de cianina assimétrico
TAE – Tampão Tris-acetato-EDTA
TGR – Rato transgênico
TH – Tirosina hidroxilase
THOP – Thimet oligopeptidase
VE – Ventrículo esquerdo
VS – Volume sistólico
WT – “Wild-type”, camundongo selvagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cascata atualizada do Sistema Renina Angiotensina (SRA)	13
Figura 2 – Sequência do transgene e proteína de fusão dos Ratos [TGR(A1-7)7371]	32
Figura 3 - Fluxo Sanguíneo Regional	50
Figura 4 - Parâmetros hemodinâmicos determinados por microesferas fluorescentes	52
Figura 5 - Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca basal	53
Figura 6 - Níveis plasmáticos do Peptídeo Natriurético Atrial (ANP)	54
Figura 7 - Marcação imunofluorescente da proteína de fusão com o anticorpo anti-IgG2b de camundongo em testículo	56
Figura 8 - Controle da marcação da proteína de fusão no cérebro	57
Figura 9 - Marcação imunofluorescente da proteína de fusão em neurônios e astrócitos da RVLM	59
Figura 10 - Marcação imunofluorescente da proteína de fusão em neurônios e astrócitos do hipocampo	60
Figura 11 - Imagens de géis representativos da expressão do mRNA do transgene por RT-PCR	62
Figura 12 - Quantificação da expressão do mRNA para proteína de fusão por qRT-PCR	63
Figura 13 - Marcação imunofluorescente da proteína de fusão no testículo e cérebro	64
Figura 14 - Marcação imunofluorescente da proteína de fusão em aorta	65
Figura 15 - Marcação imunofluorescente da proteína de fusão no coração	66
Figura 16 - Marcação imunofluorescente da proteína de fusão no pulmão	67
Figura 17 - Marcação da proteína de fusão no núcleo ambíguo (Amb) e na área rostroventrolateral do bulbo (RVLM)	69
Figura 18 - Marcação da proteína de fusão na área caudoventrolateral do bulbo (CVLM)	70
Figura 19 - Marcação da proteína de fusão no núcleo motor dorsal do vago (nX) e núcleo hipoglosso (nXII)	71
Figura 20 - Marcação da proteína de fusão no núcleo do trato solitário (NTS)	71
Figura 21 - Marcação da proteína de fusão no núcleo da rafe (RPa) e núcleo olivar inferior (IO)	72
Figura 22 - Marcação da proteína de fusão no núcleo supra-óptico (SON)	73

Figura 23 - Marcação da proteína de fusão no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo	73
Figura 24 - Marcação da proteína de fusão no córtex retrosplenial granular e giro denteado (GD) do hipocampo (A1), amígdala e globo pálido (B1) e núcleo ventral posterolateral talâmico (C1)	75
Figura 25 - Marcação da proteína de fusão no hipocampo e corpo estriado	76
Figura 26 - Localização da marcação imunofluorescente para a proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) em diferentes áreas do cérebro de TGR	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Óligos utilizados na RT-PCR e qRT-PCR47

Tabela 2 - Óligos utilizados no sequenciamento48

Tabela 3 - Valores de fluxo sanguíneo e resistência vascular regionais em ratos SD e TGR51

RESUMO

No sistema nervoso central, o eixo ECA2-Angiotensina-(1-7)-receptor Mas do sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha um papel importante em áreas relacionadas com o controle cardiovascular. Recentemente obtivemos uma linhagem de ratos transgênicos que expressa uma proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) sob regulação do promotor GFAP, o [TGR(A1-7)7371]. A principal característica cardiovascular destes ratos é uma menor pressão arterial basal. Este resultado, uma modificação genética em um animal normotenso ter induzido um fenótipo hipotensivo, é de grande importância fisiológica e reforça o papel deste eixo do SRA no controle da pressão arterial. O objetivo do presente estudo foi determinar os mecanismos periféricos e centrais envolvidos neste fenótipo. Primeiramente, avaliamos os parâmetros hemodinâmicos e os níveis plasmáticos de ANP nesses animais. A distribuição do fluxo sanguíneo em vários órgãos, o débito cardíaco e a resistência periférica total foram investigados usando microesferas fluorescentes e os níveis de ANP através de ensaio enzimático (ELISA). Em seguida, avaliamos a distribuição da expressão do transgene por imunofluorescência e quantificamos por RT-PCR e qRT-PCR a expressão do mRNA do transgene [GFAP-Ang-(1-7)] em áreas/núcleos cerebrais e em tecidos periféricos destes animais. Ratos TGR(A1-7)7371 apresentaram menor PAM, como esperado, e aumento dos níveis plasmáticos de ANP. Além disso, apresentaram aumento significativo do fluxo sanguíneo em diferentes tecidos (rins, músculo, ventrículo esquerdo, mesentério, tecido adiposo marrom e pele), que resultaram em diminuição da resistência periférica total. A imunoreatividade para proteína de fusão foi detectada em áreas medulares relacionadas com o controle cardiovascular, como áreas rostral e caudal ventrolateral do bulbo (RVLM e CVLM), núcleo ambíguo (Amb), núcleo do trato solitário (NTS) e núcleo motor dorsal do vago (nX). No hipotálamo, os ratos TGR mostraram imunoreatividade para proteína de fusão apenas no núcleo supra-óptico (SON). Imunocoloração para proteína de fusão também foi observada em outras áreas não diretamente envolvidas com o controle cardiovascular, como hipocampo, amígdala, córtex, tálamo, núcleo

estriado e núcleos da rafe. Surpreendentemente, a proteína de fusão estava preferencialmente presente nos neurônios e o mRNA do transgene expresso em vários tecidos periféricos. No entanto, não foi observado imunorreatividade para proteína de fusão em tecidos periféricos, como a aorta, coração, pulmão e testículo. A expressão da proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) em áreas envolvidas com o controle cardiovascular no cérebro, é consistente com os achados cardiovasculares observados nos ratos TGR. Esses dados confirmam e estendem resultados anteriores mostrando uma potente ação hipotensora induzida pelo aumento de longo prazo de Ang-(1-7) no cérebro determinada por vasodilatação periférica e aumento dos níveis de ANP. Estes dados estabelecem também um novo modelo animal para estudo do impacto do aumento cerebral dos níveis de Ang-(1-7) nas doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

In the central nervous system, the ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor arm of the renin-angiotensin system (RAS) plays an important role in areas related to cardiovascular control. Recently, we obtained a transgenic rat line that express an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein under regulation of the GFAP promoter, the [TGR(A1-7)7371]. The main cardiovascular characteristic of these rats is a lower baseline blood pressure. This result, a genetic modification in an animal with normotensive background would have induced a hipotensive phenotype, is of great physiological significance and reinforces the role of this axis of the RAS for the control of blood pressure. The objective of the present study was to determine the central and peripheral mechanisms involved in this phenotype. First, we evaluated the hemodynamic measurements and the plasma levels of the atrial natriuretic peptide (ANP) in [TGR(A1-7)7371] rats. Blood flow distribution, cardiac output, cardiac index and total peripheral resistance were investigated by using fluorescent microspheres and plasma levels of the ANP by enzymatic immunoassay (ELISA). Next, we evaluated the distribution of transgene expression by immunofluorescence and quantified by RT-PCR and qRT-PCR the expression of the transgenic mRNA [GFAP-Ang-(1-7)] in areas/nucleus and cell types of the brain and in peripheral tissues of these animals. TGR(A1-7)7371 rats presented lower MAP, as expected, and plasma increase of ANP. Further, TGR rats showed a significant increase in blood flow in different tissues (kidneys, mesentery, muscle, spleen, brown fat, heart and skin), which resulted in a decrease in total peripheral resistance. Higher intensity labeling for the fusion protein was identified in medullary areas related with cardiovascular control, as the rostral and caudal ventrolateral medulla (RVLM and CVLM), nucleus ambiguus (Amb), nucleus tractus solitarius (NTS) and dorsal motor nucleus of the vagus nerve. In the hypothalamus, the TGR(A1-7)7371 rats showed immunoreactivity to the fusion protein only in the supraoptic nucleus (SON). Immunostaining for fusion protein has also been observed in other areas not directly involved with cardiovascular control, such as the hippocampus, amygdala, cortex, thalamus, striatum and raphe nuclei. Surprisingly, fusion

protein was preferentially present in neurons and transgenic mRNA expressed in various peripheral tissues. However, immunoreactivity for fusion protein was not observed in peripheral tissues, such as the aorta, heart, lung and testis. The expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in areas involved with cardiovascular control in the brain was consistent with the previous cardiovascular findings observed in these rats. These data support and extend previous results showing a potent hypotensive action induced by the long-term increase of Ang-(1-7) in the brain, which is determined by peripheral vasodilation and increased ANP levels. These data also establish a new animal model to study the impact of increase in Ang-(1-7) cerebral levels in cardiovascular diseases.

I REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Sistema Renina Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema hormonal complexo, conhecido por desempenhar um papel importante na homeostase cardiovascular e balanço hidroeletrolítico. Numerosos estudos contribuíram para identificar os principais efetores do SRA e sua participação em mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos. Inicialmente, este sistema era considerado como uma via proteolítica linear produtora de um único peptídeo biologicamente ativo, a angiotensina (Ang) II. Nos últimos 30 anos novos componentes ativos do sistema foram identificados, a Ang-(1-7) (Santos e cols., 1988; Schiavone e cols., 1988, Campagnole-Santos e cols., 1989), a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (Tipnis e cols, 2000; Donoghue e cols., 2000), o receptor de pró-renina/renina (Nguyen e cols., 2002), a proteína Mas como receptor da Ang-(1-7) (Santos e cols., 2003), a alamandina e o receptor MrgD (Lautner e cols., 2013). A Figura 1 mostra em um diagrama as principais enzimas e peptídeos da cascata atual do SRA.

Em 1898, Tigerstedt e Bergman mostraram que um extrato aquoso de rim de coelho continha uma substância ativa que aumentava a pressão arterial sanguínea, designada por eles como “renina” (para revisão ver Marks e Maxwell, 1979). No final da década de 30, a renina foi considerada mais catalisadora do que uma substância ativa, agindo como uma enzima em um substrato presente no plasma. Em 1939, o produto ativo no plasma foi finalmente identificado ao mesmo tempo em laboratórios diferentes e, posteriormente, denominado angiotensina pelos seus descobridores, os cientistas Eduardo Braun-Menéndez e Irvine H Page. Nos anos que se seguiram foi demonstrado a existência de duas formas de angiotensina, designadas angiotensina I e II (Skeggs e cols., 1954; Helmer, 1957) e a participação de outra enzima, a enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável pela conversão da Ang I, um peptídeo inativo, em uma forma ativa, Ang II (Helmer, 1957; Yang e cols., 1970a).

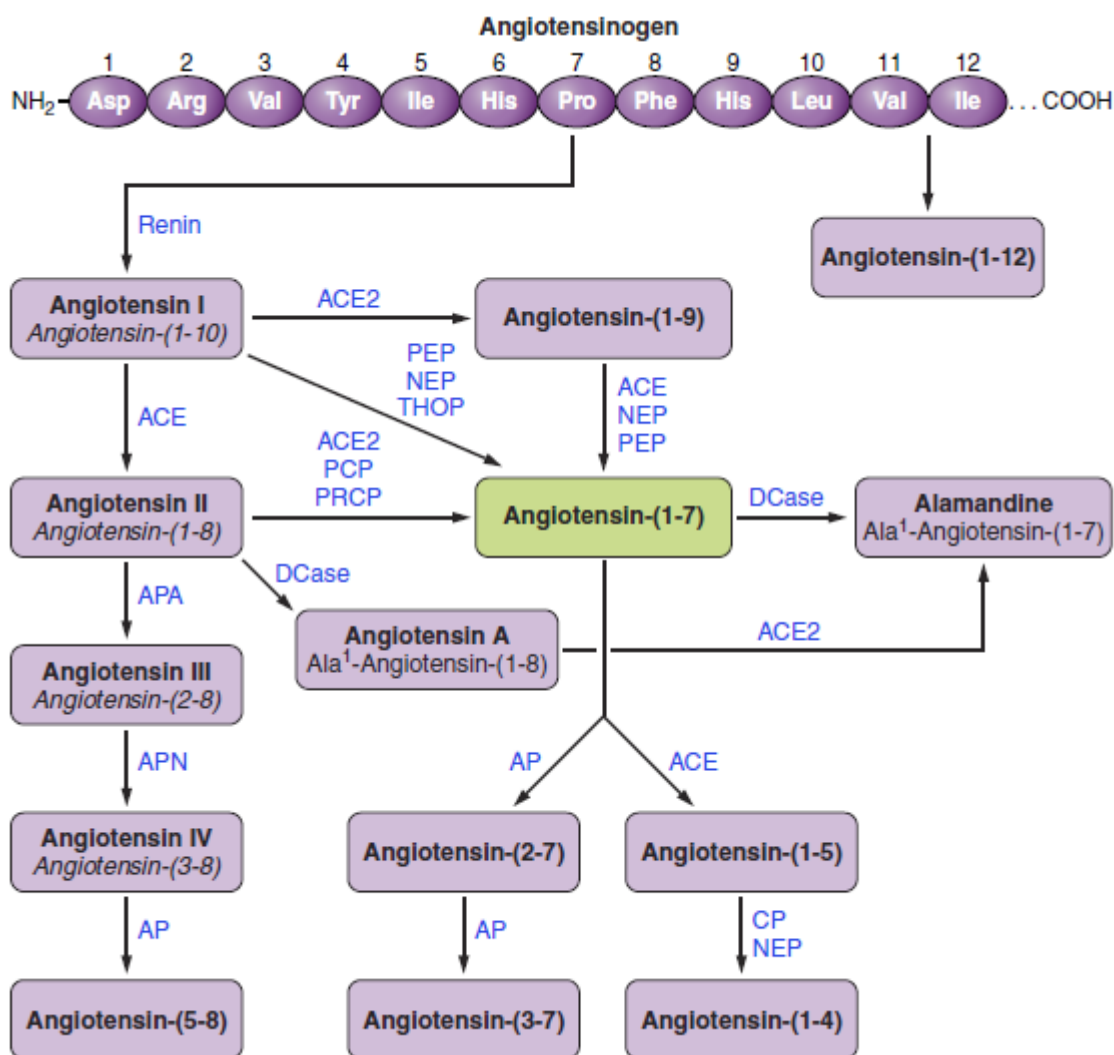


Figura 1. Cascata atualizada do Sistema Renina Angiotensina (SRA)

Ilustração das vias de formação dos peptídeos do SRA. ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; APA, aminopeptidase A; APN, aminopeptidase N; PRCP, prolilendopeptidase; PEP, prolilendopeptidase; NEP, endopeptidase neutra; PCP, prolilcarboxipeptidase; CP, carboxipeptidase; AP, aminopeptidase; Dcase, descarboxilase; THOP, thimet oligopeptidase. Extraída de: Santos e cols., *Physiol Rev.* 98: 505-553, 2018.

Os trabalhos descritos acima foram cruciais para o início da compreensão do SRA como regulador do sistema cardiovascular e renal. A cascata de hidrólise do SRA circulante se inicia quando uma α -glicoproteína liberada principalmente pelo fígado, o angiotensinogênio (AOPEN) é hidrolisada na circulação por uma aspartil protease, a renina, secretada pelas células justaglomerulares dos rins, formando o decapeptídeo Ang I. A monocarboxipeptidase, ECA,

presente no endotélio vascular remove dois aminoácidos da porção C-terminal, a fenilalanina e a histidina (Phe-His), da Ang I formando o octapeptídeo Ang II, principalmente na circulação pulmonar. A Ang II é o principal efetor deste eixo do sistema. No entanto, estudos mostraram que o SRA não é apenas um sistema peptidérgico endócrino, mas possui ações parácrinas e autócrinas em vários tecidos levando ao conceito da existência de um SRA, ou da formação local de angiotensinas (Danser, 2003; Paul e cols., 2006a).

A Ang II também pode ser formada por outras vias alternativas, por exemplo serina proteases, quimase e catepsina A, que podem hidrolisar a Ang I formando Ang II, ou pela hidrólise direta do AOPEN por outras serina proteases, tonina e pela catepsina G (Tonnesen e cols., 1982; Wintroub e cols., 1984; Resende e Mill, 2002). Contudo, apesar da Ang II, ainda, ser o principal produto ativo do SRA, sabe-se hoje, que outros peptídeos biologicamente ativos podem ser formados na cascata de hidrólise do SRA, na circulação e principalmente nos tecidos e, estes incluem, a Ang-(2-8) (Ang III), a Ang-(3-8) (Ang IV), a Ang-(1-7), a Ang-(1-12), a Ang-(1-9), a Ang A e a Alamandina, indicando que este é um sistema com múltiplos mediadores (Flores-Munoz e cols., 2012; Etelvino e cols., 2014; Huber e cols., 2017).

Tradicionalmente, a Ang II é conhecida pelos seus efeitos hemodinâmicos participando da regulação da resistência vascular, como um potente vasoconstritor e modulador da atividade simpática, contribuindo para retenção de água e sódio, além de estimular a liberação de vasopressina e aldosterona. Entre outras ações, a Ang II estimula a síntese de radicais livres, prostanóides, citocinas, fatores de transcrição e de crescimento. Desta forma, a Ang II está envolvida na fisiopatologia da hipertensão arterial, hipertrofia e fibrose cardíaca associada com o remodelamento ventricular e insuficiência cardíaca e também desenvolve uma papel importante na síndrome metabólica e diabetes (Bader e Ganten, 2008; Herichova e Szantoova, 2013; Passos-Silva e cols., 2015).

A Ang II exerce suas ações via receptores de membrana específicos acoplados a proteína G, denominados receptores AT1 e AT2. As ações mencionadas no parágrafo acima são

mediadas pelo receptor AT1. A interação da Ang II com o receptor AT2 desencadeia ações opostas àquelas via receptor AT1, como vasodilatação, inibe o crescimento e remodelamento celular, além de propriedades pró-apoptóticas (Bermann e cols., 1997; Bader e Ganten, 2008; Sun e cols., 2012; Herichova e Szantoova, 2013).

Os receptores AT1 estão presentes em muitos tecidos, incluindo cérebro, coração, vasos, rim, adrenais e outros. Em roedores, existem duas isoformas do receptor AT1, AT1A e AT1B, o receptor AT1A medeia a maioria das ações da Ang II. O mecanismo de transdução de sinal do receptor AT1 envolve ativação da fosfolipase C e da fosfolipase A₂ seguida pela formação do inositol trifosfato e do diacilglicerol os quais levam a mobilização de cálcio citosólico, resultando em contração do músculo liso e a ativação da proteína quinase C (PKC), respectivamente. Além dessa via de transdução de sinal, a ativação dos receptores AT1 também pode levar a inibição da adenilato ciclase, a abertura de canais de cálcio e a ativação de tirosinas quinases (Bermann e cols., 1997; Bader e Ganten, 2008; Herichova e Szantoova, 2013; Passos-Silva e cols., 2015).

O receptor AT2 apresenta 34% apenas de homologia ao receptor AT1 com alta expressão em tecido fetal em desenvolvimento. Em adultos, a expressão do receptor AT2 é restrita a glândulas supra-renais, rins, útero, ovário, coração e algumas regiões do cérebro. Embora a função dos receptores AT2 não esteja completamente elucidada, eles parecem contrabalançar alguns dos efeitos mediados pelo receptor AT1 no coração, vasos e na modulação da apoptose, estimulando a produção de bradicinina, óxido nítrico (NO), guanosina monofosfato cíclica (GMPc), ativando fosfolipase A₂ e gerando prostaglandinas (Bermann e cols., 1997; Herichova e Szantoova, 2013).

Outro peptídeo ativo do SRA, a Ang III [Ang-(2-8)], formada pela ação da aminopeptidase A (APA), apresenta a princípio, efeitos semelhantes àqueles produzidos pela Ang II, com maior ou aproximadamente a mesma afinidade pelo receptor AT1. No SNC, considera-se que o mediador final deste eixo seja a Ang III. A metabolização de Ang III pela

aminopeptidase N (APN) ou aminopeptidase B (APB), forma Ang IV [Ang-(3-8)] um peptídeo biologicamente ativo com afinidade muito baixa por receptores AT1 e AT2, exercendo suas ações via receptor AT4 uma aminopeptidase insulina-regulada, a IRAP. As ações de Ang IV via IRAP incluem vasodilatação renal, hipertrofia e ativação do fator de transcrição NF-κB (factor nuclear kappa B) (Santos e cols., 2003; Wright e cols., 2003; Fyhrquist e Saijonmaa, 2008; Marc e Llorens-Cortes, 2011).

A Ang-(1-7) foi considerada um membro inativo do SRA por um longo tempo, esse conceito começou a mudar quando os estudos de Schiavone e cols. em 1988 mostraram, pela primeira vez, que a Ang-(1-7) era equipotente à Ang II para estimular a liberação de vasopressina (AVP) em uma preparação de explantes hipotálamo-neurohipófise. O trabalho subsequente de Campagnole-Santos e cols. (1989), mostrou que a microinjeção de doses baixas (fmoles) de Ang-(1-7) no núcleo do trato solitário induzia efeito hipotensor, semelhante ao da Ang II. Estes trabalhos indicaram pela primeira vez que a Ang-(1-7) poderia ser um novo peptídeo biologicamente ativo do SRA, principalmente porque Santos e cols. em 1988 haviam mostrado que a formação de Ang-(1-7) poderia ocorrer de forma independente da formação de Ang II, ou seja, não se tratava apenas de um produto do metabolismo de Ang II. Desde então, vários trabalhos contribuíram para estabelecer o papel da Ang-(1-7) dentro do SRA.

Hoje o heptapeptídeo, Ang-(1-7), é reconhecido como um membro ativo do SRA, que pode ser gerado por diversas endopeptidases e carboxipeptidases a partir da Ang I ou Ang II (Huber e cols., 2017; Santos e cols., 2018), e por via independente da ECA. De forma importante a Ang-(1-7) pode ser formada por uma enzima homóloga à ECA, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (Tipnis e cols, 2000; Donoghue e cols., 2000), que é insensível aos inibidores de ECA (IECA) (Donoghue e cols., 2000). A formação de Ang-(1-7) a partir da Ang I via ECA2, envolve a produção de um intermediário, a Ang-(1-9), e sua subsequente hidrólise pela ECA ou pela endopeptidase neutra (NEP) (Rice e cols., 2004). No entanto, a eficiência catalítica dessa via é muito menor do que a conversão a partir da Ang II via

ECA2. Uma vez formada, a Ang-(1-7) pode ser hidrolisada pela ECA, formando Ang-(1-5) ou por aminopeptidases originando Ang-(2-7) e Ang-(3-7) considerados peptídeos inativos. Finalmente, recentemente observou-se que o primeiro aminoácido da Ang-(1-7) pode ser descarboxilado dando origem a um membro ativo do sistema, a Des-Asp¹-Ala¹-Ang-(1-7), a Alamandina (Lautner e cols., 2013).

A maioria das ações da Ang-(1-7) são mediadas por um receptor específico de membrana acoplado a proteína G, o receptor Mas (Santos e cols., 2003), podem ser antagonizadas por um peptídeo sintético modificado da Ang-(1-7), o A-779, reconhecido como antagonista seletivo do receptor Mas (Santos e cols., 1994; Ambühl e cols., 1994). Apesar de exercer alguns efeitos fisiológicos semelhantes aos da Ang II, após administração aguda, como a liberação de vasopressina e estimulação de áreas cerebrais, vários estudos mostram que a Ang-(1-7) possui muitos efeitos que são opostos aos desempenhados pela Ang II, como efeito vasodilatador, estimulador do controle barorreflexo, anti-proliferativo, anti-aritmogênico, anti-angiogênico, modulador da excreção de sódio e modulador da atividade do sistema nervoso autônomo (SNA). Estas ações estabeleceram a Ang-(1-7) ou a via ECA2/ Ang-(1-7)/ receptor Mas como um eixo contra-regulatório as ações do eixo ECA/ Ang II/ AT1 (Santos e cols., 2018).

Outros componentes do SRA identificados como, a Ang-(1-12) e a Ang A, podem atuar como precursores para a formação de peptídeos menores ou possuir efeitos independentes do seu papel como substrato. A Ang-(1-12) foi identificada por Nagata e cols. em 2006 em vários tecidos de roedores servindo como substrato independente da renina para a formação de Ang I e Ang II. Os efeitos da Ang-(1-12) podem ser bloqueados pelos IECA ou por antagonistas do receptor AT1, sugerindo seu papel como precursor da Ang II (Nagata e cols., 2006; Jessup e cols., 2008). No entanto, Chan e cols. (2013) relataram que a Ang-(1-12) se liga aos receptores AT1, sugerindo que, em algumas condições, seus efeitos poderiam ser independentes de seu papel como substrato. Além disso, a microinjeção de Ang-(1-12) em áreas discretas do bulbo e do hipotálamo induziu efeitos cardiovasculares que foram parcialmente antagonizados pelo A-

779, sugerindo que a Ang-(1-12) poderia também ser metabolizada em Ang-(1-7) (Ferrario e cols., 2014).

A Ang A é um octapeptídeo identificado pela primeira vez no plasma humano por Jankowski e cols. (2007) e difere da Ang II apenas em um resíduo de aminoácido devido à descarboxilação do aspartato (Asp¹) em alanina (Ala¹). Esse peptídeo tem a mesma afinidade que a Ang II pelos receptores AT1 e AT2 e, produz efeitos, tais como, vasoconstrição em rim de rato isolado e efeito pressor e de vasoconstrição renal em ratos anestesiados normotensos e hipertensos (Yang e cols., 2011a). No entanto, os efeitos desencadeados pela Ang A são menos pronunciados que os provocados pela Ang II. Mais recentemente, foi observado que a Ang A serve como substrato para formação de Alamandina (Lautner e cols., 2013).

O heptapeptídeo Alamandina, foi descrito por Lautner e cols. (2013), e identificado e caracterizado como um novo membro do SRA, presente no plasma de camundongos, ratos e humanos. Nesse estudo, Lautner e cols. (2013) descreveram a formação de Alamandina tanto pela hidrólise do octapeptídeo Ala¹-Ang II, (Ang A), pela ECA2 humana, como pela descarboxilação do aminoácido Asp¹ na porção N-terminal em Ala¹ da Ang-(1-7). Até o momento as ações da Alamandina se assemelham às da Ang-(1-7). Em anéis de aorta de camundongos FVB/N e ratos Wistar, a Alamandina promoveu vasodilatação dependente do endotélio, e da liberação de NO. Diferente dos efeitos da Ang-(1-7), o pré-tratamento com o antagonista do receptor Mas, A-779, não bloqueou o efeito vasodilatador induzido pela Alamandina. O efeito vasorrelaxante também foi preservado em camundongos com deficiência do receptor Mas. Desta forma, o novo peptídeo não parecia atuar via receptor Mas. Nesse mesmo estudo, Lautner e cols. (2013) mostraram que os efeitos da Alamandina eram bloqueados por outro antagonista, o D-Pro⁷-Ang-(1-7), e identificaram um outro receptor específico de membrana acoplado a proteína G, o receptor MrgD.

A Alamandina também promove atenuação da hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Lautner e cols., 2013), redução da vasoconstrição induzida pela Ang A em

aorta de coelhos com aterosclerose induzida (Habiyakare e cols., 2014), possui um efeito pressor inicial, via receptor AT1, seguindo de um efeito depressor quando infundida em modelo de rato 2 rins-1clip (Soltani e cols., 2017). A nível cerebral, a Alamandina apresenta efeito pressor na área rostroventrolateral do bulbo (RVLM) e efeito depressor na área caudoventrolateral do bulbo (CVLM), que são bloqueadas pela administração do antagonista D-Pro⁷-Ang-(1-7) (Lautner e cols., 2013; Soares e cols., 2017).

1.2 Sistema Renina Angiotensina Cerebral

Há várias décadas está bem estabelecido que além do SRA periférico, existe um sistema local no cérebro, especialmente considerando a presença de todos os componentes do SRA no SNC (Paul e cols., 2006). Embora tenha sido difícil de se detectar níveis apreciáveis de renina no SNC (Paul e cols., 1988; Tada e cols., 1989), um SRA cerebral independente do circulante foi sempre bem aceito, uma vez que grande parte das áreas que expressam receptores AT1 e AT2 estão dentro da barreira hemato-encefálica (BHE).

O primeiro estudo que sugeriu um SRA cerebral foi realizado por Bickerton e Buckley, em 1961, em cães através de circulação cruzada. Estes autores mostraram que as ações centrais específicas da Ang II eram independentes dos efeitos periféricos. Fitzsimons e cols. em 1971, mostraram que injeção de Ang II diretamente nos ventrículos cerebrais de ratos, produzia efeito dipsogênico. Outros autores mostraram que a Ang II interage com áreas encefálicas relacionadas com o sistema nervoso autônomo (SNA), promovendo aumento da pressão arterial (PA) (Ferrario e cols., 1970). A evidência da presença da renina no cérebro sempre foi um fator limitante, pois fornecia a base enzimática da produção de angiotensina local. Fisher-Ferraro e cols. (1971) e Ganten e cols. (1971a e 1971b), pela primeira vez, relataram uma atividade enzimática semelhante à renina no SNC. Desta forma, esses estudos indicaram que havia um SRA cerebral independente do SRA endócrino/ circulante, especialmente porque enquanto os

outros tecidos poderiam captar Ang II diretamente do sangue, o cérebro estaria protegido pela BHE.

A dificuldade em detectar quantidades significativas de renina no SNC e a presença de áreas desprovidas de BHE, chamadas de órgãos circumventriculares (CVOs), provocou dúvida sobre a geração de Ang II no cérebro. No entanto, Sirett e cols. em 1977 identificaram a presença de sítios de ligação para Ang II em várias áreas no SNC. E em 1985, Lind e cols., mostraram a expressão local de Ang II no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), núcleo supra-óptico (SON), CVOs e no núcleo do trato solitário (NTS). Além disso, vários autores relataram a impermeabilidade da BHE e da barreira sangue – líquido cefalorraquidiano à Ang II (Joy e Lowe, 1970; Volicer e Loew, 1971; Schelling e cols., 1976). Em adição, estudos mostraram que o AOPEN era sintetizado preferencialmente em células da glia, e, uma vez sintetizado, o AOPEN era secretado no espaço intersticial e no líquido cefalorraquidiano servindo de principal fonte para formação de Ang II cerebral (Deschepper e cols., 1986; Stornetta e cols., 1988). Juntamente com esses achados, outros estudos mostraram a presença de ECA em várias regiões do cérebro, utilizando a técnica de autorradiografia. Por ser uma ectoenzima, a ECA deve poder estar presente na membrana da célula, o que significa que as angiotensinas no SNC devem ser formadas fora da célula e, serem captadas por neurônios ou serem formadas por um mecanismo independente da ECA, possivelmente através da ação da catepsina G ou tonina (Mendelsohn e cols., 1984; Strittmatter e cols., 1984; Plunkett e cols., 1985; Chai e cols., 1987).

A controvérsia em torno da existência do SRA cerebral, no entanto, começou a ser lentamente minimizada apenas com evidências que mostraram a expressão de renina no SNC. Baseando nos achados de Ganten e cols. (1971a), os grupos de Lindpaintner (1999) e Sigmund (2006) relataram a presença da prorenina secretada e da renina não secretada (intracelular) no cérebro de roedores e humanos. Mais ainda que a superexpressão desses dois compostos levava

à hipertensão arterial, confirmando o papel fundamental desse sistema na regulação PA (Huber e cols., 2017).

A expressão da Ang II é alta no hipotálamo, sistema límbico, tronco cerebral e medula espinhal (Phillips e Sumner, 1998). A caracterização e a detecção de receptores para Ang II no SNC também foi uma importante condição para a determinação da existência do SRA cerebral (Paul e cols., 2006). Estudo realizado por Phillips (1987), mostrou que microinjeções de Ang II em núcleos centrais podem produzir efeitos pressor, liberação de vasopressina, efeito dipsogênio, redução da sensibilidade barorreflexa e aumento da atividade do sistema nervoso simpático. Outros estudos também mostraram a presença dos receptores angiotensinérgicos particularmente em regiões que exercem importante função na regulação da PA e da homeostase dos fluidos corporais, tais como CVO e NTS (Huber e cols., 2017).

Além da Ang II, outros peptídeos angiotensinérgicos, como a Ang III, Ang IV, Ang-(1-7) e Alamandina também foram identificados no cérebro (Huber e cols., 2017). A Ang III foi considerada anteriormente um dos principais peptídeos efetor do SRA cerebral (Reaux-Le Goazigo e cols., 2005). Embora a Ang II seja bem aceita como a principal forma ativa das angiotensinas no SNC, alguns estudos têm favorecido a hipótese de que a conversão da Ang II em Ang III seja necessária para a expressão das ações centrais da Ang II, sugerindo que Ang III seja o efetor final para o controle da PA, liberação de vasopressina e efeito dipsogênico (Zini e cols., 1996; Song e cols., 1997; Reaux e cols., 2001; Wright e cols., 2003). A Ang III têm maior ou aproximadamente a mesma afinidade pelos receptores AT1 e AT2 que a Ang II, pode ser gerada a partir da Ang II quando a aminopeptidase A cerebral hidrolisa o resíduo aspártico N-terminal da Ang II ou via ECA, que pode converter Ang I diretamente em Ang III (Huber e cols., 2017).

Como descrito anteriormente a Ang III é metabolizada em Ang IV pela APN e APB. A Ang VI ao contrário das outras angiotensinas apresenta ações mais restritas, com baixa afinidade pelos receptores AT1 e AT2, exercendo suas ações preferencialmente via receptor AT4 ou IRAP.

Acredita-se que os receptores AT4 estejam mais ligados a regulação das funções cognitivas, sensoriais e motoras e não desempenham um papel crucial no controle e regulação cardiovascular (Huber e cols., 2017). Desta forma, é provável que os efeitos cardiovasculares observadas com a administração intracerebroventricular (ICV) de Ang IV em ratos, sejam mediados pelos receptores AT1 (Huber e cols., 2017).

A Ang-(1-7) é outro peptídeo ativo do SRA presente no SNC e o foco da maioria dos estudos de nosso laboratório durante os últimos 30 anos. A primeira evidência in vivo mostrando que a Ang-(1-7) era um neuropeptídeo biologicamente ativo foi descrita por Campagnole-Santos e cols. em 1989. Neste estudo, a microinjeção de Ang-(1-7) no NTS ou no núcleo motor dorsal do vago (nX) causou efeito depressor e bradicárdico. Em seguida, no mesmo ano, Block e cols. descreveram a localização da Ang-(1-7) no hipotálamo em núcleos envolvidos com o controle cardiovascular. Chappell e cols. (1989), identificaram a presença de Ang-(1-7) em extratos hipotalâmicos. Posteriormente, imunocoloração intensa para Ang-(1-7) foi demonstrada em neurônios do SON e PVN do hipotálamo de ratos hipertensos TGR(mREN2)27 (Krob e cols., 1998) e a expressão de Ang-(1-7) também foi observada em cultura primária de neurônios de áreas do tronco cerebral e do hipotálamo, sugerindo também uma localização intracelular deste peptídeo em neurônios (Santos e cols., 2018).

Em 2003, um receptor órfão acoplada a proteína G, o receptor Mas, foi identificado em nosso laboratório por Santos e cols. como sendo o receptor da Ang-(1-7). Posteriormente, imunorreatividade para o receptor Mas foi descrita preferencialmente em neurônios por Becker e cols. (2007), em diversas áreas cerebrais de ratos Wistar, entre elas, núcleos do hipotálamo (PVN, SON) e áreas bulbares (NTS, RVLM, CVLM, NA), as quais estão relacionadas com a homeostase cardiovascular e balanço hidroeletrólítico. Além disso, outras áreas também mostraram expressão para o receptor Mas, como hipocampo, diferentes regiões do córtex, núcleo talâmico anterodorsal, amígdala e núcleo hipoglosso (nXII) (Bunnemann e cols., 1992; Metzger e cols., 1995; Becker e cols., 2007; Freund e cols., 2012). Recentemente, Regenhardt e cols.

(2013) mostraram imunorreatividade para o receptor Mas principalmente no soma de neurônios e micróglia do córtex cerebral de ratos adultos. Nenhuma marcação para o receptor Mas foi observada em astroglias.

Doobay e cols. em 2007, mostraram que a ECA2 está presente no cérebro, completando a identificação de todos os elementos do eixo ECA2 – Ang-(1-7) – Mas no SNC. Este estudo ainda mostrou que a expressão da ECA2 está localizada preferencialmente em neurônios e disseminada em todo cérebro, desde o telencéfalo até o bulbo. Desta forma, a presença do receptor Mas e da ECA2 em áreas relacionadas aos efeitos da Ang-(1-7), sugerem fortemente o envolvimento deste receptor nas ações da Ang-(1-7) e a síntese cerebral de Ang-(1-7) pela ECA2.

A Ang-(1-7) age como um importante neuromodulador, especialmente em áreas relacionadas ao controle tônico e reflexo da PA, como o hipotálamo e bulbo. Em contraste com a Ang II que produz atenuação da bradicardia barorreflexa e aumento da PA, a Ang-(1-7) demonstrou melhorar o controle barorreflexo da frequência cardíaca e reduzir PA tanto em animais normotensos quanto hipertensos (Campagnole-Santos, 1992; Huber e cols., 2017; Santos e cols., 2018).

A injeção de Ang-(1-7) no NTS, induz excitação neuronal (Barnes e cols., 1990), redução da PA em ratos normotensos (Campagnole-Santos e cols., 1989) e hipertensos (Chaves e cols., 2000; Diz e cols., 2008a) e um aumento significativo da sensibilidade do controle barorreflexo da FC (Chaves e cols., 2000). Complementando esses dados, foi observado por Diz e cols. (2008b), que a injeção de um inibidor da ECA2 no NTS atenua a função barorreflexa para o controle da FC em resposta ao aumento da pressão arterial, sugerindo que a síntese local de Ang-(1-7) a partir da Ang II é necessária para manter a sensibilidade normal do controle barorreflexo da FC.

Na CVLM, a Ang-(1-7) possui efeito hipotensor semelhante ao observado para Ang II em ratos normotensos (Alzamora e cols., 2002; Alzamora e cols., 2006) e hipertensos (Ferreira e cols., 2008). Esse efeito pode ser bloqueado pelo antagonista do receptor Mas da Ang-(1-7), A-

779, e o efeito hipotensor da Ang II pelo antagonista do receptor AT1, losartan (Santos e cols., 1994). A redução da pressão arterial causada pela Ang-(1-7) na CVLM se deve a estimulação de uma via nitrérgica sensível aos inibidores de NOS, L-NAME e 7-NI, enquanto a Ang II atua preferencialmente diminuindo o tonus simpático (Sasaki e cols, 1990; Sesoko e cols., 1995; Alzamora e cols., 2002). Além disso, a microinjeção de Ang-(1-7) na CVLM facilita a taquicardia barorreflexa e atenua a bradicardia, efeitos que, são abolidos com a administração intravenosa de M-atropina, sugerindo dependência de um mecanismo periférico colinérgico/nitrérgico (Alzamora e cols., 2006).

Wang e cols. em 2005, mostraram que a resposta depressora causada pela Ang-(1-7) na CVLM é acompanhada por aumento da liberação de glutamato e uma diminuição da liberação taurina. Esses efeitos são bloqueados pelo antagonista do receptor Mas, o A-779, que causa efeito oposto sobre a liberação desses neurotransmissores. O glutamato e a taurina são neurotransmissores excitatório e inibitório, respectivamente, que desempenham papéis importantes na regulação da atividade cardiovascular tônica e reflexa na CVLM (Kubo e cols., 1993). Desta forma, esses dados sugerem que a Ang-(1-7) pode modular a liberação de glutamato e taurina na CVLM, o que contribui, pelo menos em parte, para o efeito hipotensor da Ang-(1-7).

Aumento na pressão arterial pode ser observado quando a Ang-(1-7) foi injetada na RVLM de ratos normotensos (Fontes e cols., 1994; Fontes e cols., 1997; Zhou e cols., 2010; Li e cols., 2012) e um aumento mais pronunciado foi observado em ratos hipertensos (Nakagaki e cols., 2011; Ferreira e cols., 2015). A RVLM desempenha um papel fundamental na regulação da atividade vasomotora simpática, e a Ang-(1-7) quando injetada na RVLM, é tão eficaz quanto a Ang II, em aumentar o reflexo aferente simpático cardíaco, mesmo sem alterar o barorreflexo, resultando em um aumento da atividade nervosa simpática renal e da PAM (Alzamora e cols., 2006; Zhou e cols., 2010; Li e cols., 2013). Por sua vez, o bloqueio seletivo das ações

endógenas da Ang-(1-7) na RVLM pelo A-779 (resposta aguda), resulta em diminuição da PA (Fontes e cols., 1997; Fontes e cols., 2000; Li e cols., 2012; Li e cols., 2013).

O efeito pressor induzido por injeção de Ang-(1-7) na RVLM pode envolver a liberação de glutamato, vasopressina e aumento do tônus simpático associado a diminuição de glicina, taurina e GABA (Santos e cols., 2018). Por outro lado, a microinjeção de Ang-(1-7) próxima a RVLM não tem efeitos significativos na PAM e na atividade autonômica simpática renal, esclarecendo a especificidade da Ang-(1-7) na RVLM e confirmando não ser um efeito geral no SNC (Huber e cols., 2017).

Microinjeção de Ang-(1-7) no hipotálamo anterior (HA), não alterou a PA de ratos normais, porém reduziu a PA de ratos com desnervação dos barorreceptores. Por outro lado a Ang II produziu efeito excitatório em ratos controles e com desnervação dos pressoreceptores (Höcht e cols., 2008). Além disso, microinjeção de IECA no HA reduziu a PA dos ratos desnervados e esse efeito foi bloqueado por A-779, sugerindo que a queda da PA causada pelos IECA é devido a formação de Ang-(1-7) (Höcht e cols., 2008). Cerrato e cols. (2012) também mostraram que a injeção de Ang-(1-7) no HA causa redução da PA em ratos SHR, e que, esse efeito é atenuado com a inibição da síntese de NO. Os autores também relatam que a Ang-(1-7) induziu um aumento na atividade de NOS e na expressão de NOS neuronal (nNOS) no hipotálamo de SHR. Reforçando a ação da Ang-(1-7) na geração de NO, o estudo de Yang e cols. (2011), mostrou que a estimulação de neurônios catecolaminérgicos com Ang-(1-7) causou um aumento na síntese de NO por meio da ativação da nNOS, que, por sua vez, ativa correntes de potássio.

Da mesma forma que na RVLM, os efeitos (resposta aguda) da Ang-(1-7) no PVN são similares aos da Ang II, tais como, aumenta o reflexo aferente simpático cardíaco, a atividade nervosa simpática renal e a PAM. Esses efeitos são mediados pela ativação do receptor Mas via cAMP-PKA (Silva e cols., 2005; Han e cols., 2012; Santos e cols., 2018). Além disso, Qadri e cols. em 1998, confirmaram o estudo de Schiavone e cols. (1988), mostrando que a microinjeção

de Ang-(1-7) no PVN induz liberação de AVP. Por sua vez, a infusão crônica de A-779 no PVN previne a hipertensão em um modelo de rato com apneia do sono (Silva e cols., 2011).

Estudos realizados com manobras para produzir aumento crônico da Ang-(1-7) mostraram queda da PA em animais hipertensos. A superexpressão de ECA2 na RVLN (Yamazoto e cols., 2007) ou no PVN (Zheng e cols., 2011) induz diminuição significativa e mantida por semanas da PA de SHR (Yamazoto e cols., 2007), atenuação da atividade simpática e melhora da função barorreflexa em animais com insuficiência cardíaca congestiva (Zheng e cols., 2011). Feng e cols. (2010), mostraram também que a superexpressão de ECA2 no SNC reverte a hipertensão neurogênica, impedindo parcialmente a redução da sensibilidade do barorreflexo e do tônus parassimpático. Esses autores relatam que a Ang-(1-7) desempenha um papel fundamental na reversão da hipertensão neurogênica, promovendo ativação de NOS levando a uma maior liberação de NO no SNC. Centralmente, a Ang-(1-7) diminui a liberação de noradrenalina através de um mecanismo relacionado a bradicinina e NO (Gironacci e cols., 2000; Gironacci e cols., 2004). Feng e cols. (2010) mostraram também que a superexpressão de ECA2 no cérebro diminui os níveis de noradrenalina na urina em resposta a hipertensão induzida por Ang II.

Em contraste com o efeito estimulador clássico da Ang II, a infusão de curto prazo de Ang-(1-7) no ventrículo lateral (ICV) não produziu efeito dipsogênico e melhorou o controle barorreflexo da FC em animais normotensos (Campgnole-Santos e cols., 1992). Além disso, a infusão ICV de Ang-(1-7) a longo prazo, por sua vez, atenuou os níveis elevados da PA, melhorou o controle barorreflexo da FC e o tônus autonômico em diferentes modelos de hipertensão (Dobruch e cols., 2003; Guimarães e cols., 2012; Nautiyal e cols., 2012; Jiang e cols., 2013; Kangussu e cols., 2015) ou em animais submetidos a um modelo de síndrome metabólica (Guimarães e cols., 2014). Desta forma, está claro que o papel da Ang-(1-7) no SNC depende do estado fisiopatológico de base e da duração do estímulo.

Os efeitos da Ang-(1-7) não se restringem ao sistema cardiovascular, vários estudos relataram um importante papel para esse peptídeo em processos de estresse, aprendizagem e memória que ocorrem em regiões límbicas, como o hipocampo e a amígdala (Santos e cols., 2018). Além de atenuar comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão, a Ang-(1-7) exerce uma influência neuroprotetora no acidente vascular encefálico isquêmico e hemorrágico (Santos e cols., 2018).

Estudos anteriores mostraram que os peptídeos, Ang II e Ang-(1-7), apresentam efeitos distintos em modelos experimentais de ansiedade e depressão. A administração intracerebroventricular (ICV) de Ang II induziu um comportamento semelhante à ansiedade no teste de conflito de Vogel (Georgiev e cols., 1990). Por outro lado, o antagonista do receptor de Ang II (receptor AT1), losartan, foi capaz de diminuir a ansiedade em ratos expostos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE; Kaiser e cols, 1992). Além disso, camundongos submetidos ao teste de natação forçada (FST) que receberam o inibidor da ECA, captopril, mostraram imobilidade reduzida e aumento da atividade motora, efeito semelhante ao antidepressivo tricíclico, imipramina (Giardina e Ebert, 1989). Em ratos Wistar expostos ao teste LCE, a injeção ICV crônica de Ang-(1-7) promoveu um efeito ansiolítico (Bild e Ciobica, 2013).

Estudos em animais transgênicos e animais com deleção genética do receptor Mas (knockout; KO) corroboraram estes achados. Ratos transgênicos, TGR(A1-7)3292, com aumento dos níveis circulantes de Ang-(1-7), apresentaram comportamento do tipo ansiolítico e antidepressivo em testes de LCE e FST, respectivamente. Estes comportamentos foram atenuados com a injeção ICV do antagonista do receptor Mas, A-779 (Kangussu e cols., 2017), sugerindo que estes efeitos se devem a Ang-(1-7). Além disso, efeito ansiolítico e antidepressivo também foi observado após injeção ICV de Ang-(1-7) em ratos transgênicos hipertensos (mRen2)27 (Almeida-Santos e cols., 2016). Por outro lado, camundongos machos que não possuem o receptor Mas (Mas-KO), receptor funcional de Ang-(1-7), exibiram comportamento de ansiedade no teste do LCE, sugerindo um possível efeito ansiolítico à Ang-

(1-7) (Walther e cols., 2000). O mesmo comportamento relacionado a ansiedade foi observado na linhagem de ratos transgênicos, TGR (ASrAOGEN)680, que apresentam níveis baixos de angiotensinogênio e conseqüentemente de Ang II e Ang-(1-7) no cérebro (Kangussu e cols., 2013). Além disso, a linhagem TGR (ASrAOGEN)680 também mostrou comportamentos relacionados à depressão quando submetidos ao teste de FST (Kangussu e cols., 2013). Estes animais apresentam redução de serotonina (5-HT) no cérebro em regiões envolvidas com o controle emocional e funções cognitivas como hipocampo e córtex frontal (Voigt e cols., 2005). Estes dados sugerem que os comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão dos ratos TGR (ASrAOGEN)680 podem ser devidos aos níveis diminuídos de angiotensinas e serotonina no cérebro (Voigt e cols., 2005; Kangussu e cols., 2013).

Está bem estabelecido na literatura que a 5-HT atua no SNC na modulação de várias funções fisiológicas e comportamentais, tais como o humor, sono, dor, apetite, agressão, comportamento sexual e ansiedade (Murphy e cols., 1998). A síntese de 5-HT é limitada às células que contêm a enzima triptofano hidroxilase (TrpOH). No SNC, a enzima TrpOH está presente em neurônios encefálicos localizados principalmente no tronco encefálico, denominados núcleos da rafe (Walther e cols., 2003). Em camundongos machos, Ayyub e cols., (2017) mostraram que a administração crônica de irbesartan, um antagonista do receptor de Ang II (AT1), promoveu efeitos semelhantes aos antidepressivos nos testes de FST, teste de suspensão de cauda e teste de campo aberto com aumento dos níveis cerebrais de 5-HT. Mais recentemente, resultados do nosso laboratório mostraram que administração central do antagonista do receptor Mas, A-779, atenuou o efeito ansiolítico e antidepressivo induzido pelo tratamento com o inibidor da ECA, enalapril, em ratos hipertensos (Almeida-Santos e cols., 2016). Estes dados sugerem que o efeito dos IECA pode estar aumentando os níveis de Ang-(1-7), uma vez que estudos mostram que IECA aumentam os níveis de Ang-(1-7) (Campbell e cols., 1994; Chappell e cols., 1998).

Recentemente, Klempin e cols. (2018) mostraram que camundongos com deficiência de ECA2 apresentam redução dos níveis cerebrais de 5-HT e prejuízo na resposta neurogênica ao exercício, uma vez que, a 5-HT é necessária para respostas rápidas nas mudanças de atividade física. O estudo de Wang e cols. (2016) mostrou que a deficiência de ECA2 em camundongos também causa comprometimento da função cognitiva e que os mecanismos envolvidos podem estar associados, pelo menos em parte, ao aumento do estresse oxidativo, bem como diminuição do nível do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo.

Walther e cols., em 1998 observaram o efeito da deleção do receptor Mas (camundongos KO) sobre os potenciais de ação em áreas do hipocampo em testes de aprendizagem e comportamento de ansiedade. Esses autores mostraram que em animais Mas-KO ocorre um aumento na duração do potencial de longo prazo (LTP) em áreas como o giro denteado (GD) sem, no entanto, afetar a morfologia do hipocampo. A alteração dos potenciais de ação nos animais Mas-KO não é consequência de alterações na excitabilidade ou mudanças na função pré-sináptica, uma vez que, estas variáveis são idênticas a dos animais controles (WT). A alteração no potencial de ação parece estar envolvida com o *rebote* do potencial nos animais KO, sustentando a hipótese de que o Mas está envolvido na plasticidade neuronal na área do GD.

Hellner e cols. mostraram em 2005 que a Ang-(1-7) aumenta a excitabilidade dos neurônios e os LTP na área CA1 do hipocampo, enquanto que em animais Mas-KO o aumento de LTP induzido por Ang-(1-7) não foi observado. Além disso, o bloqueio ou a ablação do receptor Mas na área CA1 do hipocampo prejudicou a memória de reconhecimento de objetos (Lazaroni e cols., 2012). Alguns trabalhos mostram que o córtex piriforme também participa da neurogênese e do LTP (Jung e Larson, 1994; Pekcec e cols., 2006; Rivers e cols., 2008), desta forma é possível que a Ang-(1-7) através do receptor Mas induza os mesmos efeitos observados no hipocampo. Na amígdala, a microinjeção de Ang-(1-7) aumenta os LTP (Albrecht, 2007) e a Ang II produz uma diminuição da amplitude do disparo dos potenciais de ação em animais Mas-

KO via receptores AT₁ (Von Bohlen und Halbach e cols., 2000). Estes resultados sugerem a participação da Ang-(1-7) nos mecanismos atribuídos à aprendizagem e à memória.

Por fim, no corpo estriado a Ang-(1-7) tem um papel no controle do movimento, porque é capaz de afetar a liberação de dopamina e GABA (Stragier e cols., 2005), além de um efeito cerebroprotetor no AVE isquêmico, reduzindo o número de hemorragias no estriado de ratos SHR-SP (ratos espontaneamente hipertensos propensos a AVE) (Regenhardt e cols., 2014).

Desta forma, está bem claro na literatura o papel neuromodulador do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas no SNC e que, um desequilíbrio dos dois eixos do SRA no cérebro favorecendo a atividade do eixo ECA/Ang II/AT₁, está envolvido na fisiopatologias da hipertensão arterial, síndrome metabólica, insuficiência cardíaca, distúrbios emocionais e estresse (Santos e cols., 2018).

Recentemente dados controversos foram relatados por Van Thiel e cols. (2017). Esses autores concluíram que a renina detecada no cérebro é derivada do plasma e que conseqüentemente, a Ang II no cérebro também é captada do sangue através dos CVOs ou quando há alteração da permeabilidade da BHE em condições fisiopatológicas como a hipertensão arterial. Esses autores mostraram que os níveis de renina no cérebro correlacionam-se com os níveis plasmáticos e que a relação cérebro/plasma foi reduzida após o tratamento com o antagonista do receptor AT₁, olmesartam. Além disso, Van Thiel e cols. (2017) não conseguiram detectar prorenina e AOPEN em astrócitos extraídos do cérebro de ratos e camundongos, que até o presente sustentam a geração local de angiotensinas. Estudos futuros deverão comprovar estes achados, uma vez que contrastam com os obtidos por vários autores que durante anos propuseram a geração de angiotensinas no cérebro através da renina intracelular derivada de um transcrito alternativo e/ou através da prorenina (Lavoie e cols., 2006; Feng, 2015; Huber e cols., 2015; Shinohara e cols., 2016).

1.3 Animal Transgênico [TGR(A1-7)7371]

Os ratos transgênicos TGR(A1-7)7371 foram produzidos com base na metodologia desenvolvida por Kats e cols. (2001) e Methot e cols. (2001) onde uma proteína de fusão contendo um peptídeo de interesse pode ser expressa em um tecido específico, a partir de um transgene ou “*construct*” que é injetado em zigotos e implantado em ratas pseudo-grávidas. Desta forma, o nosso laboratório em colaboração com o do Dr. Michael Bader, do Max-Delbruck Center for Molecular Medicine (MDC-Berlin), Alemanha, desenvolveu um novo rato transgênico com superexpressão de Ang-(1-7) no cérebro. O transgene utilizado foi desenvolvido a partir daquele usado para produzir um outro modelo de rato transgênico, o [TGR(A1-7)3292] (Santos e cols., 2004). Como apresentado na Figura 2, a proteína de fusão foi composta por: (1) peptídeo sinal proveniente da proteína humana, o qual assegura que a proteína entre no retículo endoplasmático para a futura secreção desta proteína para o meio extracelular; (2) porção da região constante da cadeia pesada da IgG2b de camundongo, que promove massa para a proteína de fusão; (3) porção do pró-segmento da prorenina humana, o qual funciona como um espaçador molecular, pois é necessário para expor o sítio de clivagem para a endoprotease furina o que resulta na liberação do peptídeo; (4) sítio de clivagem na porção carboxi-terminal do pró-segmento da prorenina humana, sendo que neste sítio de clivagem a endoprotease furina atuará liberando a Ang-(1-7) nos tecidos; (5) a sequência do peptídeo que será liberado, a Ang-(1-7) e, finalmente, (6) a sequência Poly A. Para direcionar a expressão gênica no cérebro foi adicionado na extremidade 5’ do transgene ou “*construct*” o promotor GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein/ Proteína ácida fibrilar glial) (Brenner e cols., 1994; Schinke e cols.,1999). Esperava-se que estes animais expressariam o transgene [GFAP-Ang-(1-7)] apenas em células cerebrais, e que a produção contínua de Ang-(1-7) promoveria um aumento de sua concentração localmente.

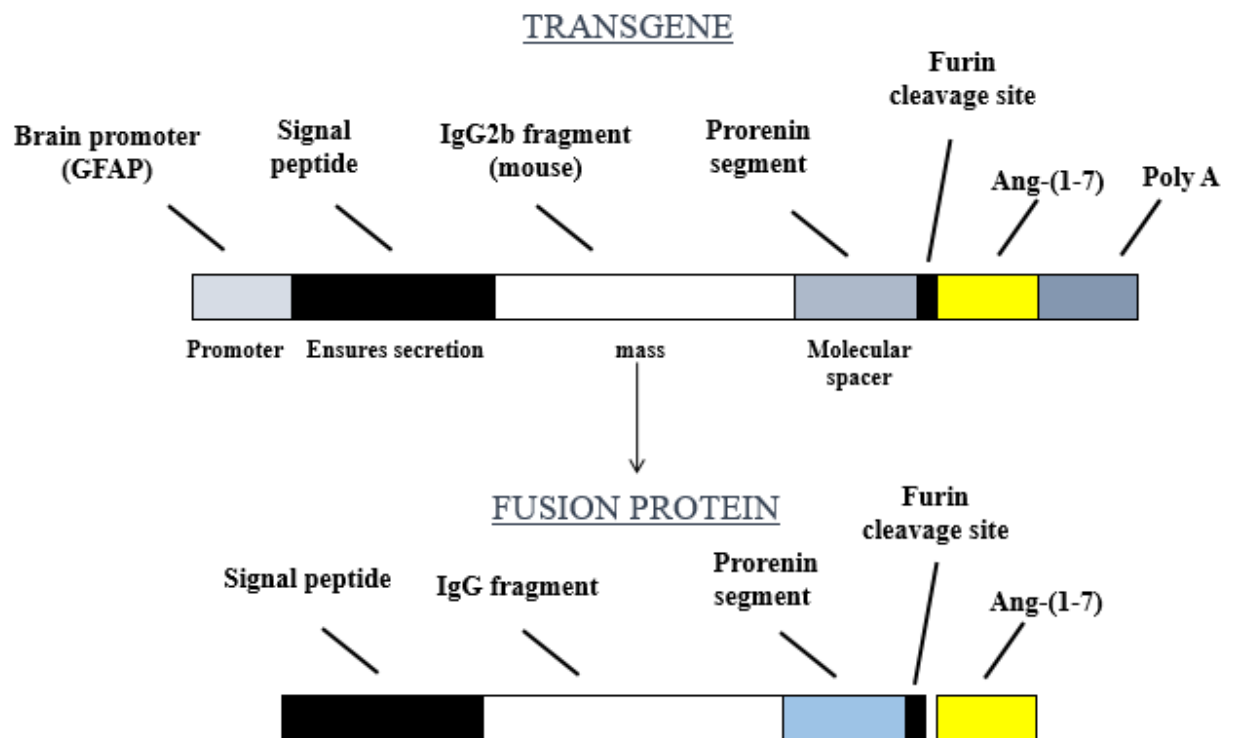


Figura 2. Sequência do transgene e proteína de fusão dos Ratos [TGR(A1-7)7371]
 Representação esquemática de componentes estruturais da proteína de fusão codificada pelo transgene, utilizado na geração dos ratos [TGR(A1-7)7371]. A Ang-(1-7) é liberada pela ação da furina durante a secreção. Modificada de: Santos e cols., 2004.

II JUSTIFICATIVA

O SRA desempenha papel importante na regulação da pressão arterial e no controle hidroeletrólítico. Vários estudos contribuíram para ampliar o entendimento do papel fisiológico desse sistema no controle da pressão arterial, bem como, o seu papel fisiopatológico no desenvolvimento e manutenção das doenças cardiovasculares (Bader e Ganten, 2008). Já está estabelecido que a hiperatividade da via Ang II/ receptor AT1 desse sistema, tanto circulante como tecidual, contribui para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a insuficiência cardíaca e hipertensão arterial (Atlas, 2007; Bader e Ganten, 2008; Santos e cols., 2018). O aumento inapropriado e de longa duração de Ang II atua de forma deletéria devido, principalmente, a sua ação pró-inflamatória, proliferativa e indutora de estresse oxidativo (Dagenais e Jamali, 2005; Bendall e cols., 2002; Wang e cols., 2002; Passos-Silva e cols., 2015). Por outro lado, o aumento de Ang-(1-7), via receptor Mas, desencadeia efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, tais como, anti-inflamatório, anti-proliferativo e atenuador do estresse oxidativo (Passos-Silva e cols., 2015; Santos e cols., 2018). No SNC, o aumento de longo prazo da Ang-(1-7) ou ativação da ECA2 também exerce efeitos que contrabalançam os efeitos da Ang II, reduzindo a pressão arterial de animais hipertensos ou com síndrome metabólica, melhorando o funcionamento do barorreflexo, aumentando o tônus parassimpático-vagal periférico (Campagnole-Santos e cols, 1992; Yamazoto e cols., 2007; Feng e cols., 2010; Guimarães e cols., 2012; Cerrato e cols., 2012; Nautiyal e cols., 2012; Jiang e cols., 2013; Guimarães e cols., 2014; Kangussu e cols., 2015).

Considerando a importância desse sistema para a regulação da pressão arterial e a comprovado papel protetor da Ang-(1-7) no sistema cardiovascular, a disponibilidade de um modelo de rato transgênico que superexpressa Ang-(1-7) no cérebro, pode tornar-se uma ferramenta importante para investigar os efeitos a longo prazo do aumento local de Ang-(1-7) e ampliar o entendimento dos mecanismos de ação deste peptídeo no SNC sobre o controle da pressão arterial na normotensão ou na hipertensão arterial.

Em estudo anterior (Alves, 2014; Dissertação de Mestrado) avaliamos os parâmetros cardiovasculares deste animal transgênico. Nossos resultados mostraram que a principal característica do TGR(A1-7)7371 foi apresentar PAM mais baixa do que animais normotensos SD. Esse dado foi obtido tanto com o registro da pressão arterial por telemetria, como com sistema de registro de curto prazo (BIOPAC). No entanto, esses animais apresentaram aumento do tônus simpático cardíaco e vascular acompanhado de aumento dos níveis plasmáticos de AVP e redução do volume urinário. Os níveis de Ang-(1-7) circulantes e no SNC dos animais TGR também foram determinados para avaliar se este peptídeo estava alterado apenas no SNC. Observamos aumento significativo da concentração de Ang-(1-7) no hipotálamo e, embora os dados não tenham alcançado significância estatística, observamos também uma tendência ao aumento da concentração de Ang-(1-7) no bulbo e outras regiões do encéfalo. Em conformidade, foi observado uma redução significativa (“down-regulation”) na expressão proteica do receptor Mas no bulbo e hipotálamo. Desta forma, é nossa hipótese que o nível de PA dos ratos transgênicos seja resultado do balanço entre mecanismos compensatórios e efeitos diretos desencadeados pela ativação de áreas específicas do SNC pela Ang-(1-7). O mecanismo periférico e as áreas centrais que expressam a proteína de fusão precisam ser identificados para explicar o fenótipo do rato TGR.

III OBJETIVO GERAL

Identificar os mecanismos centrais e periféricos envolvidos no fenótipo cardiovascular de ratos TGR(A1-7)7371.

3.1 Objetivos Específicos

1) Avaliar parâmetros hemodinâmicos, tais como, fluxo sanguíneo regional, débito cardíaco (DC), resistência periférica (RP) e pressão arterial em ratos TGR(A1-7)7371;

2) Avaliar os níveis plasmáticos do peptídeo natriurético e vasodilatador, ANP, em ratos TGR(A1-7)7371;

3) Identificar, por imunofluorescência, a expressão do transgene em áreas/núcleos cerebrais, principalmente do bulbo e hipotálamo, em ratos TGR(A1-7)7371,

4) Identificar os tipos celulares, astrócitos e/ou neurônios, que expressam a proteína de fusão no cérebro de ratos TGR(A1-7)7371;

5) Avaliar e quantificar, por imunofluorescência, RT-PCR e RT-PCR em tempo real a expressão da proteína de fusão e do mRNA do transgene [GFAP-Ang-(1-7)] em áreas/núcleos cerebrais de ratos TGR(A1-7)7371.

6) Avaliar e quantificar, por imunofluorescência, RT-PCR e RT-PCR em tempo real a expressão da proteína de fusão e do mRNA do transgene [GFAP-Ang-(1-7)] em tecidos periféricos em ratos TGR(A1-7)7371.

IV MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Nesse estudo foram utilizados ratos Sprague-Dawley (SD) e [TGR(A1-7)3292] como grupo controle e ratos transgênicos [TGR(A1-7)7371], machos entre 12-16 semanas de idade (350g-450g) provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão – Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e do Biotério de Ratos Transgênicos do Max Delbrück Center (MDC), Berlim, Alemanha. Os animais foram mantidos em ambiente com luz e temperaturas controladas (período de claro/escuro de 12/12 h) e alimentados com ração apropriada e água filtrada *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, protocolo n° 303/2012 e 400/2017 e por autoridades locais alemãs.

4.2 Avaliação do fluxo sanguíneo em diferentes territórios

O fluxo sanguíneo regional e o débito cardíaco foram determinados usando microsferas de poliestireno fluorescente de 15µm (FluSpheres Blood Flow Determination, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). Através deste método partículas esféricas de poliestireno de 10-15 µm de diâmetro são injetadas no sistema circulatório e se alojam nos capilares podendo ser posteriormente extraídas e a fluorescência quantificada. A partir desta quantificação o fluxo em cada tecido pode ser estimado. Esta avaliação é realizada em animais anestesiados.

4.2.1 Preparo do animal

Inicialmente os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, por via intraperitoneal; Sigma-Aldrich; EUA) e a traqueia foi canulada com catéter (18G) para manter a patência das vias aéreas. A artéria braquial esquerda foi canulada com tubo de polietileno (PE-10) para registro dos parâmetros cardiovasculares, pressão arterial e frequência cardíaca, em um

sistema de aquisição de dados (MP100/150 – Acqknowledge IV; Biopac System; Santa Barbara, CA, EUA). Para administração das microesferas fluorescentes foi introduzida no ventrículo esquerdo (VE), pela artéria carótida direita, uma cânula de polietileno (PE-50) conectada a um transdutor de pressão. O posicionamento da cânula dentro do VE foi confirmado pelo registro típico da pressão ventricular. A artéria femoral direita foi também canulada e conectada a uma bomba (Minipuls 3, Gilson; Villiers le Bel, France) para retirada do sangue.

4.2.2 Experimento

Inicialmente, microesferas de poliestireno de uma determinada cor fluorescente (15 μ m) foram selecionadas e suspensas em solução salina contendo 0,02% de Tween-80 e 0,02% de timerosal, na concentração de 10⁶ esferas por ml, de acordo com o método padronizado por Glenny e cols. (1993) e Gervais e cols. (1999). Para evitar sedimentação, as microesferas eram homogeneizadas em banho ultrassônico e por agitação vigorosa em Vortex por 2 min. A seguir, 300.000 microesferas fluorescentes (0,3 ml da suspensão) foram infundidas no VE por 5s, seguida da infusão de 0,3 ml de salina durante um período adicional de 5s. Uma amostra de sangue arterial de referência foi retirada durante 90s começando 5s antes da infusão das microesferas a uma taxa de 0,85 ml/ min, através da artéria femoral direita. Após 10 min. da injeção das microesferas, os ratos foram eutanasiados com uma superdosagem do anestésico e os tecidos (rins, cérebro, mesentério, adrenais, baço, pele abdominal, músculo gastrocnêmico esquerdo, pulmão, testículos, ventrículo esquerdo, tecido adiposo marrom interescapular e tecido adiposo branco epididimal) foram dissecados, pesados e armazenados em frascos individuais. Utilizando uma solução de KOH etanólico 4M contendo 2% de Tween 80, as amostras de sangue e tecidos foram digeridas num banho quente (50°C) “overnight”. As microesferas foram recuperadas através da metodologia de sedimentação desenvolvida por Van Oosterhout e cols. (1995) e o composto fluorescente foi extraído em 4 ml de solvente orgânico de acetato de etila.

4.2.3. Cálculos para determinar parâmetros hemodinâmicos

A intensidade de fluorescência dos tecidos/ órgão foi medida utilizando um espectrofotômetro (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer; Varian; CA, EUA). Os seguintes parâmetros foram calculados: débito cardíaco (DC), volume sistólico (VS), resistência periférica total (RPT), índice cardíaco (IC), fluxo sanguíneo regional e resistência vascular regional. O fluxo sanguíneo tecidual é calculado pela fluorescência e normalizado pelo peso do tecido em gramas (Glenny e cols., 1993; Van Oosterhout e cols., 1995; Gervais e cols., 1999; Sampaio e cols., 2003). Parâmetros Calculados:

- Fluxo Sanguíneo Regional - (Q_o , ml/ min.g órgão)

$$Q_o = \text{fluorescência do órgão} \times Q_f / \text{peso do órgão (g)} \times R_f$$

Onde:

R_f = fluorescência da amostra sanguínea

Q_f = peso da amostra sanguínea de referência (g) \times 60/ densidade do sangue (1,06) \times tempo de coleta do sangue (90s)

- Resistência Regional (RV, mmHg/ ml/ min.g órgão)

$$RV = PAM / Q_o$$

- Débito Cardíaco (DC, ml/ min)

$$DC = T \times Q_f / R_f$$

Onde:

T = total de fluorescência infundido

- Índice Cardíaco (IC, ml/ min.100g)

$$IC = DC / \text{peso corporal}$$

- Resistência Periférica Total (mmHg/ml/min.100g)

$$RPT = PAM / IC$$

4.3 Avaliação dos níveis plasmáticos do peptídeo natriurético atrial (ANP)

Os animais foram sacrificados por decapitação e amostras de sangue cervical foram coletadas em tubos de polipropileno resfriados contendo inibidores de proteases (EDTA, 7,5%; Pepstatina A, 1mM; e PMSF, 10^{-5} M). A seguir o sangue foi centrifugado à 2.500 rpm por 20 min à 4°C e o plasma separado e estocado em freezer -20°C até a realização da dosagem. O nível de ANP plasmático foi avaliado através de ensaio imunoenzimático (EIA Kit, Phoenix Pharmaceuticals, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.4 Avaliação da expressão da proteína de fusão por imunofluorescência (IF)

4.4.1 Expressão da proteína de fusão por IF em áreas do cérebro

Para avaliar as áreas, núcleos e os tipos celulares que apresentavam expressão da proteína de fusão no cérebro foi utilizado o ensaio de marcação por IF, modificado do método utilizado anteriormente em nosso laboratório (Becker e cols., 2007). Inicialmente, os animais (n= 12) eram anestesiados com isoflurano (USP, Baxter, EUA), o tórax aberto para expor o coração e submetidos a perfusão com tampão fosfato-salina (PBS; 0,02 M, pH 7,4) por 2 min. seguida de perfusão com solução de paraformaldeído 4% (PFA; Fischar) por 15 min., através de punção manual com seringa ou bomba (Minipuls 3, Gilson; Villiers le Bel, France) do VE com um dispositivo endovenoso (cateter 20G). O cérebro era então removido, imerso em PFA 4% por 2 hs e, em seguida, lavado 1x vezes em PBS (0,02 M pH 7,4) e transferido para solução de sacarose (30% em PO_4 0,1M) “overnight”.

No dia seguinte, o cérebro era incluído em Tissue Tek (OCT compound, Miles, EUA) e secções de 40-50 μm , no plano frontal, eram feitas em micrótomo de congelamento (criostato, Leica; EUA) à temperatura de -22°C e mantidas em solução crioprotetora (solução padrão fosfato, PO_4 0,1M; glicerol, 25%; e glicina, 25%). As secções eram lavadas por 3 vezes pelo método de banho livre (free floating) em PBS (0,02 M, pH 7,4) por 10 min, para hidratação do tecido. A seguir, incubadas em PBS (0,02 M pH 7,4) contendo "Tween 20" (0,2%) e soro de

burro (1%) durante 1 hora, para bloqueio de ligações não-específicas. Em seguida, as secções eram incubadas à 4°C com anticorpos primários por 20 horas. Após este período de tempo, as secções eram lavadas 3 vezes durante 10 minutos em solução de PBS (0,02 M pH 7,4) e a seguir incubadas com anticorpos secundários por 3 horas. Após este período as secções eram lavadas 3 vezes durante 15 minutos em PBS (0,02 M pH 7,4) e montadas em lâminas polarizadas (Superfrost® Plus, Thermo Fisher Scientific, EUA) com meio de montagem Vecta-shield (DAPI, Vector Laboratories, EUA). Após a secagem, os cortes de cérebro foram analisados por microscopia confocal (Zeiss LSM 700 ou 880, Alemanha) ou pelo microscópio de fluorescência BZ-9000 (BioRevo, Keyence, Japão).

4.4.1.1 Protocolo do ensaio de IF

Foram realizadas marcações simples ou duplas utilizando os seguintes anticorpos: 1) Primários: Anti-mouse-IgG2b para detecção da proteína de fusão produzido em coelho (Rabbit, 1:300, Abcam®, Reino Unido; e Invitrogen, EUA), anti-GFAP para a identificação de astrócitos produzido em cobaias (Guinea pig, 1:500, Acris Antibodies, Reino Unido) e anti-beta tubulin III (Tuj1, Abcam®) para neurônios produzido em galinha (Chicken, 1:200, Abcam®); 2) Secundários: Cy3 (Anti-rabbit, 1:300, Jackson ImmunoResearch Laboratories, EUA), Alexa 488 (Anti-Guinea pig, 1:300, Jackson ImmunoResearch Laboratories, EUA) e Alexa 488 (Anti-chicken, 1:300, Jackson ImmunoResearch Laboratories, EUA). Os anticorpos foram diluídos na mesma solução utilizada para o bloqueio de ligações não-específicas. Como controle positivo para a marcação com o anticorpo anti-IgG2b foi utilizado testículo de ratos transgênicos [TGR(A1-7)3292] que superexpressam a mesma proteína de fusão apenas neste tecido. Como controle negativo, foi utilizado tecidos (cérebro e testículo) de ratos SD. Nenhuma reatividade cruzada com IgG1, IgG2a, IgG3, IgM, IgA, IgE de camundongo, IgG humana, IgG de rato ou IgG de cabra foi relatada pelos fabricantes. Desta forma, os cortes foram marcados:

- Marcação simples: Anti-IgG2b e Cy3 para marcar apenas a proteína de fusão.
- Dupla marcação: 1) Anti-IgG2b e Cy3; anti-GFAP e Alexa 488 para marcar a proteína de fusão e astrócitos, respectivamente; 2) Anti-IgG2b e Cy3; e anti-Tuj1 e Alexa 488 para marcar a proteína de fusão e neurônios, respectivamente.

4.4.2 Expressão da proteína de fusão por IF em tecidos periféricos

Para avaliar a expressão da proteína de fusão na aorta, coração e pulmão de ratos (n= 6) TGR(A1-7)7371 e SD (grupo controle) foi utilizado o ensaio de IF em secções congeladas ou parafinadas padronizado e modificado a partir do método descrito por Menon e Fisher, 2015. Cérebro de ratos TGR(A1-7)7371 e testículo de ratos TGR(A1-7)3292 também foram utilizados como controle positivo para a validação da técnica.

4.4.2.1 Tecidos congelados

Os animais foram sacrificados por decapitação e os tecidos foram coletados e imersos em PFA 4% “overnight” à 4°C, e, em seguida, lavados em PBS (0,02 M pH 7,4) e transferidos para álcool 70%. No dia seguinte os tecidos foram colocados em Tissue Tek (OCT compound) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Secções de 6 µm de espessura foram obtidas em micrótomo de congelamento (criostato, Leica) a temperatura de -22°C coletadas em lâminas de vidro polarizada (Superfrost® Plus).

4.4.2.2 Tecidos parafinados

Inicialmente os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos no item 4.4.1 para perfusão com PBS e PFA 4% através de punção do VE. A seguir, os tecidos foram imersos em PFA, 4% “overnight” à 4°C, e, em seguida, lavados em PBS (0,02 M pH 7,4) e transferidos para álcool 70% até o momento da desidratação por banhos sucessivos (2 vezes em álcool 70%, álcool 80%, álcool 95%, álcool 100% e 3 vezes em xilol por 1 hora). Finalmente,

os tecidos foram incluídos (56-58°C) e estocados em parafina. Foram feitas secções dos tecidos parafinados no plano transversal de 6 e 30 µm em micrótomo, fixados em lâminas de vidro polarizada (Superfrost® Plus). Para a realização da técnica de IF as secções foram desparafinadas através de 3 banhos em xilol por 5 minutos, re-hidratação em 2 banhos em álcool 100% e 1 vez em banhos sucessivos em etanol (95%, 80%, 70%, 50% e 30%) por 5 minutos. Em seguida foram lavados com água destilada e banhados em tampão citrato de sódio (10 mM) contendo "Tween 20" (0,05%), pH 6 para a recuperação do antígeno mascarado pela fixação em PFA e parafina.

4.4.2.3 Protocolo do ensaio de IF

Após o processamento das secções congeladas e parafinadas, as lâminas foram banhadas por 3 vezes em PBS (0,02 M pH 7,4) por 10 min para hidratação do tecido e a seguir, incubadas em câmara úmida à temperatura ambiente com PBS (0,02 M pH 7,4) contendo "Tween 20" (0,2%) e soro de burro (10%) durante 30 minutos. Esta etapa serve para bloquear as ligações não-específicas. Em seguida, as secções foram incubadas em câmara úmida à 4°C com o anticorpo primário produzido em coelho (anti-mouse-IgG2b, Rabbit, 1:50 ou 1:200, Abcam®, Reino Unido; e Invitrogen, EUA) por 20 horas. Após 20 horas de incubação, as secções foram lavadas 3 vezes durante 10 minutos em solução de PBS (0,02 M pH 7,4) e a seguir incubadas com anticorpo secundário Cy3 (Anti-rabbit, 1:300, Jackson ImmunoResearch Laboratories, EUA) por 2 horas em câmara úmida à temperatura ambiente. Após este período as secções foram lavadas 3 vezes durante 15 minutos em PBS (0,02 M pH 7,4) e montadas com Vectashield (DAPI, Vector Laboratories). Após a secagem das lâminas os tecidos foram analisados por microscopia confocal Zeiss LSM 880.

4.4.3 Análise das Imagens

Imagens fluorescentes dos cortes histológicos foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência BZ-9000 (BioRevo, Keyence, Japão) e microscópio confocal (Zeiss LSM 700 e 880, Alemanha), com filtros específicos de excitação e emissão para cada composto fluorescente utilizado. A captura de imagens quando dois ou três marcadores fluorescentes diferentes foi utilizado para avaliação de co-localização foi realizada ao mesmo tempo com espectros de emissão/ excitação diferenciada para não ocorrer sobreposição das ondas fluorescentes: Cy3 (excitação 550 e emissão 615), Alexa 488 (excitação 495 e emissão 519) e DAPI (excitação 420 emissão 480). A intensidade, o pinhole e o ganho dos lasers 543, 488 e 405 nm foram ajustados de maneira a permitir a visualização da marcação pela imunofluorescência, evitando a saturação da imagem. Os demais parâmetros foram adaptados para cada objetiva ou tecido específico, sendo utilizados sempre os mesmos parâmetros nas lâminas dos cortes controle.

Os módulos "tile scan" e "Z-stack" foram utilizados para algumas imagens. O módulo "tile scan" consiste no escaneamento contínuo controlado pelo software que soma as imagens, realizando uma captura contínua com movimentação automática do *stage*. Este procedimento permite que uma área maior (com áreas adjacentes a área de captura) possa ser escaneada ao mesmo tempo, fornecendo um panorama maior da imagem que está sendo visualizada no microscópio. O módulo "Z-stack" permite processamento digital que combina várias imagens capturadas em diferentes planos focais, resultando em uma imagem com maior profundidade de campo, a espessura de um único plano focal é menor que a da imagem formada com este módulo. Este procedimento permite também visualização 3D do tecido. As imagens deste estudo foram obtidas no Departamento de Advanced Light Microscopy (ALM), do Max-Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC-Berlin) na Alemanha e no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-UFMG) no Brasil.

4.5 Avaliação da expressão do mRNA por reação em cadeia da polimerase, qualitativa (RT-PCR) e semi-quantitativa ou em tempo real (qRT-PCR)

Para avaliar a expressão do mRNA da proteína de fusão em diferentes tecidos e regiões cerebrais foram utilizadas as técnicas de RT-PCR e qRT-PCR ou PCR em tempo real. Ratos SD e TGR(A1-7)7371 foram sacrificados por decapitação e as seguintes áreas cerebrais foram dissecadas e congeladas em nitrogênio líquido: NTS, RVLM, CVLM, PVN, SON, substância cinzenta periaquedutal (PAG), córtex, estriado e hipocampo. Além disso, átrios, ventrículo esquerdo, aorta, pulmão, fígado, rim, testículo e adrenal foram coletados e congelados em nitrogênio líquido.

4.5.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total dos tecidos foi realizada através da homogeneização em TRizol™ Reagent (Invitrogen, EUA) utilizando-se um homogeneizador automático e kit MK28-14R (Pacelllys, Homogenizer Bertin Instruments, France Beats precell lysis) na proporção de 1 ml para cada 50 - 100 mg de tecido, conforme especificação do fabricante. Foi adicionado a cada homogenato 0,2 ml de clorofórmio para cada 1 ml de TRizol, seguido de agitação e centrifugação a 12.000 rpm, 15 min, 4° C (Microcentrífuga 5417 C, Eppendorf). Das 3 fases resultantes, foi aspirado a fase aquosa que contém o RNA total da amostra, e transferida para um tubo eppendorf. O RNA foi então precipitado pela adição de 0,5 ml de álcool isopropílico para cada 1 ml de TRizol. As amostras foram centrifugadas à 12.000 rpm, por 10 min, à 4°C (Microcentrífuga 5417 C, Eppendorf) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75%, à 4°C para cada 1 ml de TRizol e centrifugado à 7.500 rpm, por 5 min, à 4°C. O RNA foi dissolvido em água tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPEC). A concentração e a pureza do RNA foi determinada no aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e a razão 260/280 das amostras foi igual ou superior a 1.8.

4.5.2 Tratamento do RNA total com DNase

As amostras de RNA total foram tratadas com a enzima, DNase I Amplification Grade (AMP-D1, Sigma, EUA) para eliminar a possibilidade de contaminação com DNA genômico. Para cada amostra constituída de 3µg de RNA foi realizada uma reação com os seguintes componentes: 1 µl de 10x Reaction Buffer, 1 µl de DNase I Amplification Grade e 3 µg de RNA em água DEPC completando um volume pré-estabelecido de 10 µl. Foi adicionado 1 µl de EDTA 50 mM (Stop solution) após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente com o objetivo de desativar a reação juntamente com o aquecimento 70° C por 10 minutos, seguido de 1 minuto em gelo. O produto dessa reação foi utilizado para a reação de retrotranscrição.

4.5.3 Transcrição Reversa (RT)

As amostras de RNA total tratado com DNase foram submetidas a reação de retrotranscrição a fim de gerar DNA complementar (cDNA) utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, EUA). Para cada amostra constituída de 2µg de RNA total tratado foi realizada uma reação com os seguintes componentes: 2 µl de 10x RT Buffer, 0,8 µl de 25x dNTP mix (100 mM), 2 µl de 10x RT Random Primers, 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 2 µg de RNA em água DEPEC completando um volume pré-estabelecido de 20 µl. Esta reação foi composta de três etapas, sendo a primeira realizada à 25°C com duração de 10 minutos, a segunda à 37°C com duração de 2 horas e a terceira à 85°C durante 5 minutos.

4.5.4 RT-PCR qualitativo

A RT-PCR foi realizada com 2µl da reação de RT em um volume final de 25 µl de reação contendo 7 µM dos óligos sense e antisense correspondente ao gene de interesse (GFAP/hRENEX, tabela 1) e 10 µl de GoTaq DNA polymerase (Promega). A reação de PCR foi realizada em quatro etapas, a saber: primeiro, 95° C durante 4 minutos; segundo, 25 ciclos de 30

segundos a 95° C, 30 segundos a 56° C (temperatura específica de cada óligo) e 1 minuto a 72° C; terceiro, 7 minutos 72° C e quarto, 4° C infinito. A localização dos óligos foi definida de modo que o produto da amplificação foi uma sequência característica e única. Para excluir a possibilidade de contaminação, foram realizados controles negativos e positivos, utilizando água e DNA genômico ao invés de cDNA. Além disso, foram utilizados testículo e cérebro de ratos TGR L3292 como controle. Após a reação de PCR 15 µl de cada amostra correspondente aos tecidos dos animais SD, TGR(A1-7)7371 e TGR(A1-7)3292 (controle) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%. Esse gel foi preparado com tampão de eletroforese TAE 1x acrescido de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, EUA). A leitura do gel foi realizada em aparelho Syngene Gene Genius (Go-Dove, EUA).

4.5.5 qRT-PCR ou RT-PCR em tempo real, semi-quantitativo

A fim de quantificar a expressão da proteína de fusão nos tecidos dos animais TGR(A1-7)7371 foi utilizado o PCR em tempo real. O cDNA obtido da etapa de RT (2nM) foi utilizado como fita molde para amplificação por PCR. As reações de PCR quantitativa tiveram um volume final de 5 µl e foram feitas em triplicatas, utilizando 2,5 µl do Master Mix de SYBR Green (QuantiNova Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,25 µl de cada primer (IG5/ hRENEX, tabela 1) na concentração de 500 nM, 0,025 µl de ROX, e 1,975 µl de cDNA em água RNase-free. O aparelho para reação foi o ViiA7 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) e o controle endógeno utilizado foi o S26 (Tabela 1). Para todos os genes avaliados foi realizada a curva de dissociação ("melting curve").

Tabela 1. Óligos utilizados na RT-PCR e qRT-PCR

	Sequência de nucleotídeos		Tamanho dos fragmentos (pb)
hGFAP	Sense	5'ACGCATCACCTCCGCTGCTCG3'	800
hRENEX	Antisense	5'GGACCAAGCCTGGCCATGTCC3'	
IG5	Sense	5'TTCCTTCTCATGCAACGTGA3'	108
hRENEX	Antisense	5'CTTCAGGCTTTCTCGGATTG3'	
S26	Sense	5'CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT3'	71
	Antisense	5'CGATTCCTGACAACCTTGCTATG3'	

4.6 Sequenciamento do promotor

Sequenciamos o promotor utilizado no transgene para nos certificarmos se era o GFAP humano. Para a realização do sequenciamento, segmentos de DNA genômico (cauda) e cDNA (cérebro) dos ratos TGR(A1-7)7371 foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR e RT-PCR) utilizando óligos sense e antisense correspondentes a diferentes genes de interesse, NSE/ IG5 (Enolase neurônio-específica) para identificar se o promotor era neuronal, hGFAP/ IG5 e hGFAP/ hRENEX (1 e 2) para identificar se o promotor era glial (Tabela 2). Após a reação de PCR, 20 µl de cada amostra correspondente aos tecidos dos TGR(A1-7)7371 foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%. Esse gel foi preparado com tampão de eletroforese TAE 1x acrescido de brometo de etídio. A leitura do gel foi realizada em aparelho Syngene Gene Genius (Go-Dove, EUA).

Após a verificação do produto de cada amostra em gel de agarose, as bandas de DNA (extraídas do gel) dos óligos hGFAP/ IG5 (cauda) e hGFAP/ hRENEX (1 - cauda) e uma alíquota (20 µl) de RT-PCR do óligo hGFAP/ hRENEX (cérebro - 2) foram purificadas em acetato de sódio (2 – 5 µl, 3M, pH 5,2) e etanol absoluto (50 – 150 µl) e armazenadas à – 20°C “overnight”. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas à 16.000 g, por 20 min., à 4°C, o

sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 100 µl de etanol 70%, procedendo uma nova centrifugação à 16.000 g, por 10 min., à 4°C. Após a remoção do sobrenadante, o precipitado foi seco, ressuspenso em 10 µl de água ultrapura livre de DNases e RNases e aquecido à 55° C por 10 minutos. Em seguida, foram feitas reações de sequenciamento das amostras pela Scientific Genomics Platforms, do MDC-Berlin, Alemanha, utilizando os primers senso e antissenso como padrão. Não foi realizado o sequenciamento da amostra utilizando os óligos IG5/ NSE, pois a utilização de um promotor neuronal nos ratos TGR(A1-7)7371 foi descartada em decorrência do número de bandas de DNA (*primer-dimers*) visíveis no gel de agarose (Anexo I).

Tabela 2. Óligos utilizados no sequenciamento

		Sequência de nucleotídeos	Tamanho dos fragmentos (pb)
IG5	Antisense	5'TTCCTTCTCATGCAACGTGA3'	~ 800
hGFAP	Sense	5'CCCACTCCTTCATAAAGCCC3'	
IG5	Antisense	5'TTCCTTCTCATGCAACGTGA3'	-
NSE	Sense	5'CAGTGTCTGATTGCAGCCTG3'	
hRENEX	Antisense	5'GGACCAAGCCTGGCCATGTCC3'	~ 800
hGFAP (1)	Sense	5'CCCACTCCTTCATAAAGCCC3'	
hRENEX	Antisense	5'GGACCAAGCCTGGCCATGTCC3'	800
hGFAP (2)	Sense	5'ACGCATCACCTCCGCTGCTCG3'	

4.7 Análise Estatística

Comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste t de Student não pareado. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. Todos os valores foram expressos como médias \pm erro padrão da média (EPM).

V RESULTADOS

5.1 Determinação de parâmetros hemodinâmicos

Inicialmente avaliamos o fluxo sanguíneo e a resistência vascular em diferentes territórios e parâmetros hemodinâmicos, tais como a PAM, FC, DC e RPT, com o objetivo de entender a menor pressão arterial basal dos [TGR(A1-7)7371] em comparação aos ratos SD.

A Tabela 3 e Figura 3 apresentam os valores de fluxo sanguíneo e resistência regional em diferentes órgãos avaliados em ratos SD e TGR anestesiados com uretana. O fluxo sanguíneo nos rins, músculo, ventrículo esquerdo, mesentério, tecido adiposo marrom e pele apresentaram-se elevados nos ratos TGR quando comparados aos valores do grupo controle, SD. Não houve diferença estatisticamente significativa no fluxo sanguíneo nos testículos, cérebro, pulmão, baço, tecido adiposo branco epididimal e adrenal entre os grupos, TGR e SD.

A Figura 4 mostra os valores médios da RPT ($\text{mmHg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min} \cdot 100\text{g}$), IC ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$), DC (ml/min) e volume sistólico (ml) dos ratos SD e TGR. Os TGRs apresentaram RPT ($2,28 \pm 0,2 \text{ mmHg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min} \cdot 100\text{g}$) cerca de 40% menor do que a observada nos ratos SD ($3,75 \pm 0,5 \text{ mmHg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min} \cdot 100\text{g}$), acompanhado por IC cerca de 30% maior ($42,0 \pm 4,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$ vs $29,1 \pm 2,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$, nos ratos SD). Não houve diferença significativa do DC e do volume sistólico entre os ratos TGR e SD (Figura 4). A PAM dos TGR ($89 \pm 4 \text{ mmHg}$; Figura 5) foi significativamente menor do que a dos ratos SD ($102 \pm 2 \text{ mmHg}$; Figura 5), similar ao observado anteriormente com outros métodos utilizados em ratos não anestesiados. A FC foi semelhante nos dois grupos (TGR e SD; Figura 5). Em conjunto estes resultados mostraram que a menor PAM de ratos TGR, que superexpressam Ang-(1-7) no cérebro, é decorrente de redução da RPT, que por sua vez, foi determinada por vasodilatação em diferentes territórios.

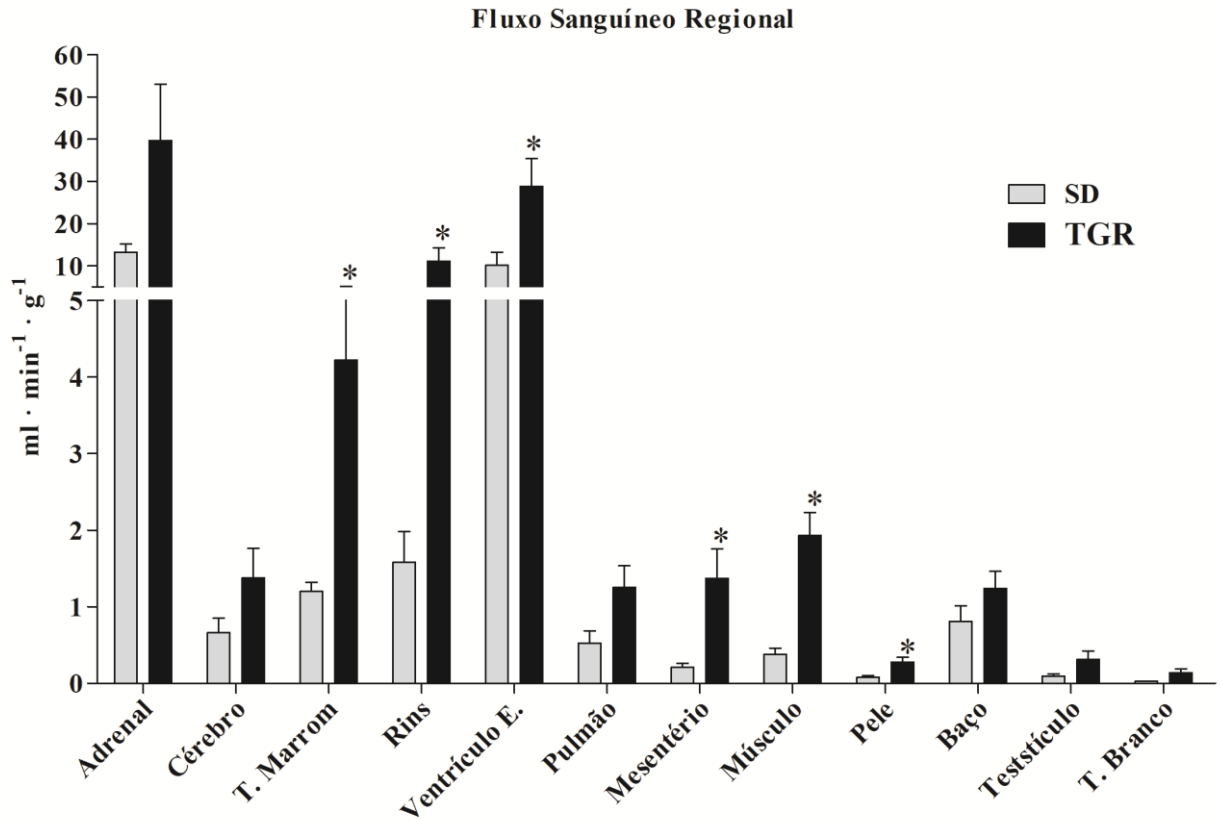


Figure 3. Fluxo Sanguíneo Regional.

Valores de fluxo sanguíneo regional ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) em diferentes órgãos obtidos com a técnica de medida de fluxo com microesferas de poliestireno fluorescentes em ratos SD (6-8) e TGR (n=7-8) anestesiados com uretana. Dados expressos como média \pm EPM; * $p < 0,05$ em comparação aos ratos SD (Student t test).

Table 3. Valores de fluxo sanguíneo e resistência vascular regionais em ratos SD e TGR

Territórios	Fluxo Sanguíneo (ml · min ⁻¹ · g ⁻¹)		Resistência Vascular (mmHg · ml ⁻¹ · min · g)	
	SD	TGR	SD	TGR
Adrenal	13,3 ± 1,94	39,7 ± 13,3	8,8 ± 1,7	3,9 ± 1,1*
Cérebro	0,61 ± 0,19	1,34 ± 0,39	267 ± 63	119 ± 33
Tec. Adip. Marrom	1,20 ± 0,12	4,22 ± 0,86*	90 ± 12	31 ± 8*
Rins	1,58 ± 0,40	11,1 ± 3,08*	92 ± 22	13 ± 3*
Ventrículo Esq.	10,2 ± 3,10	28,8 ± 6,5*	17 ± 4	4,6 ± 1,3*
Pulmão	0,53 ± 0,16	1,25 ± 0,28	369 ± 149	113 ± 36
Mesentério	0,21 ± 0,05	1,37 ± 0,39*	777 ± 242	118 ± 39*
Músculo	0,38 ± 0,08	1,93 ± 0,30*	350 ± 104	52 ± 8*
Pele	0,08 ± 0,02	0,28 ± 0,06*	2547 ± 929	386 ± 67*
Baço	0,81 ± 0,22	1,24 ± 0,22	168 ± 37	124 ± 49
Testículos	0,10 ± 0,03	0,31 ± 0,11	1561 ± 367	721 ± 180
Tec. Adip. Branco	0,03 ± 0,01	0,14 ± 0,05	4622 ± 869	1865 ± 653*

SD- ratos Sprague-Dawley (n=6-8); TGR- ratos transgênicos (n=7-8). Dados expressos como média ± EPM; *p< 0,05 em comparação ao grupo SD (Student t test).

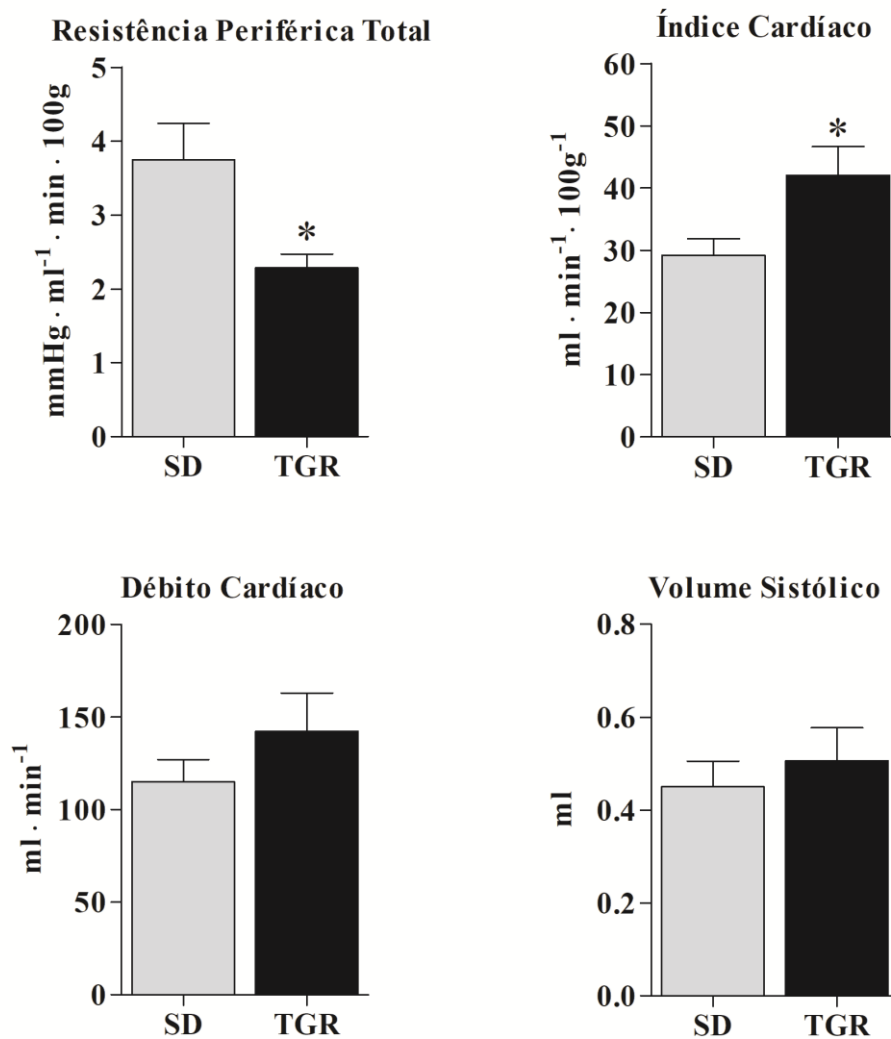


Figure 4. Parâmetros hemodinâmicos determinados por microesferas fluorescentes.

Valores de resistência periférica total (mmHg · ml⁻¹ · min · 100g), índice cardíaco (ml · min⁻¹ · 100g⁻¹), débito cardíaco (ml · min⁻¹) e volume sistólico (ml) calculados através da técnica de medida de fluxo regional com esferas fluorescentes em ratos SD (n=8) e TGR (n=7) anestesiados com uretana. Dados expressos como média ± EPM; *p<0,05 em comparação aos ratos SD (Student t test).

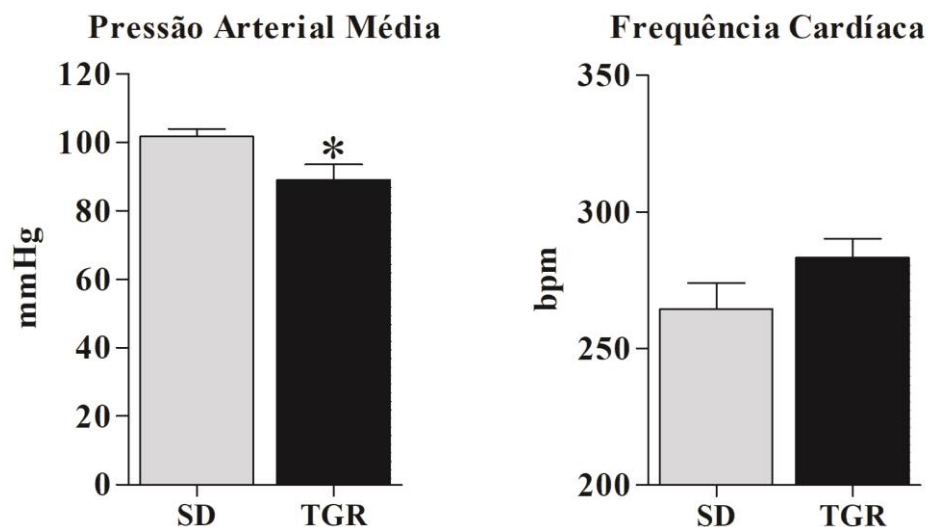


Figure 5. Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca.

Valores de pressão arterial média (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) de ratos SD (n=7) e TGR (n=7) anestesiados com uretana. Dados expressos como média \pm EPM; *p<0,05 em comparação aos ratos SD (Student t test).

5.2 Nível plasmático do peptídeo natriurético atrial (ANP)

A próxima etapa do nosso trabalho foi avaliar a possibilidade dos animais TGR apresentarem níveis elevados de ANP, uma vez que este peptídeo causa natriurese e vasodilatação, efeitos que poderiam explicar os achados anteriores nos ratos [TGR(A1-7)7371] (Alves, 2014; Dissertação de Mestrado). Nossos dados confirmaram esta hipótese, mostrando que os ratos TGR apresentaram níveis plasmáticos de ANP significativamente maiores (231 ± 44 pg/ml; Figura 6) do que os animais SD (135 ± 20 pg/ml in SD; Figura 6).

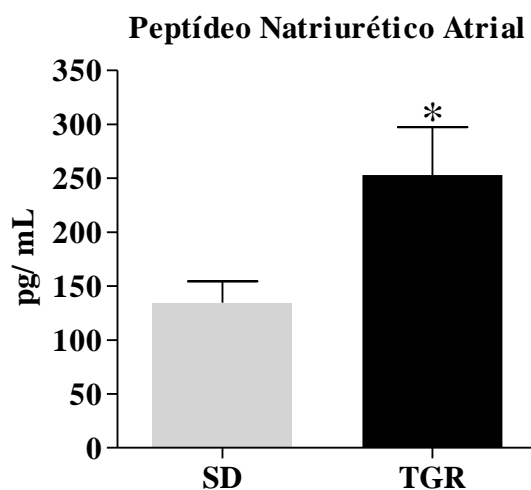


Figure 6. Níveis plasmáticos do Peptídeo Natriurético Atrial.

Níveis plasmáticos do peptídeo natriurético atrial (ANP, pg/ ml) em ratos SD (n=7) e TGR (n=6). Dados expressos como média \pm EPM; * $p < 0,05$ em comparação ao SD (Student t test).

Estes dados reforçaram a necessidade de avaliar se a expressão da proteína de fusão seria difusa ou restrita a determinadas áreas do SNC. Além de caracterizar o modelo de animal transgênico, esta avaliação poderia contribuir para o entendimento das alterações cardiovasculares e hemodinâmicas apresentadas pelos ratos TGR no estado basal. Desta forma, na segunda e terceira etapa deste estudo avaliamos, por imunofluorescência, RT-PCR e qRT-PCR, a presença da proteína de fusão e do transgene em diferentes áreas do cérebro e tecidos periféricos de ratos TGR(A1-7)7371, com foco nas regiões do bulbo e hipotálamo.

5.3 Verificação da marcação imunofluorescente da proteína de fusão com o anticorpo anti-IgG2b de camundongo

Inicialmente escolhemos a porção do IgG2b como marcador da proteína de fusão, uma vez que esta parte é de camundongo e confere sustentação para a proteína. Para avaliar a marcação do anticorpo anti-IgG2b de camundongo, foi utilizado como controle positivo o testículo de ratos [TGR(A1-7)3292] que expressam a mesma proteína de fusão contendo a

sequência de Ang-(1-7) sob regulação do promotor citomegalovírus (CMV). Neste animal, já bastante estudado em nosso laboratório (Botelho-Santos e cols., 2007; Santiago e cols., 2010; Kangussu e cols., 2017; Santos e cols., 2017), a expressão da proteína está restrita aos testículos (Santos e cols., 2004). Como controle negativo, foi utilizado testículo de ratos SD. Como pode ser observado na Figura 7, sinal positivo para a proteína de fusão (em vermelho) foi observado apenas no testículo do [TGR(A1-7)3292], mostrando que o anticorpo utilizado em nosso estudo reconhece com “seletividade” a proteína de fusão. Na figura 7, em Azul está a marcação dos núcleos das células com DAPI, uma molécula fluorescente que se liga fortemente ao DNA. Como controle positivo e negativo também foram utilizadas secções do cérebro dos ratos TGR(A1-7)7371, incubadas com os anticorpos primário (Anti-IgG2b) e secundário (Cy3) ou somente com anticorpo secundário para avaliar autofluorescência (Fig. 8).

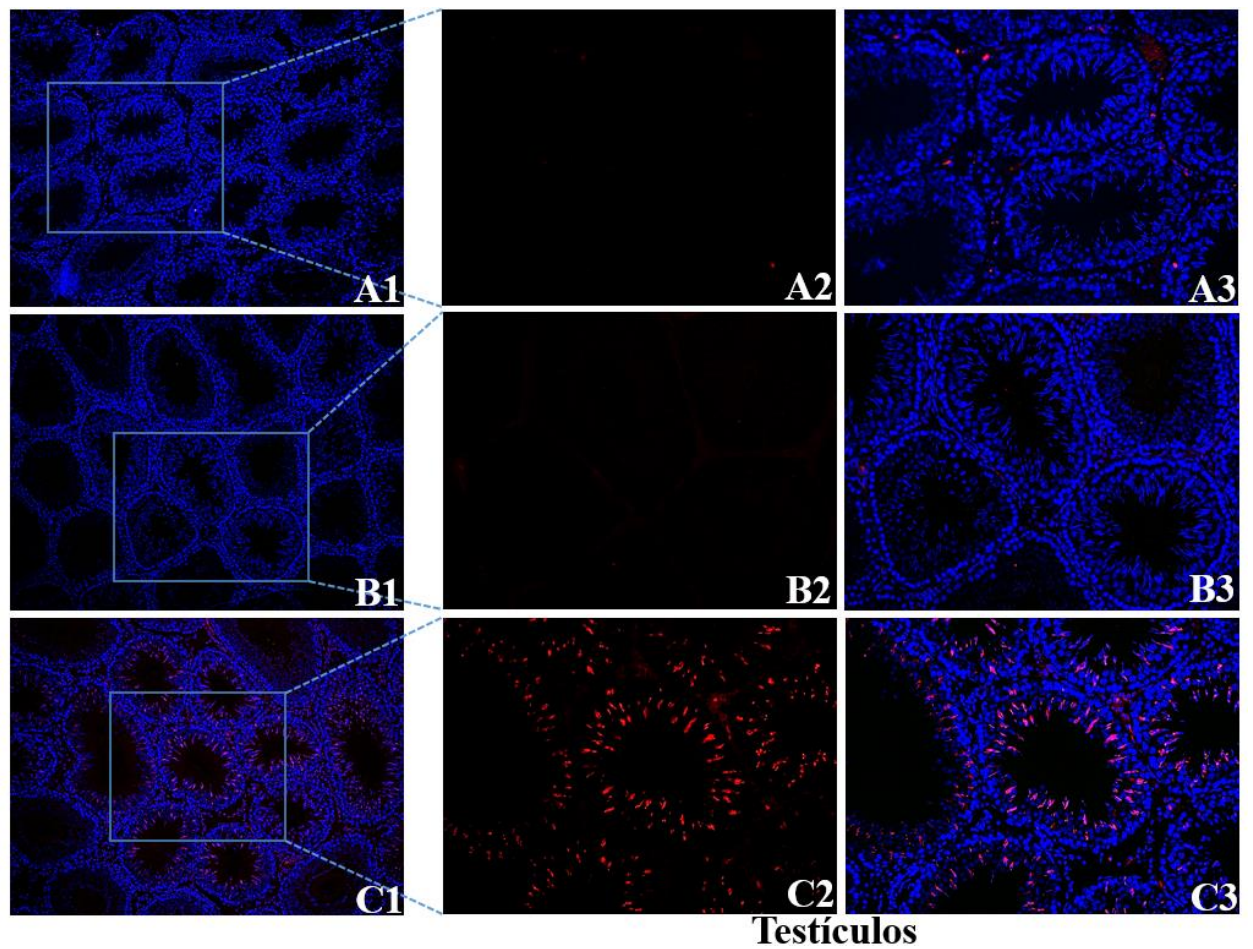


Figura 7. Marcação imunofluorescente da proteína de fusão com o anticorpo anti-IgG2b de camundongo em testículo.

Imagens representativas de cortes (50 μm) do testículo de rato TGR(A1-7)7371 (A1; visão ampliada à direita em A2 e A3), rato SD (B1; visão ampliada à direita em B2 e B3) e rato TGR(A1-7)3292 (C1; visão ampliada à direita em C2 e C3) mostrando a marcação da proteína de fusão com o anticorpo anti-IgG2b de camundongo. Em vermelho marcação positiva para a proteína de fusão (IgG2b/Cy3 1:300) e em azul, marcação para os núcleos com DAPI. Imagens obtidas no microscópio de fluorescência BZ-9000 (2x e 10x, BioRevo Keyence, Japão).

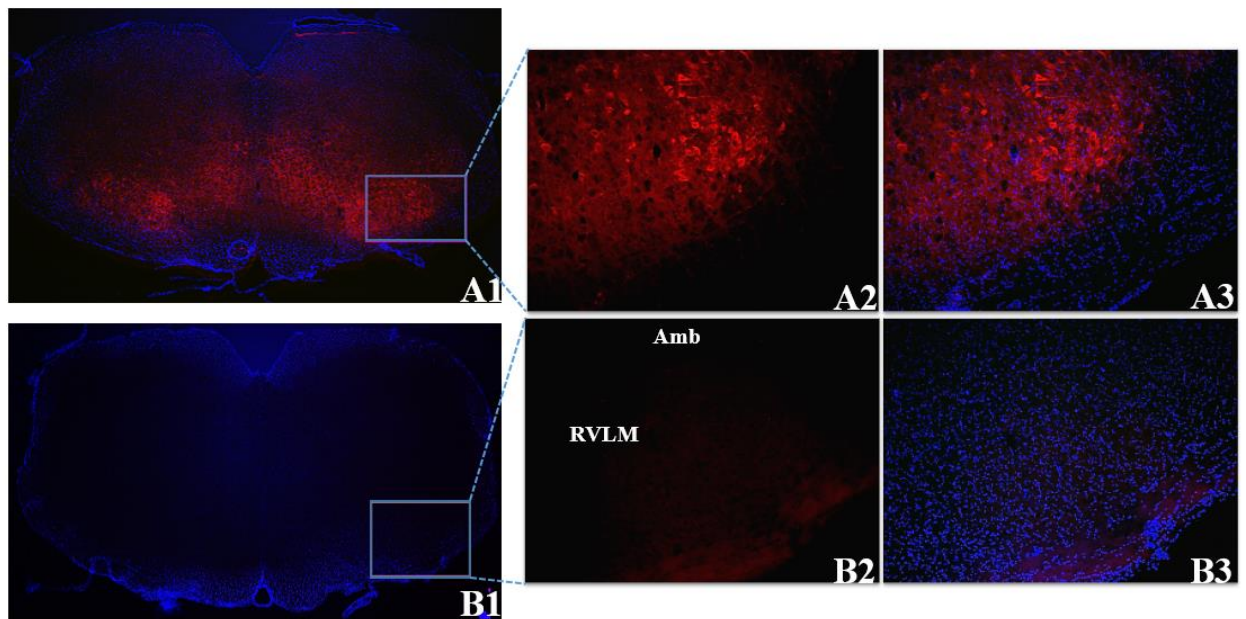


Figura 8. Controle da marcação da proteína de fusão no cérebro.

Imagens representativas ao nível do núcleo ambíguo (Amb) e área rostroventolateral do bulbo (RVLM) de rato TGR(A1-7)7371 ilustrando autofluorescência em cortes do cérebro que foram incubados apenas com o anticorpo secundário (Cy3), ou seja, sem prévia incubação com o anticorpo primário. Em A1, células positivas para proteína de fusão (visão ampliada à direita em A2 e A3) e em B1, células negativas, incubadas apenas com anticorpo secundário sem anticorpo primário (visão ampliada à direita; B2 e B3). A imunorreatividade para proteína de fusão (anti-IgG2b/Cy3 1:300) está em vermelho e o marcador nuclear, DAPI, está em azul. Imagens obtidas com o microscópio de fluorescência BZ-9000 (BioRevo Keyence, Japão). Espessura do corte-40 μ m, objetivas 2x (A1 e B1) e 10x (A2, A3, B2 e B3).

5.4 Avaliação da presença da proteína de fusão em Astrócitos e/ou Neurônios

Com o objetivo de avaliar em que tipo celular, astrócitos e/ou neurônios, a proteína de fusão estava presente, foi realizado ensaio de imunofluorescência em cortes do bulbo e prosencéfalo com dupla marcação com anticorpo anti-Tuj1 ou anticorpo anti-GFAP e o anticorpo para a proteína de fusão (anti-IgG2b). O anticorpo anti-Tuj1 reconhece seletivamente a proteína β -tubulina III que contribui para a estabilidade de microtúbulos em corpos de células neuronais e axônios. Para a identificação de astrócitos foi utilizado o anticorpo anti-GFAP (Proteína ácida fibrilar glial), subunidade dos filamentos intermediários do citoesqueleto celular em células gliais. As Figuras 9 e 10 representam a marcação obtida em células da RVLM e hipocampo para neurônios (anti-Tju1) e para astrócitos nas mesmas áreas nos ratos [TGR(A1-

7)7371], ilustrando o padrão de marcação que foi obtido em todas as áreas do bulbo e prosencefálicas estudadas. Surpreendentemente, observamos que a proteína de fusão está presente preferencialmente em neurônios, uma vez que, não foi observado imuno-colocalização entre células que expressão a proteína de fusão nos astrócitos (Figuras 9 B3 e 10 B3). Como pode ser observado nas Figuras 9 e 10 a coloração dupla (laranja-amarelado) para IgG2b (vermelho) e Tuj1 (verde) com DAPI (azul) indicou que a imunorreatividade para a proteína de fusão está co-localizada principalmente com o marcador neuronal. Corroborando esses resultados e, de maneira clara e evidente, a morfologia das células que expressam a proteína de fusão são semelhantes à morfologia neuronal. Desta forma, estudos futuros utilizando marcadores seletivos para determinados neurônios serão necessários para identificar os tipos neuronais específicos (interneurônios, etc) que expressam a proteína de fusão, visto que alguns neurônios no mesmo campo não apresentaram dupla marcação.

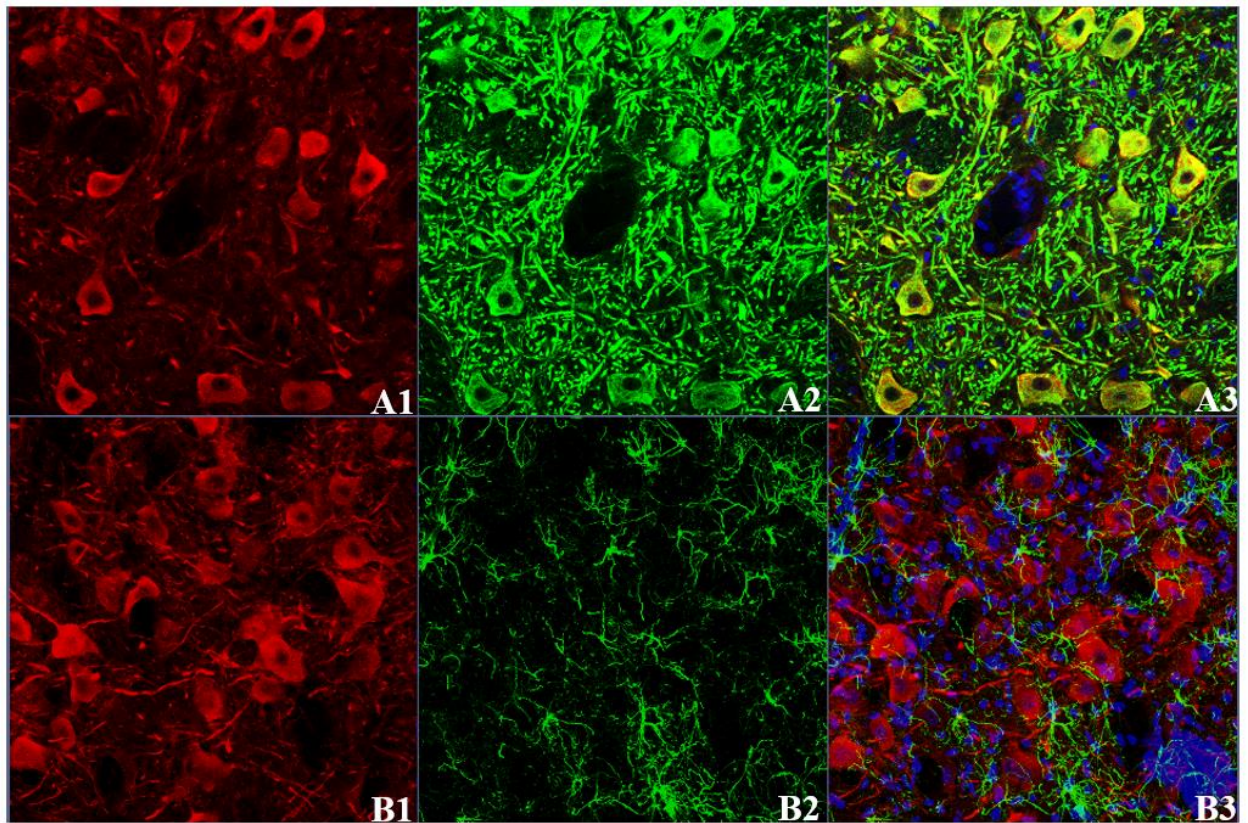


Figura 9. Marcação imunofluorescente da proteína de fusão em neurônios e astrócitos da RVLM.

Colocalização da marcação para a proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) e neurônios e astrócitos da RVLM. O marcador da proteína de fusão, anti-IgG2b, é mostrado em vermelho (A1 e B1), os marcadores neuronal e de astrócito (anti-Tuj1 e anti-GFAP; respectivamente) são mostrados em verde (A2 e B2), e o marcador nuclear, DAPI, em azul (A3 e B3). As imagens A3 e B3 representam a sobreposição. As imagens representam 26 capturas sobrepostas (Z-Stack) com ampliação 20x por microscopia confocal Zeiss 700 (Zeiss, Alemanha).

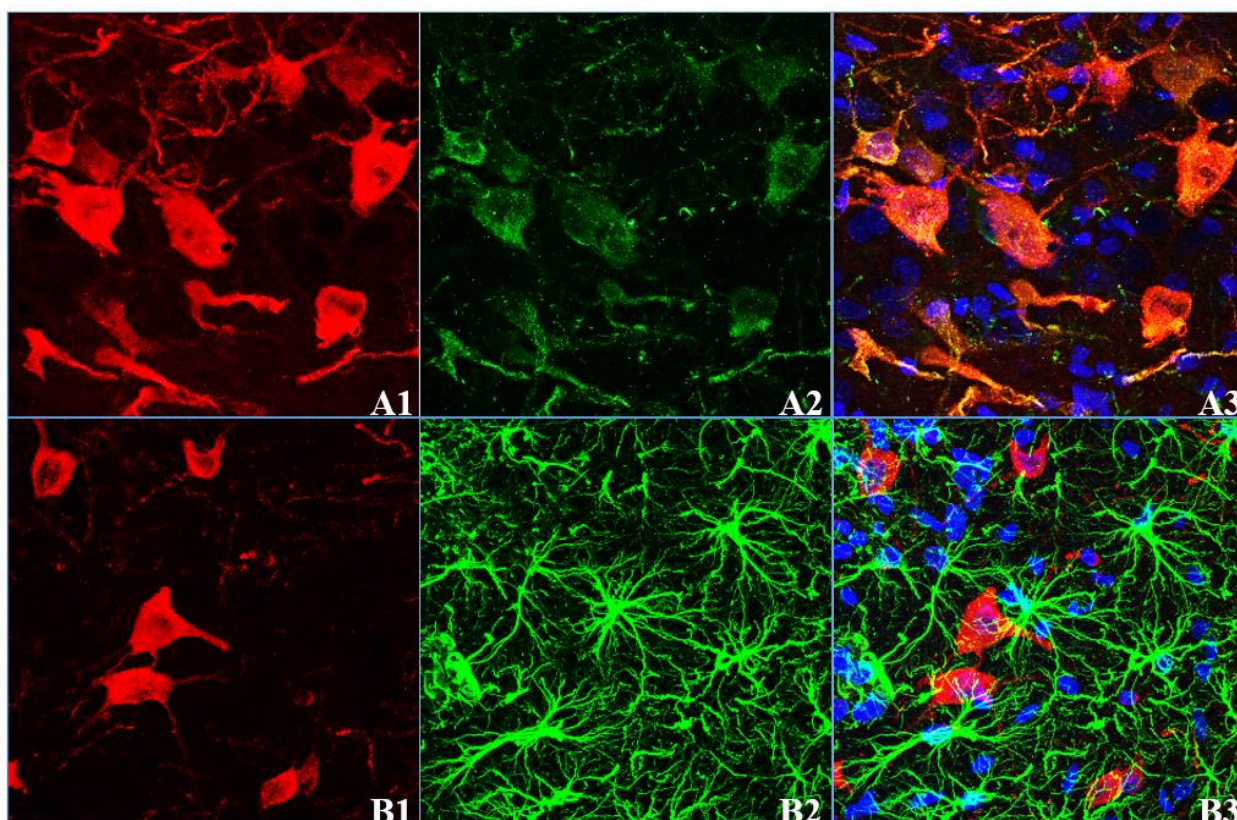


Figura 10. Marcação imunofluorescente da proteína de fusão em neurônios e astrócitos do hipocampo.

Colocalização da marcação da proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) em neurônios ou astrócitos do hipocampo. O marcador da proteína de fusão, anti-IgG2b, é mostrado em vermelho (A1 e B1), os marcadores neuronal e de astrócito (anti-Tuj1 e anti-GFAP; respectivamente) são mostrados em verde (A2 e B2), e o marcador nuclear, DAPI, em azul (A3 e B3). As imagens A3 e B3 representam a sobreposição. As imagens representam 20 capturas sobrepostas (Z-Stack) com ampliação 40x por microscopia confocal Zeiss 880 (Zeiss, Alemanha).

5.5 Análise e Sequenciamento do promotor

Devido a imuno-colocalização preferencialmente em neurônios para proteína de fusão, nós decidimos avaliar e sequenciar o promotor e algumas regiões do transgene. Primeiramente, o promotor foi avaliado através da amplificação de segmentos de DNA genômico dos ratos [TGR(A1-7)7371] por PCR, utilizando óligos sense e antisense para o promotor neuronal humano, NSE, e para o promotor glial humano, GFAP. A utilização do promotor NSE nos ratos [TGR(A1-7)7371] foi descartada após várias reações, devido a presença de fragmentos inespecíficos de DNA nos géis representativos (Anexo I). A utilização do promotor GFAP nos

ratos [TGR(A1-7)7371] foi confirmada após a verificação do produto de cada amostra em gel de agarose, com a presença de bandas de DNA (Anexo II e III) e cDNA (Anexo IV) específicas, e através do sequenciamento dos fragmentos de DNA presentes nos géis representativos e na amostra de cDNA (Anexo II-IV).

5.6 Análise da expressão do transgene determinado por RT-PCR e qRT-PCR

Na terceira etapa deste estudo avaliamos e quantificamos a expressão do transgene no cérebro e em outros tecidos, uma vez que, a proteína de fusão mostrou imuno-colocalização em neurônios e, desta forma, poderia ser expressa no tecido nervoso periférico.

Primeiramente avaliamos a expressão do mRNA do transgene através do par de primers ou óligos para a sequência hGFAP/ hRENEX (fragmento de 800 pb) em diferentes tecidos de TGR e SD utilizando a técnica de RT-PCR. Foram utilizados como controle positivo, cDNA de testículo e cérebro de rato TGR(A1-7)3292 que expressa a mesma proteína de fusão sob regulação do promotor CMV e para excluir a possibilidade de contaminação, foram realizados controles negativo e positivo, utilizando água e DNA genômico de TGR(A1-7)7371 em substituição ao cDNA. Como pode ser observado nos géis representativos da Figura 11, mRNA do transgene foi obtido não apenas do cérebro dos animais TGR(A1-7)7371, como também em todos os tecidos testados. Deve-se ser ressaltado que as bandas que identificaram o mRNA nos tecidos periféricos tiveram intensidade aparentemente menor que a do cérebro. Como esperado, não houve expressão de mRNA do transgene obtido através do par de primers para a sequência hGFAP/ hRENEX nos ratos SD e TGR(A1-7)3292 (Figura 11). Além disso, a localização de banda na posição correta para o cDNA nos ratos TGR(A1-7)7371 descarta possível contaminação por DNA genômico (DNAgen na Figura 11). Adicionalmente, a expressão do transgene nos ratos TGR(A1-7)7371 confirma a utilização do promotor GFAP (humano).



Figura 11. Imagens de géis representativos da expressão do mRNA do transgene por RT-PCR.

Imagem de géis mostrando o fragmento de $\cong 800$ bp obtido por RT-PCR utilizando par de primers para a sequência hRENEX/GFAP do transgene a partir do RNA total de diferentes tecidos de animais SD, TGR(A1-7)7371 e TGR(A1-7)3292.

A quantificação do mRNA para a proteína de fusão em áreas específicas do cérebro e de tecidos periféricos de ratos TGR(A1-7)7371 foi avaliada por PCR em tempo real (qRT-PCR) utilizando par de primers para a sequência IG5/ hRENEX do transgene (fragmento de 108 pb). De forma surpreendente, observamos maior expressão mRNA para o gene da proteína de fusão na aorta (109 ± 10 u.a.; Figura 12), seguindo de áreas bulbares relacionadas com o controle cardiovascular como, RVL, CVL e NTS, e outras áreas cerebrais em regiões prosencefálicas (hipocampo, PAG, PVN, estriado e córtex). De forma geral, a maior expressão do mRNA foi observado no cérebro, com exceção apenas do SON. Em intensidade menor observou-se expressão do mRNA do transgene da proteína de fusão nos outros tecidos (pulmão, átrio, rim, ventrículo esquerdo, fígado, testículo e adrenal; Figura 12).

PCR em Tempo Real

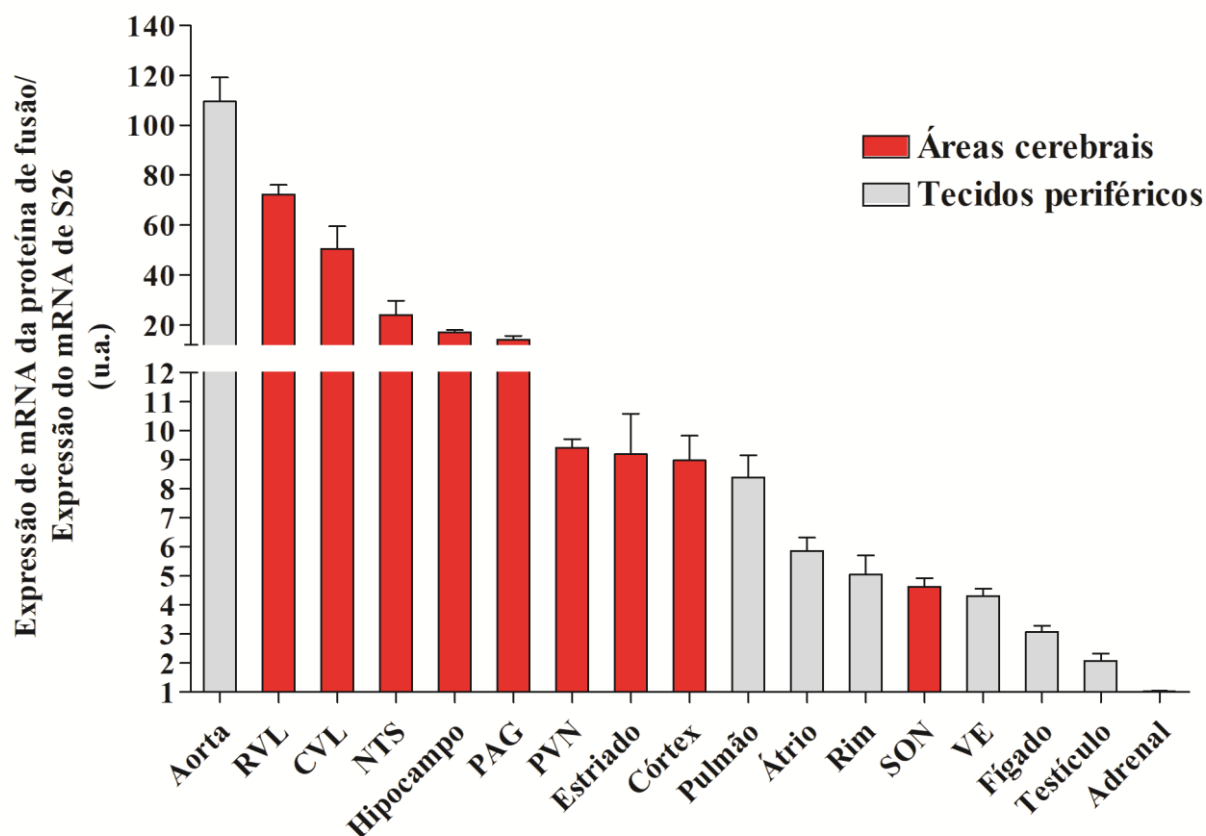


Figura 12. Quantificação da expressão do mRNA para proteína de fusão por qRT-PCR.

Valores arbitrários obtidos por qRT-PCR em amostras RNA total de áreas cerebrais e tecidos periféricos de ratos TGR(A1-7)7371 (n=3-5). RVL – área rostral ventrolateral do bulbo, CVL – área caudal ventrolateral do bulbo, NTS – núcleo do trato solitário, PAG – substância cinzenta periaquedutal, PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo, SON – núcleo supra-óptico e VE – ventrículo esquerdo.

5.7 Avaliação da presença da proteína de fusão em tecidos periféricos por IF

Com os resultados obtidos por PCR que mostraram a expressão do mRNA do transgene em diferentes tecidos, a seguir avaliamos a expressão da proteína de fusão por IF. Escolhemos para esta análise a aorta, o coração e o pulmão de ratos TGR e SD (grupo controle) e utilizamos como controle positivo, a marcação em duas áreas bulbares (o Amb e a RVLM) e testículo de ratos TGR(A1-7)3292. A Figura 13 ilustra a marcação imunofluorescente obtida para proteína de fusão no testículo de rato TGR(A1-7)3292 e no cérebro de rato TGR(A1-7)7371. De forma interessante não foi observado imunorreatividade para proteína de fusão na aorta (Figura 14), coração (Figura 15) e pulmão (Figura 16) de ratos TGR(A1-7)7371, o resultado foi semelhante

ao grupo controle SD. Vale ressaltar que no testículo de ratos TGR(A1-7)7371 a imunorreatividade para proteína de fusão também foi negativa (Item 5.3, Figura 7). Apesar do PCR, a proteína de fusão não foi identificada por imunofluorescência nos tecidos periféricos avaliados dos ratos TGR(A1-7)7371.

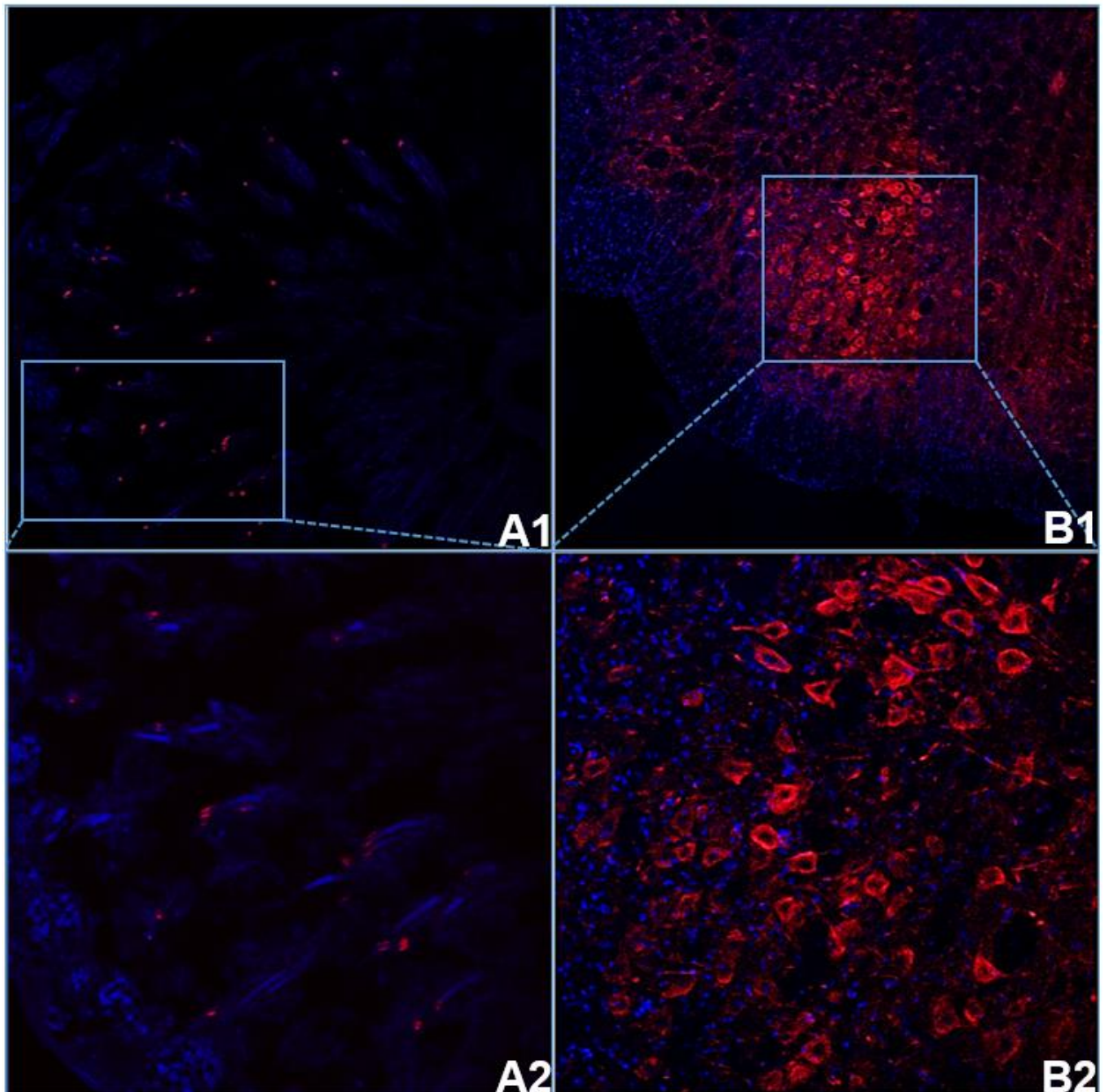


Figura 13. Marcação imunofluorescente da proteína de fusão no testículo e cérebro.

Imagens representativas mostrando a marcação imunofluorescente da proteína de fusão com o anticorpo anti-IgG2b de camundongo no testículo de rato transgênico [TGR(A1-7)3292; A1-A2] e no cérebro de TGR [TGR(A1-7)7371; B1-B2]. As imagens (A2-B2) foram obtidas da área delimitada pelo retângulo desenhado nos cortes A1 e B2. Em vermelho marcação positiva para a proteína de fusão (IgG2b/Cy3 1:300) e em azul, marcação dos núcleos com DAPI. Imagens obtidas com o microscópio Confocal Zeiss 880 (Zeiss, Alemanha). Espessura do corte- 50µm, objetivas 63x (A1 – tile scan e A2) e 20x (B1 – tile scan e B2).

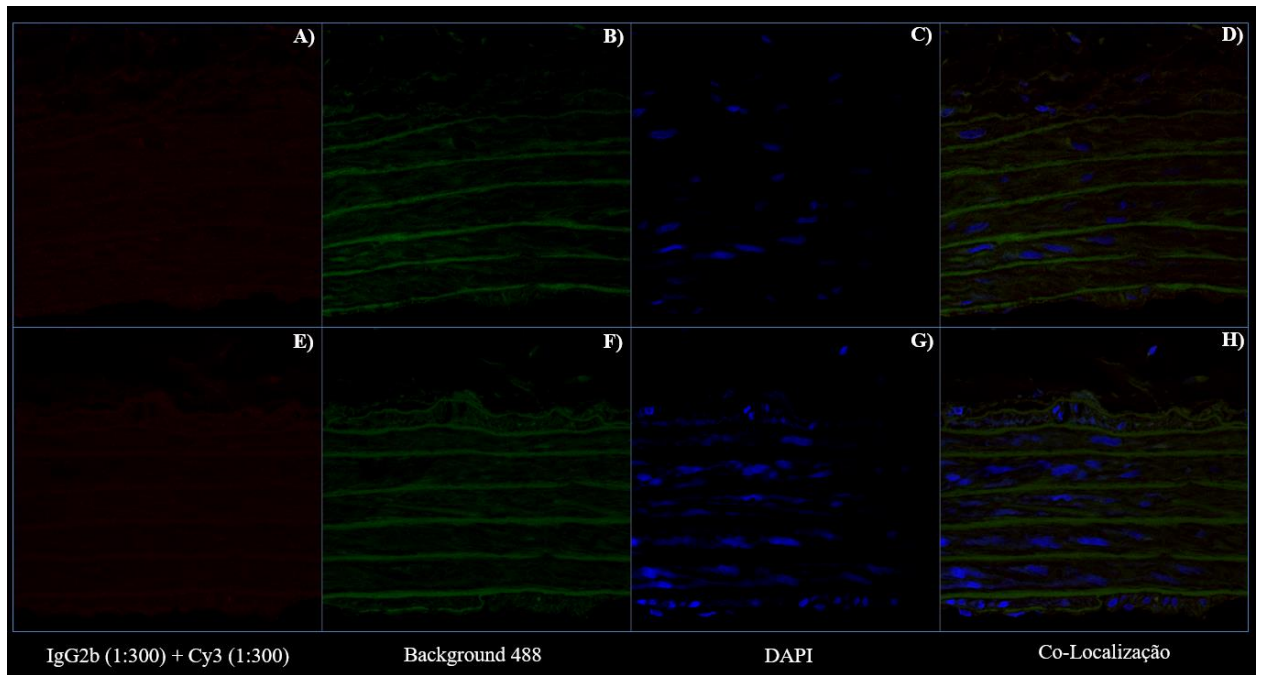


Figura 14. Marcação imunofluorescente da proteína de fusão em aorta.

As imagens representativas ilustram a ausência de marcação imunofluorescente da proteína de fusão na aorta de rato TGR [TGR(A1-7)7371; A-D] e rato SD (Grupo controle; E-H) com o anticorpo anti-IgG2b de camundongo. Em vermelho (IgG2b/Cy3 1:300) imunonegatividade para proteína de fusão em ratos TGR (A) e SD (E). Em verde, autofluorescência do tecido (background 488, B e F). Em azul, marcação dos núcleos com DAPI (C e G). Co-localização (D e H). Imagens obtidas com o microscópio Confocal Zeiss 880 (Zeiss, Alemanha). Espessura do corte- 6 μ m, objetivas 40x (A-H).

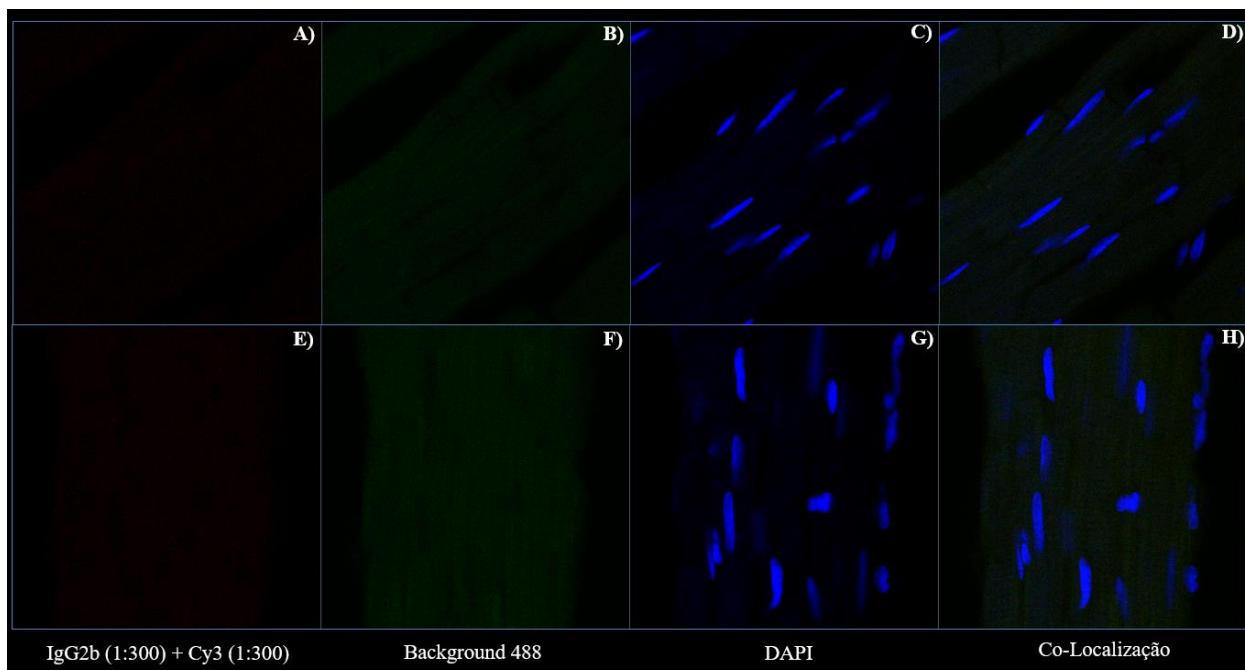


Figura 15. Marcação imunofluorescente da proteína de fusão no coração.

As imagens representativas ilustram a ausência de marcação imunofluorescente da proteína de fusão no coração de rato TGR [TGR(A1-7)7371; A-D] e rato SD (Grupo controle; E-H) com o anticorpo anti-IgG2b de camundongo. Em vermelho (IgG2b/Cy3 1:300) imunonegatividade para proteína de fusão em ratos TGR (A) e SD (E). Em verde, autofluorescência do tecido (background 488, B e F). Em azul, marcação dos núcleos com DAPI (C e G). Co-localização (D e H). Imagens obtidas com o microscópio Confocal Zeiss 880 (Zeiss, Alemanha). Espessura do corte- 30 μ m, objetivas 63x (A-H).

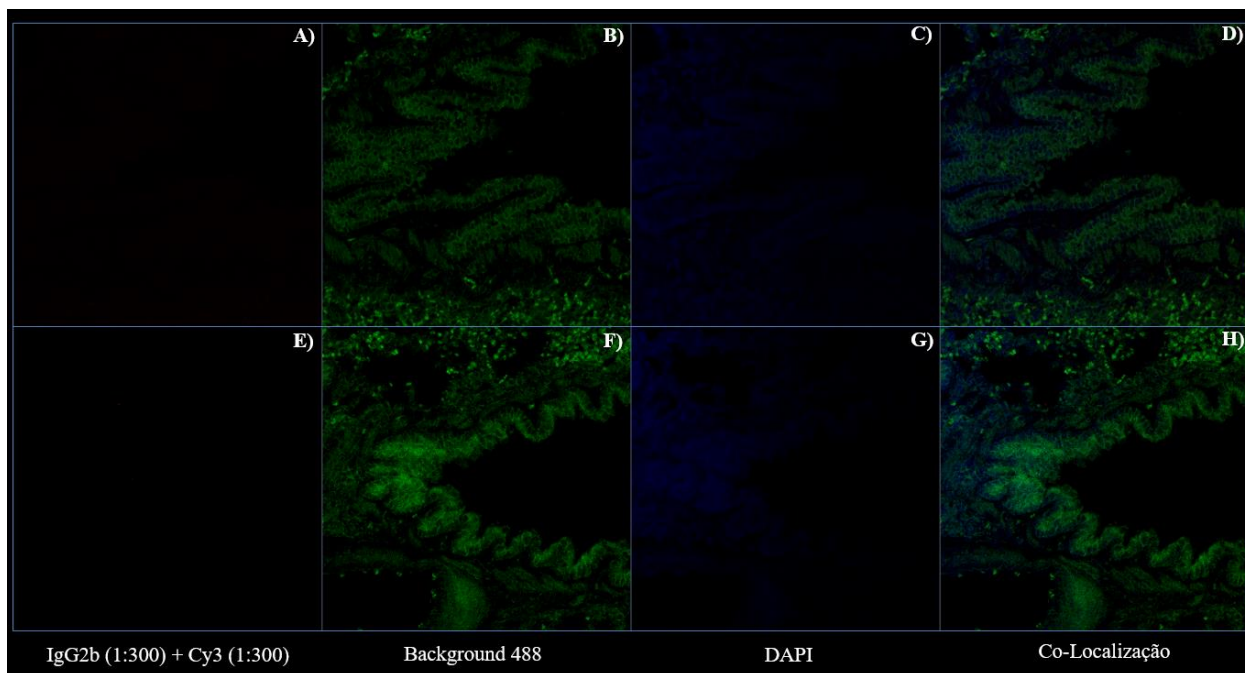


Figura 16. Marcação imunofluorescente da proteína de fusão no pulmão.

As imagens representativas ilustram a ausência de marcação imunofluorescente da proteína de fusão no pulmão de rato TGR [TGR(A1-7)7371; A-D] e rato SD (Grupo controle; E-H) com o anticorpo anti-IgG2b de camundongo. Em vermelho (IgG2b/Cy3 1:300) imunonegatividade para proteína de fusão em ratos TGR (A) e SD (E). Em verde, autofluorescência do tecido (background 488, B e F). Em azul, marcação dos núcleos com DAPI (C e G). Co-localização (D e H). Imagens obtidas com o microscópio Confocal Zeiss 880 (Zeiss, Alemanha). Espessura do corte- 6µm, objetivas 20x (A-H).

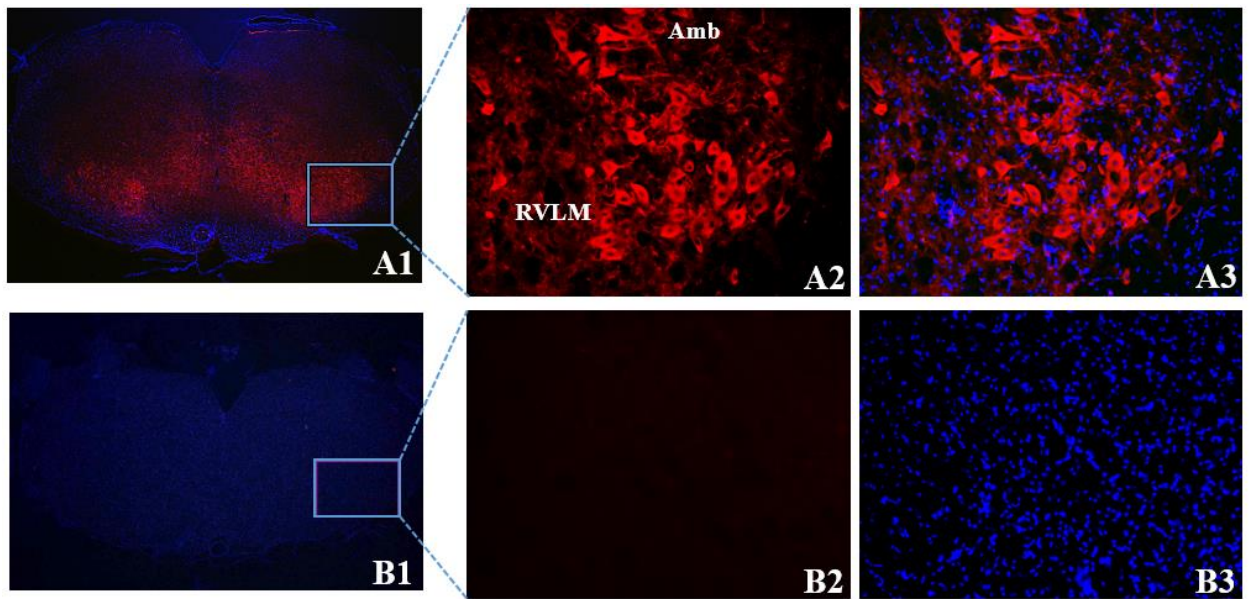
5.8 Expressão da proteína de fusão em áreas cerebrais envolvidas com o controle cardiovascular da pressão arterial

Na última etapa do nosso estudo, a imunofluorescência para proteína de fusão foi observada principalmente em diferentes áreas relacionadas com o controle cardiovascular e equilíbrio hidroeletrolítico. Além disso, foi observado marcação em outras áreas onde as ações da Ang-(1-7), são importantes na modulação de funções cognitivas, comportamental e sistema límbico. Embora alguma marcação tenha sido observada em outras regiões do cérebro, esse estudo se restringiu, primeiramente, em avaliar a marcação para a proteína de fusão no bulbo e hipotálamo. No bulbo, os cortes se iniciaram no nível mais rostral da área rostral ventrolateral do bulbo (RVLM), abrangendo o núcleo do trato solitário (NTS) e se estenderam até a região

mais caudal ventrolateral do bulbo (CVLM). No prosencéfalo, os cortes incluíram o hipotálamo, tálamo, córtex, hipocampo, amígdala e corpo estriado. De maneira geral, independentemente da área avaliada, a marcação ficou restrita as células ou corpos celulares, fibras ou tratos, pouca ou nenhuma marcação foi evidenciada em núcleos. As áreas/núcleos foram identificadas de acordo com atlas de Paxinos e Watson (2004).

5.8.1 Bulbo e Hipotálamo

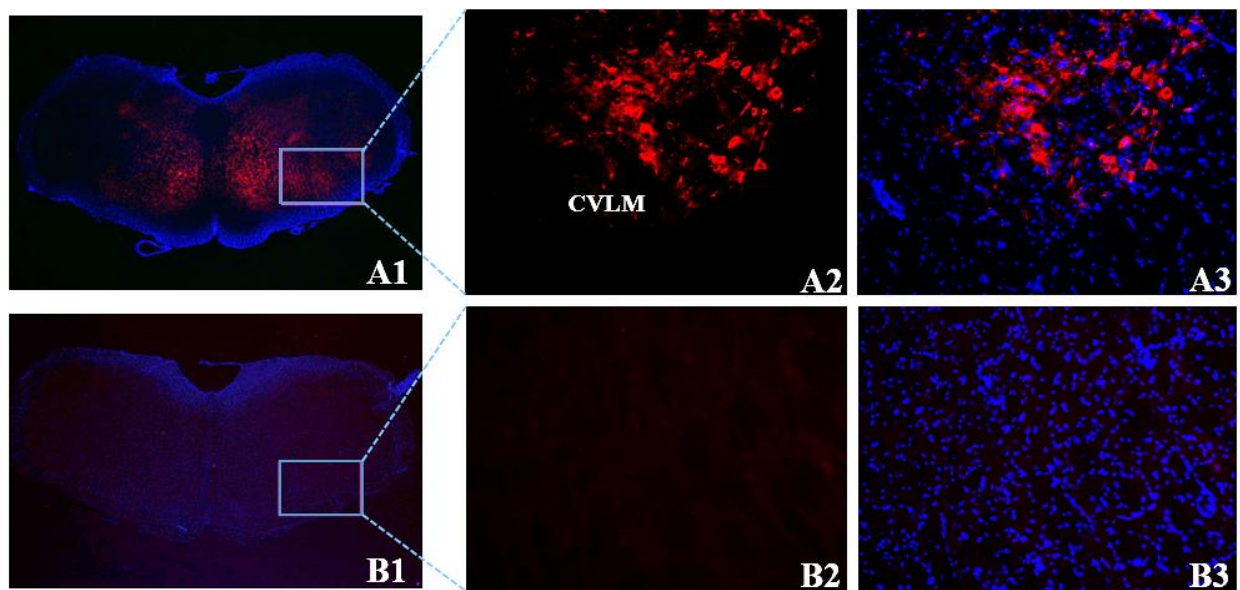
A imunorreatividade para a proteína de fusão que contém a sequência da Ang-(1-7) pode ser detectada com diferentes graus de intensidade em várias células nos ratos TGR(A1-7)7371. No entanto, a marcação de maior intensidade para a proteína de fusão foi identificada nas áreas bulbares relacionadas com o controle cardiovascular como, a área rostral do bulbo ventrolateral (RVLM, Figura 17) e núcleo ambíguo (Amb, Figura 17), área caudal do bulbo ventrolateral (CVLM, Figura 18), núcleo hipoglosso (nXII, Figura 19) e no complexo solitário/vagal (Figura 19 e 20), que compreende o núcleo do trato solitário (NTS) e o núcleo motor dorsal do nervo vago (nX). Vale ressaltar que a imunofluorescência para a proteína de fusão se estendeu ao longo de todo o eixo rostro-caudal, além do corpo celular, para os dendritos das células. No entanto, o núcleo das células apresentaram-se imunonegativo, o que sugere que a marcação se restrinja a membrana celular e/ou citoplasma. Essas regiões participam da modulação de reflexos cardiovasculares importantes para a homeostase da pressão arterial e, esta marcação está em conformidade com os dados apresentados anteriormente. Adicionalmente, é importante enfatizar que nenhuma marcação foi observada nos tecidos cerebrais de ratos SD (Figuras 17-19). A imunorreatividade para a proteína de fusão foi encontrada também em outras áreas rostrais do bulbo não diretamente relacionadas com o controle cardiovascular como núcleo da rafe e núcleo olivar inferior (Figura 21).



Núcleo ambíguo/ área rostroventrolateral do bulbo

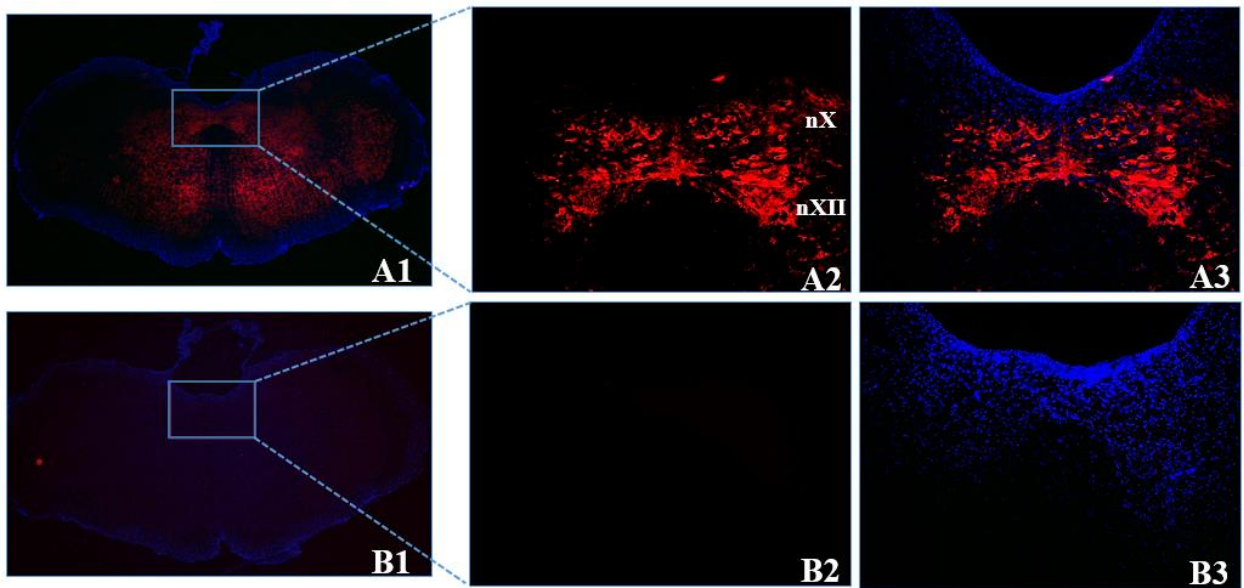
Figura 17. Marcação da proteína de fusão no núcleo ambíguo (Amb) e na área rostroventrolateral do bulbo (RVLM).

Imagens representativas mostrando a marcação imunofluorescente da proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) no Amb e na RVLM de rato TGR(A1-7)7371. A imunorreatividade para proteína de fusão (anti-IgG2b/Cy3 1:300) está em vermelho e o marcador nuclear, DAPI, está em azul. (A1) Células positivas para proteína de fusão no cérebro dos ratos TGR(A1-7)7371 (visão ampliada à direita; A2 e A3) e (B1) células negativas para proteína de fusão no cérebro dos ratos SD (visão ampliada à direita; B2 e B3). Imagens obtidas com o microscópio de fluorescência BZ-9000 (BioRevo Keyence, Japão). Espessura do corte, 40µm, objetivas 2x (A1 e B1) e 20x (A2, A3, B2 e B3).



Área caudoventrolateral do bulbo

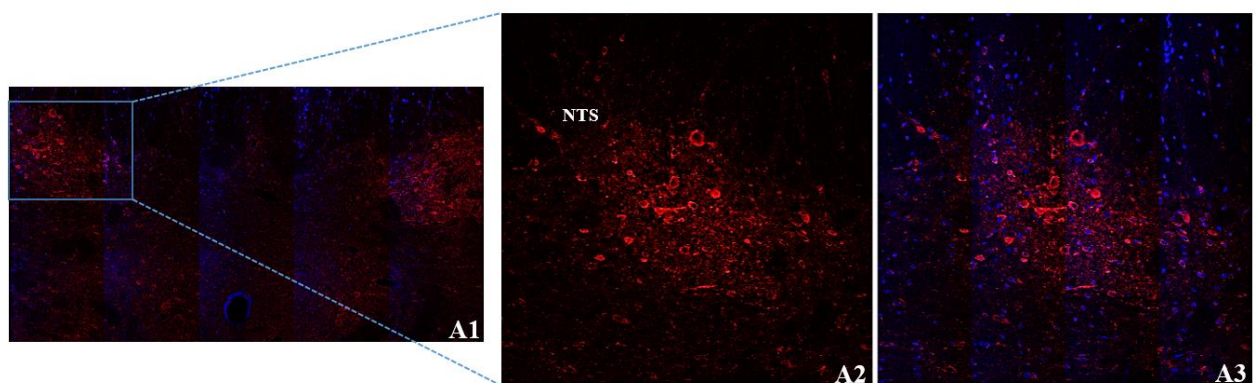
Figura 18. Marcação da proteína de fusão na área caudoventrolateral do bulbo (CVLM). Imagens representativas mostrando a marcação imunofluorescente da proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) na CVLM de rato TGR(A1-7)7371. A imunorreatividade para proteína de fusão (anti-IgG2b/Cy3 1:300) está em vermelho e o marcador nuclear, DAPI, está em azul. (A1) Células positivas para proteína de fusão no cérebro dos ratos TGR(A1-7)7371 (visão ampliada à direita; A2 e A3) e (B1) células negativas para proteína de fusão no cérebro dos ratos SD (visão ampliada à direita; B2 e B3). Imagens obtidas com o microscópio de fluorescência BZ-9000 (BioRevo Keyence, Japão). Espessura do corte- 40 μ m, objetivas 2x (A1 e B1) e 20x (A2, A3, B2 e B3).



Núcleo motor dorsal do vago/ núcleo hipoglosso

Figura 19. Marcação da proteína de fusão no núcleo motor dorsal do vago (nX) e núcleo hipoglosso (nXII).

Imagens representativas mostrando a marcação imunofluorescente da proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) no nX e nXII de rato TGR(A1-7)7371. A imunorreatividade para proteína de fusão (anti-IgG2b/Cy3 1:300) está em vermelho e o marcador nuclear, DAPI, está em azul. (A1) Células positivas para proteína de fusão no cérebro dos ratos TGR(A1-7)7371 (visão ampliada à direita; A2 e A3) e (B1) células negativas para proteína de fusão no cérebro dos ratos SD (visão ampliada à direita; B2 e B3). Imagens obtidas com o microscópio de fluorescência BZ-9000 (BioRevo Keyence, Japão). Espessura do corte- 40µm, objetivas 2x (A1 e B1) e 20x (A2, A3, B2 e B3).



Núcleo do trato solitário

Figura 20. Marcação da proteína de fusão no núcleo do trato solitário (NTS).

Imagens representativas mostrando a marcação imunofluorescente da proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) no NTS de rato TGR(A1-7)7371. A imunorreatividade para proteína de fusão (anti-IgG2b/Cy3 1:300) está em vermelho e o marcador nuclear, DAPI, está em azul. (A1) Células positivas para proteína de fusão no cérebro dos ratos TGR(A1-7)7371 (visão ampliada à direita; A2 e A3). Imagens obtidas com o microscópio Confocal Zeiss 880 (Zeiss, Alemanha). Espessura do corte- 40µm, objetivas 20x (A1) e 40x (A2 e A3) – tile scan.

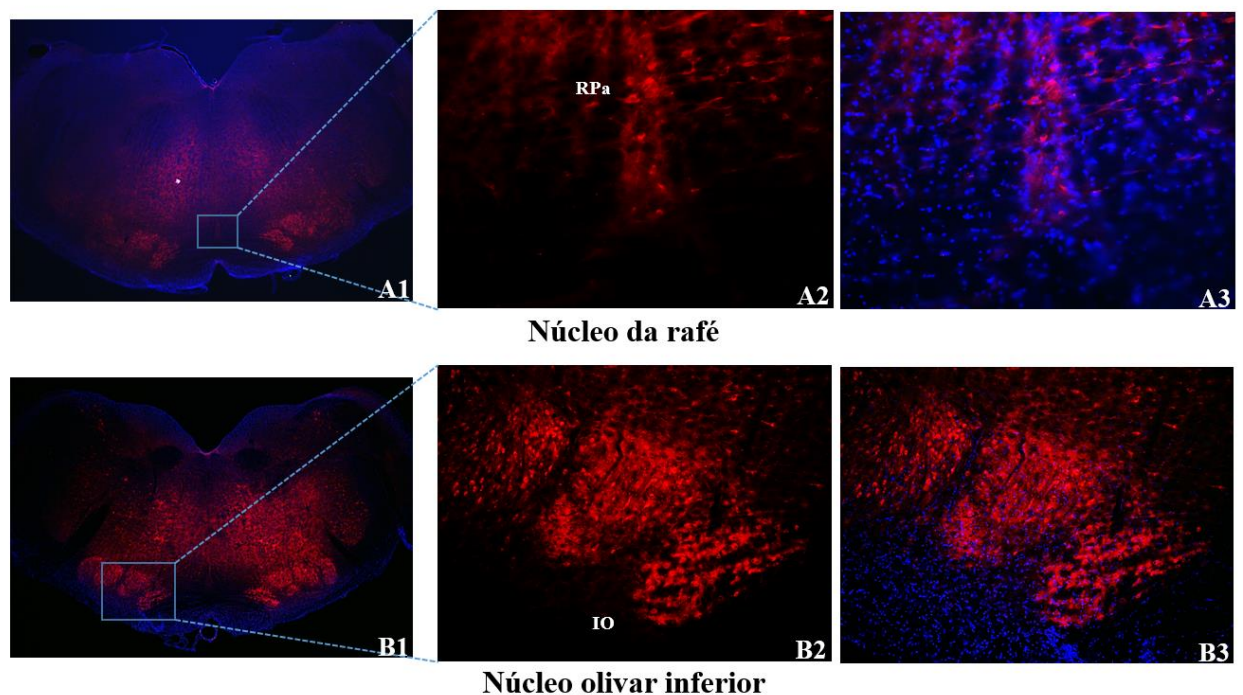


Figura 21. Marcação da proteína de fusão no núcleo da rafe (RPa) e núcleo olivar inferior (IO).

Imagens representativas mostrando a marcação imunofluorescente da proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) no RPa e IO de rato TGR(A1-7)7371. A imunorreatividade para proteína de fusão (anti-IgG2b/Cy3 1:300) está em vermelho e o marcador nuclear, DAPI, está em azul. (A1) Células positivas para proteína de fusão no núcleo da rafe dos ratos TGR(A1-7)7371 (visão ampliada à direita; A2 e A3) e (B1) células positivas para proteína de fusão no núcleo olivar inferior dos ratos TGR(A1-7)7371 (visão ampliada à direita; B2 e B3). Imagens obtidas com o microscópio de fluorescência BZ-9000 (BioRevo Keyence, Japão). Espessura do corte- 40µm, objetivas 2x (A1 e B1), 10x (B2 e B3) e 20x (A2 e A3).

Nas áreas prosencefálicas, a imunofluorescência para a proteína de fusão foi observada em áreas mais restritas. Diferentemente do bulbo, onde vários grupamentos de células foram imunorreativos, no hipotálamo os ratos [TGR(A1-7)7371] mostraram imunorreatividade para a proteína de fusão apenas no núcleo supra-óptico (SON, Figura 22). Esse resultado está de acordo com os níveis aumentados de AVP nos ratos transgênicos. Para nossa surpresa, nenhuma imunocoloração foi observada no núcleo paraventricular (PVN) dos ratos [TGR(A1-7)7371] (Figura 23), área importante para o controle cardiovascular especialmente nos ajustes ao estresse emocional (DiMicco e cols., 1996). Da mesma forma que nas outras regiões, não houve

marcação quando o ensaio foi realizado em ratos SD e em tecidos incubados sem anticorpo primário.

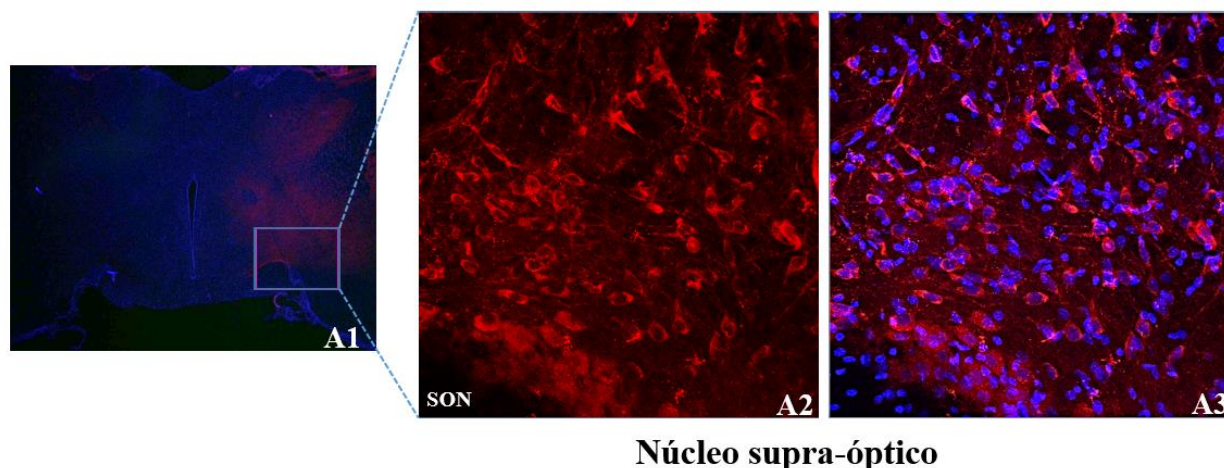


Figura 22. Marcação da proteína de fusão no núcleo supra-óptico (SON).

Imagens representativas mostrando a marcação imunofluorescente da proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) no SON de rato TGR(A1-7)7371. A imunorreatividade para proteína de fusão (anti-IgG2b/Cy3 1:300) está em vermelho e o marcador nuclear, DAPI, está em azul. (A1) Células positivas para proteína de fusão no cérebro dos ratos TGR(A1-7)7371 (visão ampliada à direita; A2 e A3). Imagens obtidas com o microscópio de fluorescência BZ-9000 (A1; BioRevo Keyence, Japão) e microscópio Confocal Zeiss 700 (A2 e A3; Zeiss, Alemanha). Espessura do corte- 40µm, objetivas 2x (A1) e 20x (A2 e A3).

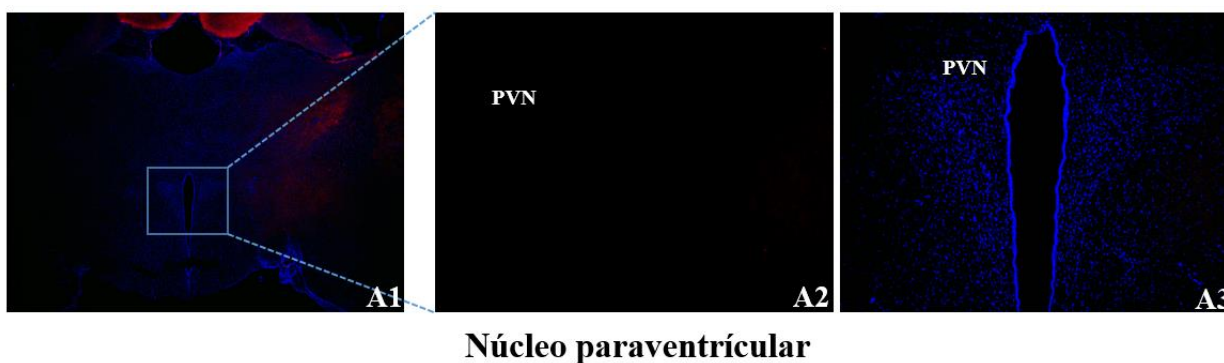


Figura 23. Marcação da proteína de fusão no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo.

Imagens representativas mostrando a ausência de expressão da proteína de fusão no PVN de rato TGR(A1-7)7371. A imunorreatividade para proteína de fusão (anti-IgG2b/Cy3 1:300) está em vermelho e o marcador nuclear, DAPI, está em azul. (A1) Células negativas para proteína de fusão no PVN dos ratos TGR(A1-7)7371 (visão ampliada à direita; A2 e A3). Imagens obtidas com o microscópio de fluorescência BZ-9000 (BioRevo Keyence, Japão). Espessura do corte- 40µm, objetivas 2x (A1) e 10x (A2 e A3).

Imunorreatividade para a proteína de fusão foi encontrada também em outras áreas não diretamente relacionadas com o controle cardiovascular ou o balanço hidroeletrólítico nos ratos TGR(A1-7)7371, incluindo o hipocampo (giro denteado e áreas CA1, CA2 e CA3 do giro hipocampal), diferentes sub-regiões do córtex, núcleo ventral posterolateral talâmico, núcleo amigdalóide basomedial, globo pálido (Figura 24) e corpo estriado (Figura 25). Da mesma forma que para as outras regiões, a marcação para a proteína de fusão não foi observada no grupo controle (ratos SD).

As imagens de cada área/ núcleo foram obtidas no nível de secção frontal que apresentaram maior intensidade, no entanto, se estenderam através do eixo rostro-caudal, até onde os cortes foram realizados. A Figura 25 apresenta detalhes da marcação em células do hipocampo dos ratos [TGR(A1-7)7371] e SD.

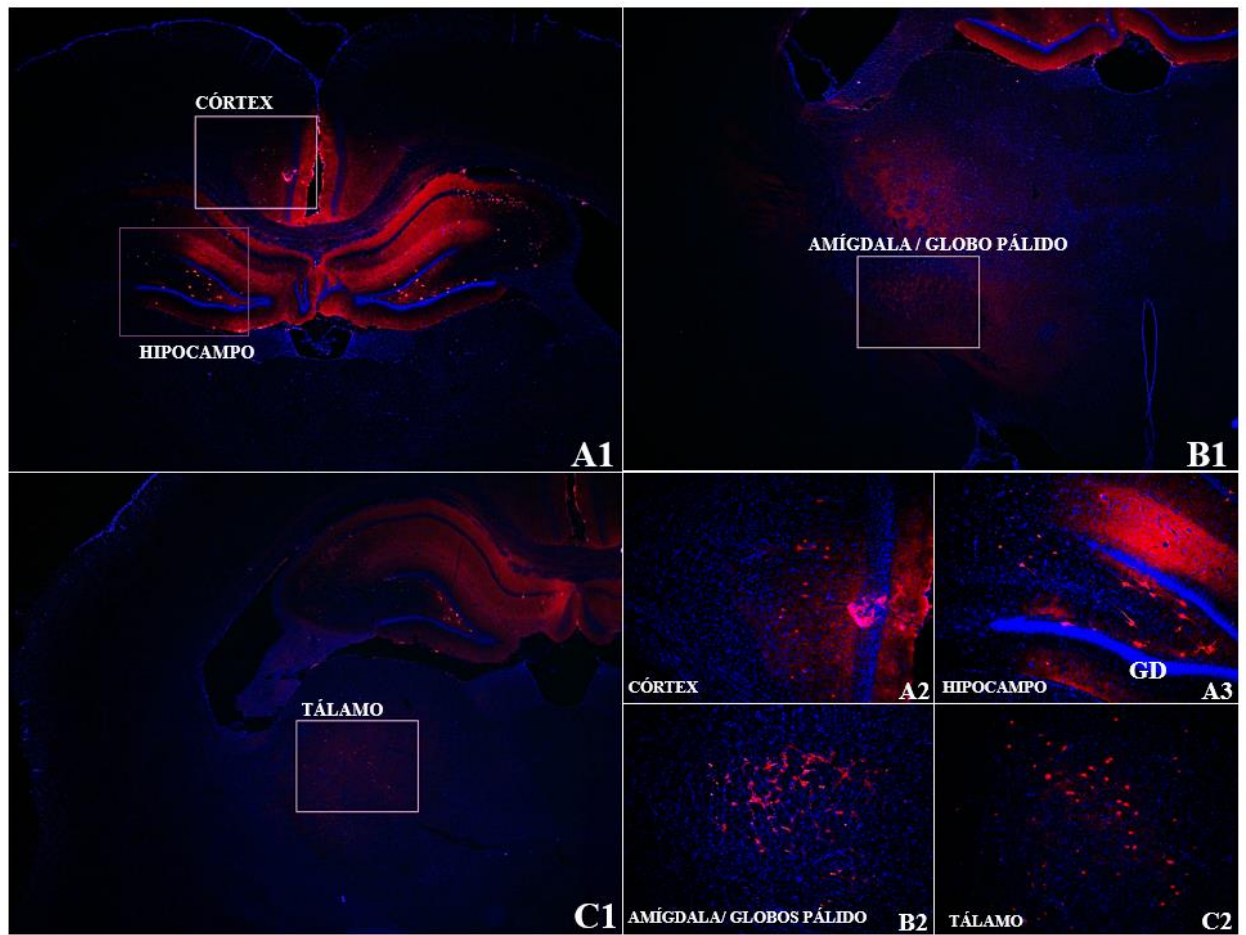


Figura 24. Marcação da proteína de fusão no córtex retrosplenial granular e giro dentado (GD) do hipocampo (A1), amígdala e globo pálido (B1) e núcleo ventral posterolateral talâmico (C1).

Expressão da proteína de fusão no GD do hipocampo (A1); amígdala e globo pálido (B1) e núcleo ventral posterolateral talâmico (C1) de ratos transgênicos [TGR(A1-7)7371]. As imagens (A2, A3, B2 e C2) foram obtidas da área delimitada pelo retângulo desenhado nos cortes A1-C1. Em vermelho (IgG2b/Cy3 1:300), marcação positiva para a proteína de fusão. Em azul, marcação dos núcleos com DAPI. Imagens obtidas com o microscópio de fluorescência BZ-9000 (BioRevo Keyence, Japão). Espessura do corte- 50µm, objetivas 2x (A1-C1) e 10x (A2, A3, B2 e C2).

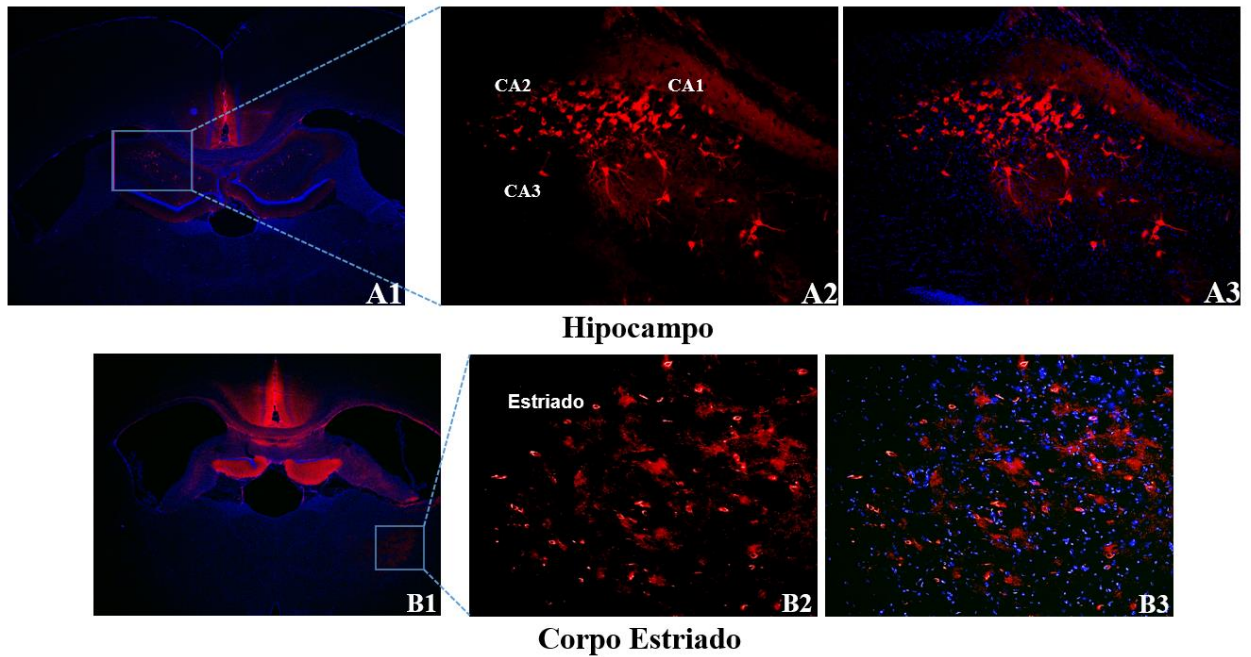


Figura 25. Marcação da proteína de fusão no hipocampo e corpo estriado

Imagens representativas mostrando a marcação imunofluorescente da proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) no hipocampo (áreas CA1, CA2 e CA3) e corpo estriado de rato TGR(A1-7)7371. A imunorreatividade para proteína de fusão (anti-IgG2b/Cy3 1:300) está em vermelho e o marcador nuclear, DAPI, está em azul. (A1) Células positivas para proteína de fusão no hipocampo dos ratos TGR(A1-7)7371 (visão ampliada à direita; A2 e A3) e (B1) células positivas para proteína de fusão no estriado dos ratos TGR(A1-7)7371 (visão ampliada à direita; B2 e B3). Imagens obtidas com o microscópio de fluorescência BZ-9000 (BioRevo Keyence, Japão). Espessura do corte- 40µm, objetivas 2x (A1 e B1) e 10x (A2, A3, B2 e B3).

A Figura 26 resume em diagramas, com base no atlas de Paxinos e Watson (2004), a localização da imunorreatividade para a proteína de fusão produtora de Angiotensina-(1-7) em diferentes áreas do cérebro de ratos TGR(A1-7)7371.

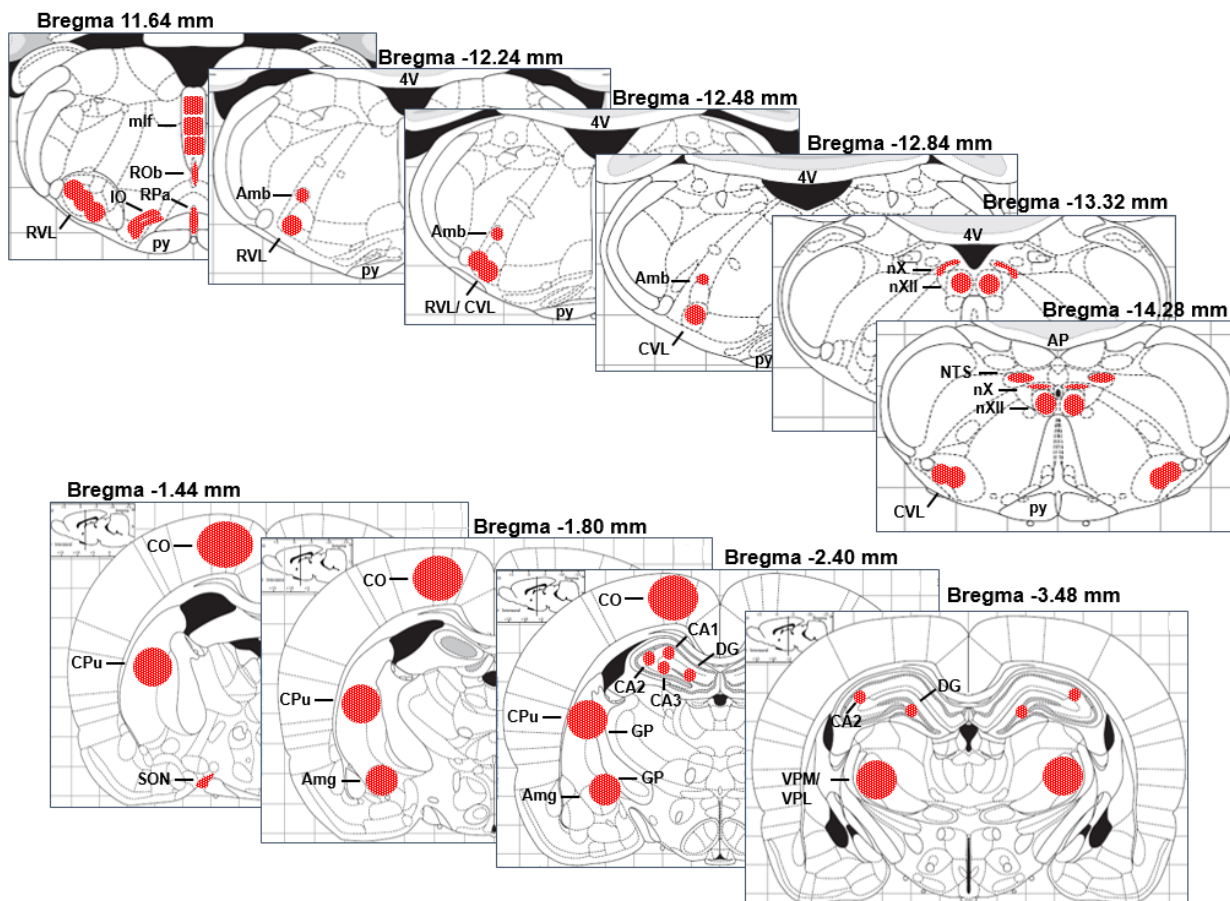


Figure 26. Localização da marcação imunofluorescente para a proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7) em diferentes áreas do cérebro de TGR.

Diagramas esquemáticos de seções frontais do cérebro do atlas de Paxinos e Watson (2004) em diferentes níveis (número em diagramas) mostrando a localização (área sombreada vermelha) da imunorreatividade da proteína de fusão em diferentes áreas do cérebro de ratos TGR(A1-7)7371 como observado em todos os animais estudados. nX, núcleo motor dorsal do vago; nXII, núcleo hipoglosso; Amb, núcleo ambíguo; Amg, amígdala; AP, área postrema; CA1, CA2 e CA3 áreas do hipocampo; CO, córtex; CPu, corpo estriado; CVL, caudal ventrolateral reticular do bulbo; DG, giro dentado; GP, globo pálido; NTS, núcleo do trato solitário; SON, núcleo supra-óptico; 4V, 4º ventrículo; py, trato piramidal; RVL, rostro ventrolateral reticular do bulbo; VPM/ VPL, Tálamo.

VI DISCUSSÃO

6.1 Considerações Gerais e parâmetros hemodinâmicos

A manipulação gênica de componentes do SRA tem contribuído para ampliar o conhecimento a respeito dos mecanismos que são modulados por este sistema e sua importância na fisiopatologia de várias doenças entre elas as doenças cardiovasculares (DCV). A modificação genética de ratos e camundongos tornou-se uma ferramenta importante para testar hipóteses bioquímicas e elucidar o papel de proteínas específicas na fisiopatologia de diferentes doenças. Nesse estudo procuramos entender melhor o papel da Ang-(1-7) produzida no sistema nervoso central sobre o controle cardiovascular, utilizando animais TGR que sofreram manipulação genética com a incorporação em seu genoma de um gene que codifica uma proteína de fusão contendo a sequência da Ang-(1-7) e sob regulação do promotor GFAP. Assim, o peptídeo será liberado principalmente no SNC. Esse é o primeiro e único modelo de rato transgênico que permite avaliar os efeitos induzidos pelo aumento de longo prazo da Ang-(1-7) no SNC, independente dos efeitos periféricos.

Em estudo anterior observamos que esses animais apresentam menor PAM com produção aumentada de Ang-(1-7) no encéfalo, um aumento de 32% no hipotálamo e uma tendência ao aumento da concentração de Ang-(1-7) no bulbo e outras regiões do encéfalo ($p= 0,07$), sem alteração significativa desse peptídeo na circulação. Estes dados sugerem que o aumento de Ang-(1-7) está restrito ao cérebro e que não há vazamento aparente ou significativo para a periferia (Alves e cols., 2013; Alves e cols., 2014). A menor PA dos ratos TGR é um dado importante de ser ressaltado, uma vez que o background desses animais é normotenso. Entretanto, esses animais apresentaram aumento do tônus simpático cardíaco e vascular acompanhado de aumento dos níveis plasmáticos de AVP, redução do volume urinário, aumento da concentração urinária de sódio e uma tendência de aumento da osmolaridade urinária, sem alteração significativa no volume de ingestão de água e concentração de potássio urinário. Estes dados sugerem que o menor valor de PA destes animais é resultado de complexa interação da

Ang-(1-7) com diferentes áreas do SNC e/ou de mecanismos compensatórios centrais e periféricos gatilhados para manter a PA em níveis mais próximos ao fisiológico (Alves e cols., 2013; Alves, 2014; Alves e cols., 2014).

No presente estudo estendemos estes resultados e, ao medir o fluxo regional através de microesferas fluorescentes, observamos aumento do fluxo sanguíneo em diferentes órgãos/tecidos, o que resultou em diminuição significativa da RPT. Assim, estes dados indicam que a menor PAM destes TGR é decorrente de redução da RPT. Entretanto, estes animais apresentaram aumento do IC, o que indica um estado de hiperdinamismo da circulação e, deve estar relacionado ao efeito simpático cardíaco associado a aumento do retorno venoso. O aumento do retorno venoso, por sua vez, deve estar relacionado a redução da capacitância venosa mediada também pelo aumento da atividade do SNS. Hipótese que é corroborada pela maior atividade simpática cardíaca e vascular (α -adrenérgico), observada nos TGR através de bloqueio farmacológico (prazosin e propranolol; Alves, 2014). É interessante observar que o maior IC não compensa completamente a menor RPT e, com isso, a PAM dos TGR é menor do que a dos animais SD.

No presente estudo, observamos também que os TGR apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de ANP, um hormônio natriurético e vasodilatador, que pode explicar a vasodilatação nos tecidos estudados. Esse dado está de acordo também com a observação de que os TGRs apresentaram um aumento na concentração urinária de sódio (Alves, 2014). O ANP pode contribuir para reduzir a RPT por meio de sua bem conhecida ação vasodilatadora direta (Sabrane e cols., 2005; Brenner e cols., 1990). Estudos mostram que portadores de variante genética de ANP (polimorfismo de nucleotídeo único, rs5068), que está associada a níveis circulantes mais altos de ANP, têm valores mais baixos de PA e menor risco de desenvolver hipertensão arterial (Newton-Cheh e cols., 2009; Cannone e cols., 2011; Cannone e cols., 2013; Ichiki e Burnett Jr, 2017). Desta forma, a menor PA dos TGRs pode ser, em grande parte, devido ao efeito hipotensor do ANP.

Gutkowska e cols. (1997) mostraram que a liberação de ocitocina estimula receptores cardíacos promovendo a secreção de ANP. É possível que o aumento de Ang-(1-7) cerebral esteja induzindo a liberação de ocitocina, através da interação com neurônios ocitocinérgicos no SON e/ou PVN ou, indiretamente, pela liberação de AVP ou estimulação de neurônios serotoninérgicos (Jorgensen e cols., 2003; Voigt e cols., 2005; Thompson e cols., 2007; Kangussu e cols., 2013). Estudos futuros serão necessários para medir os níveis de ocitocina nos TGRs e comprovar estas hipóteses. A excitação neuronal induzida por Ang-(1-7) no PVN está de acordo com o efeito direto desse peptídeo sobre a liberação de vasopressina, mostrada no estudo anterior. Dietz (1988) mostrou que AVP aumenta os níveis de ANP no plasma em resposta a alterações de pressão arterial, sugerindo um mecanismo adicional para explicar os níveis aumentados de ANP nos TGRs.

6.2 Identificação da proteína de fusão em áreas bulbares e suprabulbares

Inicialmente mostramos que o anticorpo utilizado reconhece a porção IgG2b da proteína de fusão, através da identificação por imunofluorescência em testículos e não no cérebro de ratos [TGR(A1-7)3292]. O testículo de ratos [TGR(A1-7)3292] foi utilizado como controle positivo, porque esses animais expressam a mesma proteína de fusão contendo a sequência de Ang-(1-7), porém a expressão está restrita aos testículos devido ao promotor utilizado (Santos e cols., 2004). Esse primeiro ensaio imunofluorescente realizado em testículos, nos ajudou validar o anticorpo e descartar falsos-positivos. Não foi observada marcação nos testículos de ratos TGR(A1-7)7371 e SD, mostrando que o anticorpo utilizado em nosso estudo reconhece com “seletividade” a proteína de fusão.

No presente estudo, imunorreatividade para a proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) foi observada em áreas e núcleos bulbares e suprabulbares envolvidas com o controle cardiovascular. Além disso, foi observado marcação em outras áreas onde as ações da Ang-(1-7) são importantes na modulação de funções cognitivas, comportamentais e do sistema límbico.

Estudos anteriores mostraram a expressão do receptor Mas, predominantemente em neurônios, em diversas áreas bulbares (NTS, RVLM e CVLM) e hipotalâmicas (PVN e SON) relacionadas com o controle tônico da PA e FC (Becker e cols., 2007). Além disso, o receptor Mas está presente em outras áreas como hipocampo, amígdala, tálamo e córtex (Metzger e cols., 1995; Becker e cols., 2007; Freund e cols., 2012). Block e cols. em 1988 mostraram a distribuição neuroanatomica de Ang-(1-7) no PVN e SON, com presença de Ang-(1-7) e AVP em células neurosecretórias magnocelulares do PVN sugerindo que a Ang-(1-7) é parte da via secretória neuro-hipotálamo-hipofisária. A presença do peptídeo e do seu receptor em estreita proximidade é consistente com o papel de Ang-(1-7) na modulação de funções cardiovasculares e neuroendócrinas.

Em nosso estudo observamos intensa imunoreatividade para a proteína de fusão em áreas bulbares, especialmente aquelas que participam do controle cardiovascular como o NTS, a CVLM e a RVLM. Estudos anteriores mostraram que a microinjeção de Ang-(1-7) nestas áreas induz alterações distintas na PAM e FC, tais como, hipotensão e bradicardia, hipertensão e taquicardia, aumento ou redução do tônus simpático (Silva e cols., 1993; Fontes e cols., 1994, 1997; Chaves e cols., 2000; Alzamora e cols., 2002). Os efeitos cardiovasculares produzidos pela injeção de Ang-(1-7) nestas áreas estão relacionados ao receptor Mas, uma vez que, podem ser abolidos pelo seu antagonista, o A-779 (Santos e cols., 2018). Injeções agudas de Ang-(1-7) determinam efeitos distintos dependendo da área do cérebro. A presença do transgene na RVLM está de acordo com o aumento da atividade simpática periférica. No entanto, a presença do transgene na CVLM e NTS não estão. Desta forma, é possível que nesse modelo de animal transgênico, a Ang-(1-7) possa estar atuando em diversas áreas relacionadas ao controle cardiovascular com intensidade diferenciada. Por outro lado, mecanismos compensatórios gatilhados pela menor PA também podem estar atuando no sentido de manter a homeostase de pressão e, com isso, mascarar os efeitos hipotensores diretos desencadeados pela Ang-(1-7) em certas áreas do SNC.

Estudos anteriores avaliaram os mecanismos periféricos envolvidos nos efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção de Ang-(1-7) em áreas bulbares. A microinjeção de Ang-(1-7) na CVLM e RVLM promove alterações da PA sem alteração do DC (Alzamora e cols., 2002; Yamazato e cols., 2007; Ferreira e cols., 2008; Oliveira e cols., 2013). Os efeitos na PA desencadeados pela Ang-(1-7) nessas áreas bulbares foram relacionados a modulação de uma possível via simpático-colinérgica, que determina a liberação periférica de NO, uma vez que, esses efeitos foram bloqueados pela administração endovenosa do antagonista α 1-adrenérgico prazosin, metil-atropina e inibidores da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS; 7-nitroindazol) ou óxido nítrico sintase (NOS; L-NAME; Alzamora e cols., 2002; Oliveira e cols., 2013). É possível que, em nosso estudo, o efeito hipotensor observado esteja relacionado à liberação de NO induzido pela atuação da Ang-(1-7) preferencialmente na CVLM.

Por outro lado, no nosso estudo foi observado imunorreatividade para proteína de fusão no NTS, desta forma esperávamos que os animais TGR apresentassem melhora na sensibilidade barorreflexo. No entanto, o estudo anterior mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa dos animais TGR em comparação aos SD na sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca (Alves, 2014). Esse resultado é contrário aos apresentados por outros autores que descreveram aumento da sensibilidade do reflexo pressorreceptor para a bradicardia reflexa pela microinjeção de Ang-(1-7) no NTS em ratos normotensos (Chaves e cols., 2000), ou infusão ICV em ratos normotensos (Campagnole-Santos e cols., 1992) ou hipertensos (Guimarães e cols., 2012; Kangussu e cols., 2013). Estudo de Michelini e Bonagamba (1988) mostraram que a microinjeção de AVP no NTS atenua a bradicardia barorreflexa, sem alterar a taquicardia reflexa. Os autores sugerem que o sistema vasopressinérgico pode ser um modulador do controle barorreflexo da FC. Assim é possível que alteração de vias vasopressinérgicas desencadeadas pela Ang-(1-7) em áreas suprabulbares possam estar atenuando o efeito direto da Ang-(1-7) sobre a modulação do barorreflexo. Estudos futuros deverão avaliar esta possibilidade.

Os nossos resultados mostraram também imunorreatividade para a proteína de fusão no SON do hipotálamo. Esse resultado está de acordo com os níveis aumentados de AVP e redução do volume urinário nos ratos transgênicos (Alves e cols., 2013; Alves e cols., 2014). Para nossa surpresa, nenhuma imunocoloração foi observada no PVN dos ratos TGR. Desta forma, não parece que haja efeito direto da Ang-(1-7) no PVN dos TGR. Se neurônios do PVN estão mais ativos nestes animais de forma indireta, através de projeções provenientes de outras áreas cerebrais, ainda deverá ser avaliado, uma vez que, não descartamos a possibilidade de haver liberação da Ang-(1-7) nesta área, pois a proteína de fusão pode ser produzida no corpo celular de uma área (por exemplo RVLM) e a Ang-(1-7) ser liberada em outra área (por exemplo o PVN).

Estudo anteriores mostraram que estimulação aguda com Ang-(1-7) no sistema hipotálamo-neurohipófise estimula a liberação de AVP da mesma forma que a Ang II e Ang III (Schiavone e cols., 1988; Zini e cols., 1996; Phillips e Sumners, 1998). Além disso, a partir da RVLM partem projeções para os núcleos hipotalâmicos envolvidos na liberação de AVP, tais como PVN e SON (Petrov e cols., 1993; Oliveira e cols., 2013). Vários trabalhos apontam a AVP como um importante modulador do sistema nervoso autônomo e da atividade nervosa simpática periférica (Webb e cols., 1986; Imaizumi e Thames, 1986; Osborn e cols., 1987).

Ambühl e cols., em 1994 mostraram que a injeção aguda de Ang-(1-7) produz efeito excitatório em células neuronais do núcleo PVN. Silva e cols., em 2005 mostraram que a microinjeção de Ang-(1-7) neste núcleo aumenta a atividade simpática do nervo renal. Esses efeitos são bloqueados pelo antagonista seletivo do receptor Mas, o A-779 (Ambühl e cols., 1994; Silva e cols., 2005). Essa excitação neuronal no PVN por Ang-(1-7) está de acordo com o aumento de vasopressina.

Precisa ser ressaltado, entretanto, que os resultados obtidos com a microinjeção (estimulação aguda) de Ang-(1-7) em áreas seletivas, são na maioria semelhantes aos efeitos induzidos pela Ang II, e não se repetem quando infusão ICV ou manobras genéticas, ou seja,

estimulação de longo prazo do SNC são induzidas com Ang-(1-7). A infusão crônica ICV de Ang-(1-7) atenuou os níveis elevados da PA em ratos submetidos ao modelo DOCA-Sal (Guimarães e cols., 2012), em ratos SHR (Jiang e cols., 2013), em ratos transgênicos (mREN2)27 (Nautiyal e cols., 2012; Kangussu e cols., 2015) e ratos submetidos a um modelo de síndrome metabólica (Guimarães e cols., 2014). Além disso, infusão de longo prazo de Ang-(1-7) reduziu de forma significativa a expressão do receptor AT1 e os níveis de Ang II no SNC (Guimarães e cols., 2012; Jiang e cols., 2013), normalizou e restaurou o controle barorreflexo da FC e o tônus autonômico cardíaco (Guimarães e cols., 2012; Kangussu e cols., 2015), além de reduzir hipertrofia cardíaca (Kangussu e cols., 2015).

Dados semelhantes também foram observados por Garcia-Espinosa e cols. (2012), após injeção de 20 µl da proteína de fusão que contém a sequência de Ang-(1-7) [Ang-(1-7)-FP], (mesma proteína de fusão expressa em ratos TGR(A1-7)3292), na cisterna magna de ratos transgênicos (mREN2)27. De acordo com esses autores, houve redução significativa da PA nos (mREN2)27 (monitorada por 3 dias) acompanhada de melhora no controle barorreflexo da FC. Estes efeitos foram acompanhados também por aumento da expressão de mRNA de fosfatases conhecidas como neutralizadoras da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e proteínas quinases mitogênicas (MAPK), bem como, redução dos níveis de renina e da expressão do receptor AT1 (Garcia-Espinosa e cols., 2012). Além disso, a supreeexpressão da ECA2 na RVLM (Yamazato e cols., 2007) ou no cérebro todo (Feng e cols., 2010), reduziu a pressão arterial de ratos SHR e atenuou a hipertensão neurogênica causada pela infusão de Ang II, respectivamente.

Em síntese os resultados com manobras de aumento dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) de longo prazo mostram, como nos ratos TGR do presente estudo, um papel hipotensor. Entretanto não observamos melhora do controle barorreflexo ou controle autonômico cardíaco. Deve-se ressaltar, no entanto, que os estudos descritos acima foram realizados em animais hipertensos. Assim, é muito significativo a observação que os TGRs do presente estudo apresentam PA mais baixa.

Foi identificado também, a presença da proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) em áreas que aparentemente não possuem relação direta com o controle cardiovascular, como o núcleo da rafe, hipocampo, diferentes sub-regiões do córtex, tálamo, amígdala, globo pálido e corpo estriado. Estudos anteriores mostraram que o SRA está envolvido em outras funções do cérebro, incluindo cognição, memória, percepção da dor, resposta adaptativa a diferentes estímulos estressantes, ansiedade e depressão (Voigt e cols., 2005; Costa e cols., 2012; Lazaroni e cols., 2012; Xing e cols. 2012).

Desta forma, nosso estudo mostra que a presença da proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) em áreas de controle cardiovascular e balanço hidroeletrólítico do cérebro de ratos TGR identificando núcleos/ áreas específicas que podem explicar os efeitos cardiovasculares observados nesses animais. Além disso, a presença da proteína de fusão em outras áreas indica que o fenótipo do rato TGR é mais complexo e pode incluir alterações em aspectos cognitivos e comportamentais, além do cardiovascular. No entanto, estudo futuros visando testes de aprendizagem e comportamentais serão necessários para confirmar essas alterações nos TGRs.

6.3 Identificação da proteína de fusão em neurônios e expressão do transgene em tecidos não-cerebrais

De forma surpreendente, nossos resultados mostraram que a proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) está presente preferencialmente em neurônios e que a expressão do transgene [hGFAP-Ang-(1-7)] na linhagem TGR(A1-7)7371 não ficou restrita ao cérebro, uma vez que mostramos a presença do mRNA do transgene em todos tecidos avaliados (aorta, pulmão, átrio, rim, ventrículo, fígado, testículo e glândula adrenal). No entanto, nenhuma imunorreatividade para proteína de fusão foi observada nos órgãos/ tecidos testados, na aorta, coração, pulmão e testículo dos TGRs. De qualquer maneira, é importante ressaltar que expressão aumentada do transgene e da imunorreatividade para proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) nas mesmas

áreas cerebrais, associada ao aumento dos níveis centrais de Ang-(1-7) sustentam que os TGRs apresentam superexpressão de Ang-(1-7) apenas no cérebro.

Classicamente o promotor GFAP é reconhecido por direcionar expressão de transgenes exclusivamente em astrócitos (Su e cols., 2004). No entanto, vários estudos mostraram que o GFAP pode ser um promotor inespecífico (Kaneko e Sueoka, 1993; Brenner e cols., 1994; Galou e cols., 1994; Peel e Klein, 2000; Zhang e cols., 2004; Su e cols., 2004; Lee e cols., 2008; Liu e cols., 2010). Estes autores mostraram que dependendo da sequência de DNA do GFAP que foi utilizada, pode haver expressão em neurônios e tecidos não-neuronais sob regulação do promotor GFAP. O padrão de expressão em neurônios e células não-neuronais parece variar tanto com a natureza da sequência expressa, quanto com o sítio de inserção do transgene.

Na literatura existem muitos estudos que relatam o uso de promotores do GFAP, porém são poucos os trabalhos que avaliaram a especificidade da expressão no SNC e, é menor ainda o número de estudos que relatam uso de marcador neuronal. Poucos estudos relataram expressão de transgene dirigido pelo GFAP em neurônios. É possível que se marcadores neuronais tivessem sido usados rotineiramente, muitos estudos teriam relatado expressão neuronal de transgenes regulados por GFAP. Portanto, é necessário cautela na validação e interpretação dos resultados obtidos com GFAP transgenes.

Su e cols. em 2004 mostraram que a expressão dos transgenes GFAP-*lacZ* (gene que codifica a enzima β -galactosidase) e GFAP-PPCA (gene da proteína protetora/catepsina A) são significativas tanto em astrócitos quanto em neurônios, utilizando tanto a sequência do promotor GFAP humano quanto de camundongo. Através do método enzimático X-gal (substrato cromógeno para enzima β -galactosidase), hibridização *in situ* e imunofluorescência, esses autores mostraram a localização neuronal para os transgenes em áreas do hipocampo, córtex cerebral, cerebelo, ponte, bulbo e células de Purkinje cerebelar (Su e cols., 2004). Resultados semelhantes também foram relatados por Galou e cols. (1994) utilizando o promotor GFAP de camundongo para o transgene GFAP-*nls-lacZ*. Esses autores, através de uma análise detalhada

do padrão regional de expressão destes transgenes, mostraram que a expressão em neurônios varia em distribuição e em frequência de acordo com a linhagem do animal. Estes autores sugerem que a intensidade de expressão neuronal é dependente do local de integração do transgene (se dirigido pelo GFAP para o núcleo ou citoplasma) e da sequência do gene alvo escolhido, uma vez que diferentes linhagens não exibiram o mesmo padrão de expressão neuronal (Galou e cols., 1994; Su e cols., 2004). Outros autores relataram que um transgene GFAP-GFP incorporado à adenovírus induziu expressão neuronal abundante quando injetado na medula espinhal de rato (Peel e Klein, 2000), sugerindo que outros promotores presentes em um vetor viral poderiam anular a especificidade do promotor de GFAP.

Zhang e cols. em 2004, utilizando o promotor GFAP humano, mostraram expressão do transgene GFAP-TH (gene que codifica a enzima tirosina hidroxilase - TH) apenas em neurônios do trato nigroestriado de ratos, sem expressão em astrócitos. Este estudo corrobora os achados de Galou e cols. (1994), Su e cols. (2004) e os obtidos em nosso estudo. Zhang e cols. (2004) relataram que a estabilidade da enzima TH está relacionada à disponibilidade do cofator biopterina e a expressão da enzima TH é encontrada apenas nas regiões do cérebro que expressam GTP ciclohidrolase I (GTPCH), a enzima limitante da velocidade de biossíntese da biopterina. A expressão do gene para GTPCH está confinado a neurônios monoaminérgicos, e não se expressa em astrócitos, desta forma o cofator de biopterina necessário para a atividade da enzima TH não é sintetizado em astrócito, direcionando o transgene GFAP-TH para neurônios produtores de biopterina. Essa hipótese também pode ser sustentada em nosso estudo, uma vez que, estudos mostraram que a Ang-(1-7) deve ser derivada de fonte não-glial, pois em ratos transgênicos com baixo nível de angiotensinogênio (90%) [TGR(ASrAngio)680], que é derivado principalmente da glia, a expressão neuronal de Ang-(1-7) estava normal (Vinsant e cols., 2005; Sakima e cols., 2007). Desta forma é possível que o transgene [hGFAP-Ang-(1-7)] esteja sendo dirigido principalmente para neurônios por ser a maior fonte produtora de Ang-(1-7) no SNC.

Além da expressão predominante em neurônios, os animais TGR apresentaram expressão do transgene [hGFAP-Ang-(1-7)] em tecidos não cerebrais. Dados na literatura mostram que vários transgenes dirigidos pelo promotor GFAP também podem estar ativos fora do SNC (Kaneko e Sueoka, 1993; Galou e cols., 1994; Schinke e cols., 1999; Zhuo e cols., 2001; Morimoto e cols., 2001; Morimoto e Sigmund, 2002; Su e cols., 2004). A expressão do mRNA e da proteína GFAP tem sido relatada em vários tipos celulares não cerebrais. Essas células incluem células da glia entérica (Jessen e Mirsky, 1980), células de Schwann (Jessen e Mirsky, 1984; Fields e Yens, 1985), condrócitos (Kepes e cols., 1984; Budka, 1986), células mioepiteliais (Viale e cols., 1991), linfócitos (Riol e cols., 1997), células de Kuffer no fígado (Gard e cols., 1985), células da medula óssea e baço (Brenner, 1994), células endoteliais (Schinke e cols., 1999), células epiteliais do cristalino (Boyer e cols., 1991), células da camada média da aorta ascendente (Bonderman e Gharehbaghi Schell, 1999), fibroblastos em válvulas cardíacas (Hainfellner e cols., 2001) e células de Schwann no pulmão (Suarez-Mier e Buckwalter, 2015). Da mesma forma que para expressão neuronal discutida acima, a atividade em outros tipos celulares são variáveis e provavelmente dependem da sequência expressa e do sítio de inserção do transgene. Um caso particularmente interessante é relatado por Chen e cols. em 2003, que mostraram que o receptor do fator de crescimento epidérmico (ErbB) dirigido por GFAP foi expresso predominantemente em astrócitos em algumas linhagens de camundongos e predominantemente em células de Schwann por outras.

Um aspecto importante em nosso estudo foi a alta expressão do mRNA do transgene no cérebro, como esperado, no entanto, expressão de magnitude similar também foi observada na aorta dos TGR. Nos outros tecidos a expressão foi bastante reduzida. Resultados semelhantes foram obtidos por Morimoto e cols. em 2001, que mostraram alta expressão do transgene para o angiotensinogênio (GFAP-hAGT) dirigido pelo promotor humano GFAP na aorta e no fígado de camundongos e menor expressão em outros tecidos (rim, coração, pulmão, adrenal, diafragma, tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom, músculo esquelético, testículo e útero). O mesmo

foi observado por Schinke e cols. em 1999 em ratos transgênicos TGR(ASrAOGEN)680 que expressam um antisense (AS RNA) do angiotensinogênio dirigido pelo promotor humano GFAP. Além da expressão cerebral, o AS RNA estava presente em células endoteliais do fígado, coração e adrenal. É importante relatar que a expressão do transgene AS RNA em outros tecidos não pode ser descartada, uma vez que, os autores só avaliaram a expressão nos tecidos citados acima.

Vários estudos na literatura relatam que segmentos com 2.2 ou 2.0 pb da região flanqueadora 5' promotora do gene GFAP são suficientes para direcionar a expressão de transgenes para astrócitos, porém isto não garante que a expressão gênica fique restrita aos astrócitos (Kaneko e Sueoka e cols., 1993; Galou e cols., 1994; Brenner e cols., 1994). A expressão específica em astrócitos requer interações coordenadas de elementos reguladores tanto na região flanqueadora 5' quanto nas regiões mais distais do gene, incluindo a região flanqueada 3'. Desta forma, na presença de todo gene GFAP, elementos supressores na região flanqueadora 3' previnem a expressão do gene GFAP em neurônios e células não-cerebrais (Kaneko e Sueoka e cols., 1993). No laboratório do Dr. Michael Bader foi estabelecida a linhagem de ratos transgênicos [TGR(A1-7)7371] utilizando 2.2 pb do promotor do gene GFAP humano (sequência em Anexo V) de acordo com transgenes desenhados para outros transgênicos (Brenner e cols., 1994; Schinke e cols., 1999) seguido da sequência de um peptídeo sinalizador proveniente da prorenina humana e um fragmento de imunoglobulina de camundongo (IgG2b) ligado a uma porção do pró-segmento da prorenina humana que expõe o sítio de clivagem para enzima furina e, finalmente, a sequência de codificação para Ang-(1-7) seguida de um códon de parada utilizando oligonucleotídeo de cadeia dupla (Santos e cols., 2004). Além disso, um cassete de íntron e poliadenilação do vírus SV40 inserido na região flanqueadora 3' do códon de parada (Santos e cols., 2004). Uma explicação para a expressão do transgene em neurônios e a não expressão em astrócitos pode estar relacionada a um fator intrínseco na estrutura do transgene, ou seja, um elemento regulador negativo que reprime a expressão neuronal e de

tecidos não-cerebrais pode estar faltando na sequência do promotor utilizado em nosso estudo. É importante relatar que o promotor GFAP utilizado na linhagem TGR(A1-7)7371 foi confirmado através da técnica de sequenciamento vista em anexos I-IV.

Kaneko e Sueoka em 1993 utilizando linhagens de células neurotumerais (RT4) de rato, em que a diferenciação neuronal/glial ocorre *in vitro*, juntamente com linhagens celulares de diferentes tecidos, identificaram por meio de testes de transfecção transiente e permanente duas regiões reguladoras negativas para o GFAP, GDR1 e GDR2 (GFAP downstream regulators 1 and 2). Utilizando várias sequências do promotor e do gene GFAP esses autores mostraram, que até mesmo 10.8 pb de sequência do promotor a montante do local de início da transcrição, não foram suficientes para restringir a expressão do gene aos astrócitos. Os autores relatam que quando uma região de 2.7 pb referente a região reguladora negativa GDR1 foi adicionada à sequência promotora de 10.8 pb, a expressão do gene GFAP foi suprimida em tecidos não-neuronais e quando o GDR1 foi associado a região reguladora negativa, GDR2, uma região de 1.7 pb a montante do sítio de poliadenilação na região flanqueadora 3', a expressão do gene GFAP foi suprimida em neurônios e tecidos não-neuronais. Desta forma, os autores mostram que esses "silenciadores" funcionam de maneira independente da posição, mas que a presença de ambos é necessária para a supressão da expressão gênica de GFAP em neurônios e tecidos não-neuronais *in vitro*. De acordo com esses dados, nossos resultados mostraram que a ausência, *in vivo*, de GDR1 e GDR2 nos animais TGR(A1-7)7371 realmente permite a expressão do gene GFAP em células neuronais e tecidos não-cerebrais. Alguns autores relatam ainda que, alguns tipos de células astrogliais que normalmente expressam GFAP são incapazes de expressar transgenes devido a deleção de elementos iniciadores contidos em determinados fragmentos deletados durante a inserção do gene repórter (Nakatani e cols., 1990; Mucke e cols, 1991; Galou e cols., 1994), o que poderia explicar a ausência do transgene em astrócitos nos TGRs.

Por fim, é importante enfatizar que em nosso estudo foi observada expressão do transgene em tecidos não-cerebrais, porém a proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) não

parece estar presente na aorta, no pulmão, no coração e no testículo dos TGRs, como evidenciado por imunofluorescência. Assim, um aumento dos níveis de Ang-(1-7) nos tecidos periféricos ou no plasma é improvável. Além disso, não há evidências para isso em nosso estudo, uma vez que, os níveis plasmáticos de Ang-(1-7) nos ratos transgênicos foram semelhantes ao dos ratos SD controle (Alves, 2014). Essa falta de correlação entre a expressão do mRNA e a ausência da proteína de fusão nos tecidos periféricos pode estar relacionada ao nível de ocupação ribossômica do transgene, uma vez que, proteínas que possuem taxa de ocupação ribossomal muito baixa não apresentam correlação com a expressão do mRNA. Assim, como a célula não controlou rigidamente a expressão de mRNA, os níveis de proteína resultantes serão determinados através de controle rigoroso de sua tradução (Arava e cols., 2003).

Em síntese os resultados do presente estudo mostram que animais que superexpressam a proteína de fusão liberadora de Ang-(1-7) sob regulação do promotor GFAP, apresentam redução da pressão arterial decorrente possivelmente do aumento de Ang-(1-7) em neurônios de áreas cerebrais relacionadas ao controle cardiovascular associada à modulação da liberação do ANP, resultando em vasodilatação em vários territórios periféricos o que resulta em importante redução da RPT e da PA. No entanto, estudos futuros serão necessários para se avaliar a presença da proteína de fusão em diferentes tipos neuronais (neurônios gabaérgicos, nitrérgicos, catecolaminérgicos e glutamatérgicos), bem como, avaliar se a ativação de diferentes populações neuronais participam das mesmas respostas ou se para respostas fisiológicas distintas, diferentes populações são preferencialmente ativadas.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrecht D. Angiotensin-(1-7)-induced plasticity changes in the lateral amygdala are mediated by COX-2 and NO. *Learn Mem.* 14(3): 177-84, 2017.
- Almeida-Santos AF, Kangussu LM, Moreira FA, Santos RAS, Aguiar DC, Campagnole-Santos MJ. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of angiotensin-(1-7) in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Clinical Science* 130: 1247–1255, 2016.
- Alves DT, Guimaraes PS, Mihail T, Bader M, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Selective expression of an Angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the brain decreases blood pressure. In: *Experimental Biology*, 2014, San Diego USA.
- Alves DT, Guimaraes PS, Mihail T, Bader M, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Selective expression of an Angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the brain decreases blood pressure. In: *IX International Symposium on Vasoactive Peptides*, 2013, Belo Horizonte MG.
- Alves DT. Avaliação de mecanismos de controle da pressão arterial em ratos que expressam uma proteína de fusão contendo a sequência de angiotensina-(1-7) no cérebro. Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia e biofísica do programa de pós-graduação em fisiologia e farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais. 85 páginas. 4 de Abril de 2014.
- Alzamora AC, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Baroreflex modulation by angiotensins at the rat rostral and caudal ventrolateral medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290: R1027–R1034, 2006.
- Alzamora AC, Santos RAS, Campagnole-santos MJ. Hypotensive effect of Ang II and Ang-(1-7) at the caudal ventrolateral medulla involves different mechanisms. *Am J Physiol Regul Int Comp Physiol.* 283(5): R1187-95, 2002.
- Ambuhl P, Felix D, Imboden H, Khosla MC, Ferrario CM. Effects of angiotensin analogues and angiotensin receptor antagonists on paraventricular neurones. *Regul Peptides.* 38: 111-120, 1991.
- Ambuhl P, Felix D, Imboden H, Khosla MC. [7-D-ALA]-Angiotensin-(1-7): Selective Antagonism of Angiotensin-(1-7) in the Rat Paraventricular Nucleus. *Brain Res Bull.* 35(4): 289-291, 1994.
- Arava Y, Wang Y, Storey JD, Liu CL, Brown PO, Herschlag D: Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci.* 100:3889-3894, 2003.
- Atlas SA. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy.* 13(8 suppl S-b): S9–S20, 2007.

- Ayyub M, Najmi AK, Akhtar M. Protective effect of irbesartan an angiotensin (AT₁) receptor antagonist in unpredictable chronic mild stress induced depression in mice. *Drug Res (Stuttg)* 67(01): 59-64, 2017.
- Bader M, Ganten D: Update on tissue rennin-angiotensin systems. *J Mol Med.* 86: 615-621, 2008.
- Barnes KL, Knowles WD, Ferrario CM. Angiotensin II and angiotensin (1-7) excite neurons in the canine medulla in vitro. *Brain Res Bull.* 24: 275–280, 1990.
- Becker LK, Etelvino GM, Walther T, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293: 1416-1424, 2007.
- Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM. Pivotal Role of a gp91phox-Containing NADPH Oxidase in Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *Circulation.* 105(3):293–6, 2002.
- Bermann MA, Walsh MF, Sowers JR. Angiotensin-II Biochemistry and Physiology: Update on Angiotensin-II Receptor Blockers. *Cardiovascular Drug Review.* 15(1): 75-100, 1997.
- Bickerton RK, Buckley JP. Evidence for a central mechanism in angiotensin-induced hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med* 106: 836–843, 1961.
- Bild W, Ciobica A. Angiotensin-(1-7) central administration induces anxiolytic-like effects in elevated plus maze and decreased oxidative stress in the amygdala. *J Affect Disord* 145:165–71, 2013.
- Block C, Santos RAS, Brosnihan KB, Ferrario CM. Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the brain forebrain. *Peptides* 9(6): 1395-401, 1988.
- Botelho-Santos GA, Sampaio WO, Reudelhuber TL, Bader M, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292: H2485-H2490, 2007.
- Bonderman D, Gharehbaghi Schnell E, et al. Mechanisms underlying aortic dilatation in congenital aortic valve malformation. *Circulation.* 99: 2138–43, 1999.
- Boyer S, Montagutelli X, Gomes D, Simon Chazottes D, Guenet JL, Dupouey P. Recent evolutionary origin of the expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lens epithelial cells. A molecular and genetic analysis of various mouse species. *Brain Res Mol Brain Res.* 10: 159–66, 1991.
- Braun Menendez E, Page IH. Suggested revision of nomenclature: Angiotensin. *Science.* 127: 242, 1958.
- Brenner BM, Ballermann BJ, Gunning ME, Zeidel ML. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiological Rev.* 70(3): 665-699, 1990.

- Brenner M, Kisseberth WC, Su Y, Besnard F, Messing A. GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci.* (3 Pt 1):1030-7, 1994.
- Budka H. Non-gial specificities of immunocytochemistry for the glial fibrillary acidic protein (GFAP). Triple expression of GFAP, vimentin and cytokeratins in papillary meningioma and metastasizing renal carcinoma. *Acta Neuropathol.* 72: 43–54, 1986.
- Bunnemann B, Fuxe K, Metzger R, Mullins J, Jackson TR, Hanley MR, Ganten D. Autoradiographic localization of mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. *Neurosci Lett.* 114: 147–153, 1990.
- Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 257: H324–H329, 1989.
- Campagnole-Santos MJ, Heringer SB, Batista EN, Khosla MC, Santos RA. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensinpeptides. *Am J Physiol.* 263: R89–R94, 1992.
- Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM: Effects of converting enzyme inhibitors on angiotensin and bradykinin peptides. *Hypertension.* 23:439 – 449, 1994.
- Cannone V, Boerrigter G, Cataliotti A, Costello-Boerrigter LC, Olson TM, McKie PM, Heublein DM, Lahr BD, Bailey KR, Averna MR, Redfield MM, Rodeheffer RJ, Burnett JC Jr. A genetic variant of the atrial natriuretic peptide gene is associated with cardiometabolic protection in the general community. *J Am Coll Cardiol.* 58(6): 629-36, 2011.
- Cannone V, Cefalu AB, Noto D, Scott CG, Bailey KR, Cavera G, Pagano M, Sapienza M, Averna MR, Burnett JC Jr. The atrial natriuretic peptide genetic variant rs5068 is associated with a favorable cardiometabolic phenotype in a Mediterranean population. *Diabetes Care.* 36(9): 2850-6, 2013.
- Cerrato BD, Frasch AP, Nakagawa P, Longo-Carbajosa N, Peña, C, Höcht C, Gironacci MM. Angiotensin-(1–7) upregulates central nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 1453: 1–7, 2012.
- Chai SY, Mendelsohn FAO, and Paxinos G. Angiotensin converting enzyme in rat brain visualized by quantitative in vitro autoradiography. *Neuroscience.* 20: 615–627, 1987.
- Chan KH, Chen YH, Zhang Y, Wong YH, Dun NJ. Angiotensin-[1-12] interacts with angiotensin type I receptors. *Neuropharmacology, Elsevier Ltd.* 1–7, 2013.
- Chappell MC, Brosnihan KB, Diz DI, Ferrario CM. Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J Biol Chem.* 264: 16518–16523, 1989.
- Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension.* (1 Pt 2):362-7, 1998.

- Chaves GZ, Caligiorne SM, Santos RA, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ. Modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin-(1-7) at the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 18: 1841– 1848, 2000.
- Chen S, Rio C, Ji RR, Dikkes P, Coggeshall RE, Woolf CJ, Corfas G. Disruption of ErbB receptor signaling in adult non-myelinating Schwann cells causes progressive sensory loss. *Nat. Neurosci.* 6:1186–1193, 2003.
- Condorelli DF, dell'albani P, Conticello, SG, Barresi V, Nicoletti VG, Caruso A, Kahn M, Vacanti M, Albanese V, DE Vellis J. A neuralspecific hypomethylated domain in the 5' flanking region of the glial fibrillary acidic protein gene. *Dev Neurosci.* 9: 446–456, 1997.
- Costa AC, Becker LK, Moraes ER, Romero TR, Guzzo L, Santos RA, Duarte ID. Angiotensin-(1-7) induces peripheral antinociception through mas receptor activation in an opioid-independent pathway. *Pharmacology.* 89: 137–44, 2012.
- Dagenais NJ, Jamali F. Protective effects of angiotensin II interruption: evidence for antiinflammatory actions. *Pharmacotherapy.* 25: 1213–1229, 2005.
- Danser AH: Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int J Biochem Cell Biol.* 35: 759-768, 2003.
- Deschepper CF, Bouhnik J, Ganong WF. Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. *Brain Research.* 374: 195–198, 1986.
- Dietz, JR. The effect of angiotensin II and ADH on the secretion of atrial natriuretic factor. *Proc Soc Exp Biol Med.* 187(3):366-9, 1988.
- DiMicco JA, Stotz-potter EH, Monroe AJ, Morin SM. Role of the dorsomedial hypothalamus in the cardiovascular response to stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 23(2): 171-6, 1996.
- Diz DI, Garcia-Espinosa MA, Gallagher PE, Ganten D, Ferrario CM, Averill DB. Angiotensin-(1-7) and baroreflex function in nucleus tractus solitarii of (mRen2)²⁷ transgenic rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 51: 542–548, 2008a.
- Diz DI, Garcia-Espinosa MA, Gegick S, Tommasi EN, Ferrario CM, Tallant AE, Chappell MC, Gallagher PE. Injections of angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor MLN4760 into nucleus tractus solitarii reduce baroreceptor reflex sensitivity for heart rate control in rats. *Exp Physiol.* 93:694–700, 2008b.
- Dobruch J, Paczwa P, Lon S, Khosla MC, Szzepanska-sadowska E. Hypotensive function of the brain angiotensin-(1-7) in Sprague-Dawley and renin transgenic rats. *J Physiol Pharm.* 54(3): 371-381, 2003.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison k, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 87:e1-e9, 2000.

- Doobay MF, Talman LS, Obr TD, Tian X, Davisson RL, Lazartigues E. Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292: R373–R381, 2007.
- Etelvino GM, Peluso AAB, Santos RAS. "New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D." *Current hypertension reports* 16(6): 1-6, 2014.
- Felix D, Khosla MC, Barnes KL, Imboden H, Montani B, Ferrario CM. Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 17: 1111-1114, 1991.
- Feng Y, Xia H, Cai Y, Halabi CM, Becker LK, Santos RA, Speth RC, Sigmund CD, Lazartigues E. Brain-selective overexpression of human angiotensin-converting enzyme type 2 attenuates neurogenic hypertension. *Circ Res.* 106: 373–382, 2010.
- Feng Y. ANG II-independent prorenin/(pro)renin receptor signaling pathways in the central nervous system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309: H731–H733, 2015.
- Ferrario CM, Ahmad S, Nagata S, Simington SW, Varagic J, Kon N, Dell'italia LJ. An evolving story of angiotensin-II-forming pathways in rodents and humans. *Clin Sci (Lond).* 126: 461–469, 2014.
- Ferrario CM, Dickinso CJ, Mccubbin JW. Central vasomotor stimulation by angiotensin. *Clin Sci.* 39: 239–245, 1970.
- Ferreira PM, Alzamora AC, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Hemodynamic effect produced by microinjection of angiotensins at the caudal ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience.* 151:1208–1216, 2008.
- Ferreira PM, Xavier CH, Alzamora AC, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Differential control of vasomotion by angiotensins in the rostral ventrolateral medulla of hypertensive rats. *Neuropeptides.* 53: 11–18, 2015.
- Fields KL, Yen SH. A subset of Schwann cells in peripheral nerves contain a 50-kDa protein antigenically related to astrocyte intermediate filaments. *J Neuroimmunol.* 8: 311–30, 1985.
- Fischer-Ferraro, C, Nahmod VE, Goldstein DJ, Finkielman S. Angiotensin and renin in rat and dog brain. *J Exp Med.* 133(2): 353–361, 1971.
- Fitzsimons JT. The effect on drinking of peptide precursors and of shorter chain peptide fragments of angiotensin II injected into the rat's diencephalon. *J Physiol* 214: 295–303, 1971.
- Flores-munoz M, Work LM, Douglas K, Denby L, Dominiczak AF, Graham D, Nicklin SA.. Angiotensin-(1-9) Attenuates Cardiac Fibrosis in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat via the Angiotensin Type 2 Receptor. *Hypertension.* 59: 300-307, 2012.
- Fontes MA, Baltatu O, Caligiorne SM, Campagnole-Santos MJ, Ganten D, Bader M, Santos RA. Angiotensin peptides acting at rostral ventrolateral medulla contribute to hypertension of TGR(mREN2)27 rats. *Physiol Genomics.* 2: 137–142, 2000.

- Fontes MA, Martins Pinge MC, Naves V, Campagnole-Santos MJ, Lopes OU, Khosla MC, Santos RA. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. *Brain Res.* 750: 305–310, 1997.
- Fontes MA, Silva LC, Campagnole-Santos MJ, Khosla MC, Guertzenstein PG, Santos RA. Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors. *Brain Res.* 665:175–180, 1994.
- Freund M, Walther T, von Bohlen und Halbach O. Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas in the murine forebrain. *Cell Tissue Res.* 348: 29–35, 2012.
- Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine.* 264: 224–236, 2008.
- Galou M, Pournin S, Ensergueix D, Ridet JL, Tchélingérien JL, Lossouarn L, Privat A, Babinet C, Dupouey P. Normal and pathological expression of GFAP promoter elements in transgenic mice. *Glia.* 12(4): 281-93, 1994.
- Ganten D, Marquez-Julio A, Granger P, Hayduk K, Karsunky KP, Boucher R, Genest J. Renin in dog brain. *Am J Physiol* 221: 1733–1737, 1971b.
- Ganten D, Minnich JL, Granger P, Hayduk K, Brecht HM, Barbeau A, Boucher R, Genest J. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science* 173: 64–65, 1971a.
- Garcia-Espinosa MA, Shaltout HA, Gallagher PE, Chappell MC, Diz DI. In vivo expression of angiotensin-(1-7) lowers blood pressure and improves baroreflex function in transgenic (mRen2)27 rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 60(2): 150-7, 2012.
- Gard AL, White FP, Dutton GR. Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. *J Neuroimmunol.* 8: 359–75, 1985.
- Georgiev V, Stancheva S, Kambourova T, Getova D. Effect of angiotensin II on the Vogel conflict paradigm and on the content of dopamine and noradrenaline in rat brain. *Acta Physiol Pharmacol Bulg.* 16(1): 32–7, 1990.
- Gervais M, Demolis SP, Domerg V, Lesage M, Richer C, Giudicelli JF. Systemic and regional hemodynamics assessment in rats with fluorescent microspheres. *J Cardiovasc Pharmacol.* 33: 425–432, 1999.
- Giardina WJ, Ebert DM. Positive effects of captopril in the behavioral despair swim test. *Biol Psychiatry.* 25: 697–702, 1989.
- Gironacci MM, Longo Carbajosa NA, Goldstein J, Cerrato BD. Neuromodulatory role of angiotensin-(1–7) in the central nervous system. *Clinical Science.* 125: 57–65, 2013.
- Gironacci MM, Valera MS, Yujnovsky I, Peña C. Angiotensin-(1–7) inhibitory mechanism of norepinephrine release in hypertensive rats. *Hypertension.* 44: 783–787, 2004.

- Gironacci MM, Vatta M, Rodriguez-Fermepin M, Fernandez BE, Peñna C. Angiotensin-(1-7) reduces norepinephrine release through a nitric oxide mechanism in rat hypothalamus. *Hypertension*. 35: 1248–1252, 2000.
- Glenny RW, Bernard S, AND Brinkley M. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol*. 74: 2585–2597, 1993.
- Guimaraes PS, Oliveira MF, Braga JF, Nadu AP, Schreihofe, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Increasing angiotensin-(1-7) levels in the brain attenuates metabolic syndrome-related risks in fructose-fed rats. *Hypertension*. 63: 1078-1085, 2014.
- Guimaraes PS, Santiago NM, Xavier CH, Velloso EP, Fontes MAP, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. 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*. 303: H393–H400, 2012.
- Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, Mccann SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:11704–11709, 1997.
- Habiyakare B, Alsaadon H, Mathai ML, Hayes A, Zulli A. Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). *Int J Exp Pathol*. 95(4):290-5, 2014.
- Hainfellner JA, o Voigtländer T, o Ströbel T, o Mazal PR, o Maddalena AS, o Aguzzi A, o Budka H. Os fibroblastos podem expressar a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol*. 60(5): 449-61, 2001.
- Han Y, Sun HJ, Li P, Gao Q, Zhou YB, Zhang F, Gao XY, Zhu GQ. Angiotensin-(1-7) in paraventricular nucleus modulates sympathetic activity and cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. *PLoS One*. 7: e48966, 2012.
- Hellner K, Walther T, Schubert M, Albrecht D. Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-proteincoupled receptor Mas. *Mol Cell Neurosci*. 29: 427–435, 2005.
- Helmer OM. Differentiation between two forms of angiotenin by means of spirally cut strips of rabbit aorta. *Am J Physiol*. 188(3): 571-7, 1957.
- Herichova I, Szantoova K. Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocr Regul*. 47(1): 39-52, 2013.
- Höcht C, Gironacci MM, Mayer MA, Schuman M, Bertera FM, Taira CA. Involvement of angiotensin-(1-7) in the hypothalamic hypotensive effect of captopril in sinoaortic denervated rats. *Regul Pept*. 146: 58–66, 2008.
- Huber G, Schustera F, Raascha W. Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Pharmacological Research*. 125: 72–90, 2017.

- Huber MJ, Basu R, Cecchettini C, Cuadra AE, Chen QH, Shan Z. Activation of the (pro)renin receptor in the paraventricular nucleus increases sympathetic outflow in anesthetized rats. *Am J Physiol – Hear Circ Physiol.* H880–H887, 2015.
- Ichiki T, Burnett Jr JC. Atrial natriuretic peptide – Old but new therapeutic in cardiovascular diseases. *Circulation Journal.* 81: 913-919, 2017.
- Imaizumi T, Thames MD. Influence of intravenous and intracerebroventricular vasopressin on baroreflex control of renal nerve traffic. *Circ Res.* 58: 17-25, 1986.
- Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Tölle M, Karadogan S, Gobom J, Furkert J, Oksche A, Krause E, Tran TN, Tepel M, Schuchardt M, Schlüter H, Wiedon A, Beyermann M, Bader M,
- Todiras M, Zidek W, Jankowski J. Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 297–302, 2007.
- Jessen KR, Mirsky R. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature.* 286: 736–37, 1980.
- Jessen KR, Thorpe R, Mirsky R. Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: An immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *J Neurocytol.* 13: 187–200, 1984
- Jessup JA, Trask AJ, Chappell MC, Nagata S, Kato J, Kitamura K, et al. Localization of the novel angiotensin peptide, angiotensin-(1-12), in heart and kidney of hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294: H2614–8, 2008.
- Jiang T, Gao L, Shi J, Lu J, Wang H, Zhang Y. Angiotensin-(1–7) modulates renin-angiotensin system associated with reducing oxidative stress and attenuating neuronal apoptosis in the brain of hypertensive rats. *Pharmacol Res.* 67: 84–93, 2013.
- Jorgensen H, Riis M, Knigge U, Kjaer A, Warberg J. Serotonin receptors involved in vasopressin and oxytocin secretion. *J Neuroendocrinol.* 15(3): 242-9, 2003.
- Joy MD and Lowe RD. Evidence for a medullary site of action in the cardiovascular response to angiotensin II. *J Physiol.* 206: 41P–42P, 1970.
- Jung MW, Larson J. Further characteristics of long-term potentiation in piriform cortex. *Synapse.* 18:298–306, 1994.
- Kaiser FC, Palmer GC, Wallace AV, Carr RD, Fraser-Rae L, Hallam C. Antianxiety properties of the angiotensin II antagonist, DUP 753, in the rat using the elevated plus-maze. *Neuroreport.* 3: 922–4, 1992.
- Kaneko R, Sueoka N. Tissue-specific versus cell type-specific expression of the glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci.* 90(10): 4698-702, 1993.
- Kangussu LM, Almeida-Santos AF, Bader M, Alenina N, Fontes MAP, Santos RAS, Aguiar DC, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like

- behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Behavioural Brain Research*. 257:25–30, 2013.
- Kangussu LM, Almeida-Santos AF, Moreira FA, Fontes MAP, Santos RAS, Aguiar DC, Campagnole-Santos MJ. Reduced anxiety-like behavior in transgenic rats with chronically overproduction of angiotensin-(1–7): Role of the Mas receptor. *Behavioural Brain Research* 331: 193–198, 2017.
- Kangussu LM, Guimaraes PS, Nadu AP, Melo MB, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Activation of angiotensin-(1-7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Neuropharmacology*. 97:58-66, 2015.
- Kats JPV, Methot D, Paradis P, Silversides DW, Reudelhuber TL. Use of a Biological Peptide Pump to Study Chronic Peptide Hormone Action in Transgenic Mice. *The journal of biological chemistry*. 276(47): 44012-44017, 2001.
- Kepes JJ, Rubinstein LJ, Chiang H. The role of astrocytes in the formation of cartilage in gliomas. An immunohistochemical study of four cases. *Am J Pathol*. 117: 471–83, 1984.
- Klempin F, Mosienko V, Matthes S, Villela DC, Todiras M, Penninger JM, Bader M, Santos RAS, Alenina N. Depletion of angiotensin-converting enzyme 2 reduces brain serotonin and impairs the running-induced neurogenic response. *Cell Mol Life Sci*. 2018.
- Klusdens LD, Nelemans SA, Rink R, de Vries L, Meter-Arkema A, Wang Y, Walther T, Kuipers A, Moll GN, Haas M. Angiotensin-(1-7) with thioether bridge: an angiotensin-converting enzyme-resistant, potent angiotensin-(1-7) analog. *J Pharmacol Exp Ther*. 328: 849–854, 2009.
- Krob HA, Vinsant SL, Ferrario CM, Friedman DP. Angiotensin-(1-7) immunoreactivity in the hypothalamus of the (mRen-2d)27 transgenic rat. *Brain Res*. 798: 36–45, 1998.
- Kubo T, Amano M, Ishizuka T, Ozaki S. Beta-alanine and taurine microinjected into the rat caudal ventrolateral medulla increase blood pressure. *Clin Exp Hypertens*. 15: 585–597, 1993.
- Lautner Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, Jankowski J, Jankowski V, Sousa F, Alzamora A, Soares E, Barbosa C, Kjeldsen F, Oliveira A, Braga J, Savergnini S, Maia G, Peluso AB, Passos-Silva D, Ferreira A, Alves F, Martins A, Raizada M, Paula R, Motta-Santos D, Klempin F, Pimenta A, Alenina N, Sinisterra R, Bader M, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Discovery and Characterization of Alamandine: A Novel Component of the Renin-Angiotensin-system. *Circ Res*. 112: 1104-1111, 2013.
- Lavoie JL, Liu X, Bianco RA, Beltz TG, Johnson AK, Sigmund CD. Evidence supporting a functional role for intracellular renin in the brain. *Hypertension*. 47: 461–466, 2006.
- Lazaroni TL, Raslan AC, Fontes WR, de Oliveira ML, Bader M, Alenina N, Moraes FM, Santos RA, Pereira GS. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 97: 113–23, 2012.

- Lee Y, Messing A, Su M, Brenner M. GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia*. 56(5): 481-93, 2008.
- Li P, Sun HJ, Cui BP, Zhou YB, Han Y. Angiotensin-(1-7) in the rostral ventrolateral medulla modulates enhanced cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activation in renovascular hypertensive rats. *Hypertension*. 61: 820–827, 2013.
- Li P, Zhang F, Zhou YB, Cui BP, Han Y. Superoxide anions modulate the effects of angiotensin-(1-7) in the rostral ventrolateral medulla on cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activity in rats. *Neuroscience*. 223: 388–398, 2012.
- Lind RW, Swanson LW, Ganten D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. An immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 40: 2–24, 1985.
- Liu Y, Namba T, Liu J, Suzuki R, Shioda S, Seki T. Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus. *Neuroscience*. 166: 241-251, 2010.
- Marc Y, Llorens-Cortes C. The role of the brain renin–angiotensin system in hypertension: Implications for new treatment. *Progress in Neurobiology*. 95: 89-103, 2011.
- Marks LS, Maxwell MH: Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. *Hypertension* 4, 384-388, 1979.
- Mendelsohn FA, Chai SY, and Dunbar M. In vitro autoradiographic localization of angiotensin-converting enzyme in rat brain using 125I-labelled MK351A. *J Hypertens Suppl* 2: S41–S44, 1984.
- Menon P, Fisher EA. Immunostaining of Macrophages, Endothelial Cells, and Smooth Muscle Cells in the Atherosclerotic Mouse Aorta. *Methods Mol Biol*. 1339: 131-48, 2015.
- Method D, Kats JP, Lochard N, Tremblay F, Silversides DW, Reudelhuber TL. Development and Application of a biological peptide pump for the study of the *in vivo* actions of Angiotensin peptides. *American Journal of Hypertension*. 14: 38S-43S, 2001.
- Metzger R, Bader M, Ludwig T, Berberich C, Bunnemann B, Ganten D. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett* 357: 27–32, 1995.
- Michelini LC, Bonagamba LGH, Baroreceptor Reflex Modulation by Vasopressin Microinjected into the Nucleus Tractus Solitarii of Conscious Rats. *Hypertension*. 11 [Suppl I]: I-75-I-79, 1988.
- Morimoto S, Cassell MD, Beltz TG, Johnson AK, Davisson RL, Sigmund CD. Elevated blood pressure in transgenic mice with brain-specific expression of human angiotensinogen driven by the glial fibrillary acidic protein promoter. *Circ Res*. 89(4): 365-72, 2001.
- Morimoto S, Sigmund CD. Angiotensin mutant mice: a focus on the brain renin-angiotensin system. *Neuropeptides*. 36(2-3): 194-200, 2002.

- Mucke L, Oldshone MBA, Morris JC, Werenberg MI. Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-Lac Z transgene by local injury. *New Biol.* 3:465-474, 1991.
- Murphy DL, Andrews AM, Wichems QLiT, Greenberg. Brain serotonin neurotransmission: an overview and update with an emphasis on serotonin subsystem heterogeneity, multiple receptor, interactions with other neurotransmitter systems, and consequent implications for understanding the actions of serotonergic drugs. *Journal of Clinical Psychiatry* 59: 4-12, 1998.
- Nagata S, Kato J, Sasaki K, Minamino N, Eto T, Kitamura K. Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochem Biophys Res Commun.* 350:1026-31, 2006.
- Nakagaki T, Hirooka Y, Ito K, Kishi T, Hoka S, Sunagawa K. Role of angiotensin-(1-7) in rostral ventrolateral medulla in blood pressure regulation via sympathetic nerve activity in Wistar-Kyoto and spontaneous hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 33: 223-230, 2011.
- Nakatani Y, Brenner M, Freese E. An RNA polymerase II promoter containing sequences upstream and downstream from the RNA startpoint that direct initiation of transcription from the same site. *Proc Natl Acad Sci.* 87: 4289-4293, 1990.
- Nautiyal M, Shaltout HA, de Lima DC, do Nascimento K, Chappell MC, Diz DI. Central angiotensin-(1-7) improves vagal function independent of blood pressure in hypertensive (mRen2)27 rats. *Hypertension.* 60: 1257-1265, 2012.
- Newton-Cheh C, Larson MG, Vasan RS, Levy D, Bloch KD, Surti A, Guiducci C, Kathiresan S, Benjamin EJ, Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A, Blankenberg S, Kee F, Nilsson P, Yin X, Peltonen L, Vartiainen E, Salomaa V, Hirschhorn JN, Melander O, Wang TJ. Association of common variants in NPPA and NPPB with circulating natriuretic peptides and blood pressure. *Nat Genet.* 41(3): 348-53, 2009.
- Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest.* 109:1417-1427, 2002.
- Oliveira RC, Campagnole-santos MJ, Santos RAS. The pressor effect of angiotensin-(1-7) in the rat rostral ventrolateral medulla involves multiple peripheral mechanisms. *Clinics.* 68(2): 245-252, 2013.
- Osborn JW JR, Skeltons MM, Cowley AW JR. Hemodynamic effects of vasopressin compared with angiotensin II in conscious rats. *Am J Physiol.* 252: 628-637, 1987.
- Passos-Silva DG, Brandan E, Santos RAS. Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. *Trends Pharmacol Sci.* 36(5): 310-20, 2015.
- Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 86: 747-803, 2006.
- Paul M, Wagner D, Metzger R, Ganten D, Lang RE, Suzuki F, Murakami K, Burbach JHP, and Ludwig G. Quantification of renin mRNA in various mouse tissues by a novel solution hybridization assay. *J Hypertens.* 6: 247-252, 1988.

- Paxinos G e Watson C (2004). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set. 5th Edition. Academic Press/Elsevi.
- Peel AL, Klein RL. Adeno-associated virus vectors: activity and applications in the CNS. *J Neurosci Methods*. 98(2): 95-104, 2000.
- Pekcec A, Loscher W, Potschka H. Neurogenesis in the adult rat piriform cortex. *Neuro Report*. 17:571–574, 2006.
- Petrov T, Krukoff TL, Jhamandas JH. Chemically defined collateral projections from the pons to the central nucleus of the amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Cell Tissue Res*. 277, 289-295, 1994.
- Phillips MI, Sumners C, Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regul Pept*. 78:1–11, 1998.
- Phillips MI. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*. 49:413–435, 1987.
- Plunkett LM, Correa FM, and Saavedra JM. Quantitative autoradiographic determination of angiotensin-converting enzyme binding in rat pituitary and adrenal glands with 125I-351A, a specific inhibitor. *Regul Pept*. 12: 263–272, 1985.
- Qadri F, Wolf A, Waldmann T, Rascher W, Unger T. Sensitivity of hypothalamic paraventricular nucleus to C- and N-terminal angiotensin fragments: vasopressin release and drinking. *J Neuroendocrinol*. 10(4): 275-81, 1998.
- Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C, Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab*. 12:157–162, 2001.
- Reaux-Le Goazigo A, Iturrioz X, Fassot C, Claperon C, Roques BP, Llorens-Cortes C. Role of angiotensin III in hypertension. *Curr Hypertens*. Rep.7, 2005.
- Regenhardt RW, Desland F, Mecca AP, Pioquinto DJ, Afzal A, Mocco J, Sumners C. Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in ischemic stroke. *Neuropharmacology*. 71: 154–163, 2013.
- Regenhardt RW, Mecca AP, Desland F, Ritucci-Chinni PF, Ludin JA, Greenstein D, Banuelos C, Bizon JL, Reinhard MK, Sumners C. Centrally administered angiotensin-(1–7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol*. 99(2): 442–453, 2014.
- Resende MMD, Mill JG. Alternate Angiotensin II-Forming Pathways and Their Importance in Physiological or Physiopathological Conditions. *Arq Bras Cardiol*. 78, 2002.
- Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J*. 383: 45–51, 2004.

- Riol H, Tardy M, Rolland B, Levesque G, Murthy MR. Detection of the peripheral nervous system (PNS)-type glial fibrillary acidic protein (GFAP) and its mRNA in human lymphocytes. *J Neurosci Res*. 48: 53–62, 1997.
- Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessarar N, Richardson WD. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci*. 11:1392–1401, 2008.
- Sabrane K, Kruse MN, Fabritz L, Zetsche B, Mitko D, Skryabin BV, Zwieneer M, Baba HO, Yanagisawa M, Kuhn M. Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *J Clin Invest*. 115:1666–1674, 2005.
- Sakima A, Averill DB, Kasper SO, Jackson L, Ganten D, Ferrario CM, Gallagher PE, Diz DI. Baroreceptor reflex regulation in anesthetized transgenic rats with low glia-derived angiotensinogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292(3): H1412–9, 2007.
- Sampaio WO, Nascimento AAS, Santos RAS. Regulation of Cardiovascular Signaling by Kinins and Products of Similar Converting Enzyme Systems. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1–7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284: H1985–H1994, 2003.
- Santiago NM, Guimarães PS, Sirvente RA, Oliveira LAM, Irigoyen MC, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Lifetime overproduction of circulating angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension-induced cardiac dysfunction and remodeling. *Hypertension*. 55: 889–896, 2010.
- Santos DM, Marins FR, Limborço-Filho M, De Oliveira ML, Hamamoto D, Xavier CH, Moreira FA, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Fontes MAP. Chronic overexpression of angiotensin-(1-7) in rats reduces cardiac reactivity to acute stress and dampens anxious behavior. *Stress*. 2017.
- Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, Ferrario CM. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*. 11: I153–I157, 1988.
- Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Baracho NC, Fontes MA, Silva LC, Neves LA, Oliveira DR, Caligiorne SM, Rodrigues AR, Gropen Júnior C. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull*. 35: 293–298, 1994.
- Santos RAS, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga ANG, Almeida AP, Campagnole-Santos MJ, Baltatu O, Iliescu R, Reudelhuber TL, Bader M. Expression of an angiotensin-(1-7) producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiology Genomics*. 17: 292–299, 2004.
- Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, Campagnole-Santos MJ. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas axis of the renin-angiotensin system: focus on angiotensin-(1-7). *Physiol Rev*. 98: 505–553, 2018.
- Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ,

- Schultheiss HP, Speth R, Walther T.. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein coupled receptor Mas. *PNAS*. 100(14): 8258–8263, 2003.
- Sasaki S and Dampney RAL. Tonic cardiovascular effects of angiotensin II in the ventrolateral medulla. *Hypertension* 15: 274–283, 1990.
- Schelling P, Hutchinson JS, Ganten U, Sponer G, and Ganten D. Impermeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier for angiotensin II in rats. *Clin Sci Mol Med*. 51: 399s–402s, 1976.
- Schiavone MT, Santos RAS, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Nat Acad Sci*. USA 85: 4095-4098, 1988.
- Schinke M, Baltatu O, Böhm M, Peters J, Rascher W, Bricca G, Lippoldt A, Ganten D, Bader M. Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci*. 96(7): 3975-80, 1999.
- Sesoko S, Muratani H, Takishita S, Teruya H, Kawazoe N, and Fukiyama K. Modulation of the baroreflex function by angiotensin II endogenous to the caudal ventrolateral medulla. *Brain Res* 671: 38–44, 1995.
- Shinohara K, Liu X, Morgan DA, Davis DR, Sequeira-Lopez MLS, Cassell MD, Grobe JL, Rahmouni K, Sigmund CD. Selective deletion of the brain-specific isoform of renin causes neurogenic hypertension. *Hypertension*. 68:1385–1392, 2016.
- Silva AQ, Fontes MA, Kanagy NL. Chronic infusion of angiotensin receptor antagonists in the hypothalamic paraventricular nucleus prevents hypertension in a rat model of sleep apnea. *Brain Res*. 1368: 231–238, 2011.
- Silva AQ, Santos RA, Fontes MA. Blockade of endogenous angiotensin-(1–7) in the hypothalamic paraventricular nucleus reduces renal sympathetic tone. *Hypertension*. 46: 341–348, 2005.
- Silva DM, Vianna HR, Cortes SF, Campagnole-Santos MJ, Santos RA, Lemos VS. Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. *Peptides*. 28: 702–707, 2007.
- Silva LCS, Fontes MAP, Campagnole MJ, Khosla MC, Campos JR RR, Guertzenstein PG, Santos RAS. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. *Brain Res*. 613:321-325, 1993.
- Sirett NE, McLean AS, Bray JJ, Hubbard JJ. Distribution of angiotensin II receptors in rat brain. *Brain Res*. 122(2): 299-312, 1977.
- Skeggs Jr LT, Marsh WH, Kahn JR, Shumway PN. The existence of two forms of hypertension. *J Exp Med*. 99(3), 1954.
- Soares ER, Barbosa CM, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS, Alzamora AC. Hypotensive effect induced by microinjection of Alamandine, a derivative of angiotensin-(1-7), into caudal ventrolateral medulla of 2K1C hypertensive rats. *Peptides*. 96:67-75, 2017.

- Soltani H, Javanmardi K, Kouhpayeh A, Baharamali E, Farjam M. Differences in Cardiovascular Responses to Alamandine in Two-Kidney, One Clip Hypertensive and Normotensive Rats. *Circ J*. 81(3):405-412, 2017.
- Song L, Wilk S, Healy DP. Aminopeptidase A antiserum inhibits intracerebroventricular angiotensin II-induced dipsogenic and pressor responses. *Brain Res*. 744:1–6, 1997.
- Stornetta RL, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG, Lynch KR. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science*. 242: 1444–1446, 1988.
- Stragier B, Hristova I, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. In vivo characterization of the angiotensin-(1–7) induced dopamine and c-aminobutyric acid release in the striatum of the rat. *European Journal of Neuroscience*. 22: 658–664, 2005.
- Strittmatter SM, Lo MMS, Javitch JA, and Snyder SH. Autoradiographic visualization of angiotensin-converting enzyme in rat brain with [³H]captopril: localization to a striatonigral pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1599–1603, 1984.
- Su M, Hu H, Lee Y, D'azzo A, Messing A, Brenner M. Expression Specificity of GFAP Transgenes. *Neurochemical Research*. 29(11): 2075-2093, 2004.
- Suarez-Mier GB, Buckwalter MS. Glial Fibrillary Acidic Protein-Expressing Glia in the Mouse Lung. *ASN Neuro*. 7(5), 2015.
- Sun HJ, Li P, Chen WW, Xiong XQ, Han Y. Angiotensin II and angiotensin-(1-7) in paraventricular nucleus modulate cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. *PLoS One*. 7: e52557, 2012.
- Tada M, Fukamizu A, Seo MS, Takahashi S, and Murakami K. Renin expression in the kidney and brain is reciprocally controlled by captopril. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 1065–1071, 1989.
- Thompson MR, Callaghan PD, Hunt GE, Cornish JL, McGregor IS. A role for oxytocin and 5-HT(1A) receptors in the prosocial effects of 3,4 methylenedioxymethamphetamine. *Neuroscience*. 146(2): 509-14, 2007.
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 275(43): 33238-33243, 2000.
- Tonnesen M, Klempner M, Austen K, Wintroub B. Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G. *J Clin Invest*. 69(1):25-30, 1982.
- Van Oosterhout MFM, Willigers HMM, Reneman RS, Prinzen FW. Fluorescent microspheres to measure organ perfusion: validation of a simplified sample processing technique. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 269: H725–H733, 1995.
- Van Thiel BS, Martini AG, Riet L, Severs D, Uijl E, Garrelds IM, Leijten FPJ, Van Der Pluijm I, Essers J, Qadri F, Alenina N, Bader M, Paulis L, Rajkovicova R, Domenig O, Poglitsch M, Danser AHJ. Brain renin–angiotensin system –does it exist? *Hypertension*. 69: 1136–1144, 2017.

- Viale G, Gambacorta M, Coggi G, Dell'Orto P, Milani M, Doglioni C. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in normal and diseased human breast. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 418: 339–48, 1991.
- Vinsant S, Chappell MC, Ferrario CM, Ganten D, Diz DI. Low glial angiotensinogen is not associated with deficits in angiotensin peptides in neuronal pathways in transgenic ASrAogen rats (Abstract). *FASEB J* 19:A1188, 2005.
- Voigta JP, Hortnaglb H, Rex A, Hove LV, Bader M, Fink H. Brain angiotensin and anxiety-related behavior: The transgenic rat TGR(ASrAOGEN)680. *Brain Res.* 1046:145 – 156, 2005.
- Volicer L and Loew CG. Penetration of angiotensin II into the brain. *Neuropharmacology* 10: 631–636, 1971.
- Von Bohlen und Halbach O, Walther T, Bader M, Albrecht D. Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala. *J Neurophysiol.* 83: 2012–2021, 2000.
- Walther T, Voigt JP, Fink H, Bader M. Sex specific behavioural alterations in Mas-deficient mice. *Behav Brain Res* 107: 105–9, 2000.
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science.* 299(5603): 76, 2003.
- Walther T, Balschun D, Voigt JP, Fink H, Zuschratter W, Birchmeier C, Ganten D, Bader M. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem.* 273: 11867–11873, 1998.
- Wang HD, Johns DG, Xu S, Cohen RA. Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II. *Am J Physiol.* 282: H1697–H702, 2002.
- Wang J, Peng YJ, Zhu DN. Amino acids modulate the hypotensive effect of angiotensin-(1–7) at the caudal ventrolateral medulla in rats. *Regul Pept.* 129: 1–7, 2005.
- Wang XL, Iwanami J, Min LJ, Tsukuda K, Nakaoka H, Bai HY, Shan BS, Kan-No H, Kukida M, Chisaka T, Yamauchi T, Higaki A, Mogi M, Horiuchi M. Deficiency of angiotensin-converting enzyme 2 causes deterioration of cognitive function. *NPJ Aging Mech Dis.* 2:16024, 2016.
- Webb RL, Osborn JW JR, Cowley AW JR. Cardiovascular actions of vasopressin: baroreflex modulation in the conscious rat. *Am J Physiol.* 251: 1244–1251, 1986.
- Wintroub BU, Schechter NB, Lazarus GS, Kaempfer CE, Schwartz LB. Angiotensin I conversion by human and rat chymotryptic proteinases. *J Invest Dermatol.* 83(5):336-9, 1984.
- Wright JW, Tamura-Myers E, Wilson WL, Roques BP, Llorens-Cortes C, Speth RC, Harding JW, Conversion of brain angiotensin II to angiotensin III is critical for pressor response in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284: R725–R733, 2003.

- Xing J, Kong J, Lu J, Li J. Angiotensin-(1-7) inhibits neuronal activity of dorso lateral periaqueductal gray via a nitric oxide pathway. *Neurosci Lett.* 522: 156–61, 2012.
- Yamazato M, Yamazato Y, Sun C, Diez-Freire C, Raizada MK. Overexpression of angiotensin-converting enzyme 2 in the rostral ventrolateral medulla causes longterm decrease in blood pressure in the spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 49: 926–931, 2007.
- Yang HY, Erdös EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta.* 214(2): 374-6, 1970.
- Yang R, Smolders I, Vanderheyden P, Demaegdt H, Van Eeckhaut A, Vauquelin G, Lukaszuk A, Tourwé D, Chai SY, Albiston AL, Nahmias C, Walther T, Dupont AG. Pressor and renal hemodynamic effects of the novel angiotensin A peptide are angiotensin II type 1A receptor dependent. *Hypertension.* 57: 956–64, 2011a.
- Yang RF, Yin JX, Li YL, Zimmerman MC, Schultz HD. Angiotensin-(1–7) increases neuronal potassium current via a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300: C58–C64, 2011b.
- Zhang Y, Schlachetzki F, Zhang YF, Boado RJ, Pardridge WM. Normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism with intravenous nonviral gene therapy and a brain-specific promoter. *Hum Gene Ther.* 15(4): 339-50, 2004.
- Zheng H, Liu X, Patel KP. Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression improves central nitric oxide-mediated sympathetic outflow in chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301: H2402–H2412, 2011.
- Zhou L, Shi Z, Gao J, Han Y, Yuan N, Gao X, Zhu G. Angiotensin-(1–7) and angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla modulate the cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activity in rats. *Pflugers Arch.* 459: 681–688, 2010.
- Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 11968–11973, 1996.

VIII ANEXOS

7.1 Anexo I

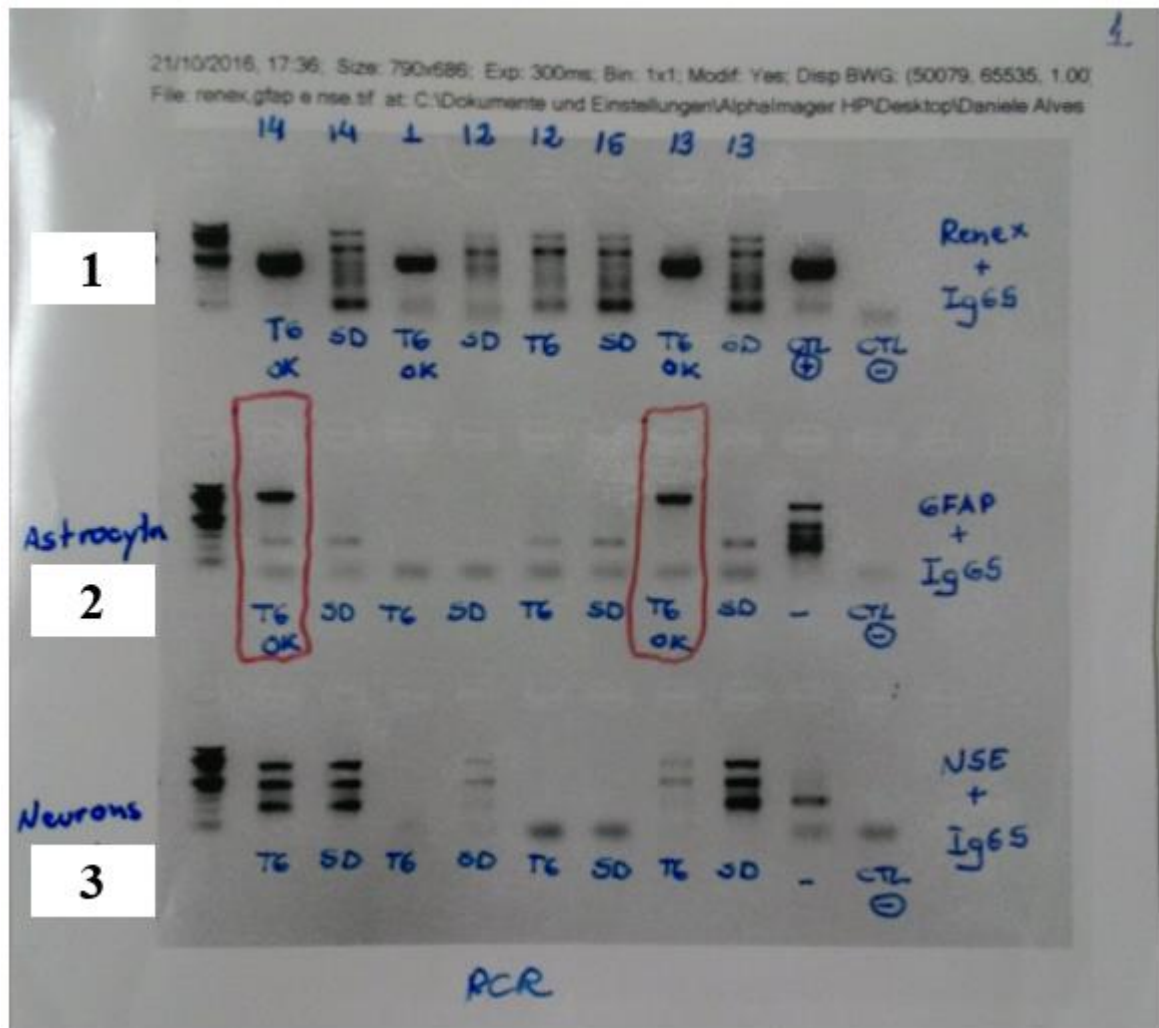


Imagem de gel representativa da expressão do DNA genômico do promotor GFAP por PCR.

Imagem de gel mostrando os fragmentos de $\cong 800$ bp obtido por PCR utilizando par de primers para as sequências (1) hRENEX/IG5 genotipagem, (2) IG5/hGFAP promotor glial e (3) IG5/NSE promotor neuronal a partir do DNA genômico da cauda de animais SD e TGR(A1-7)7371. O retângulo vertical desenhado em (2) representa o promotor GFAP glial nos animais TGR(A1-7)7371. TG – ratos transgênicos, TGR(A1-7)7371; SD – ratos sprague dawley, controle; CTL – controle positivo e controle negativo com água.

7.2 Anexo II

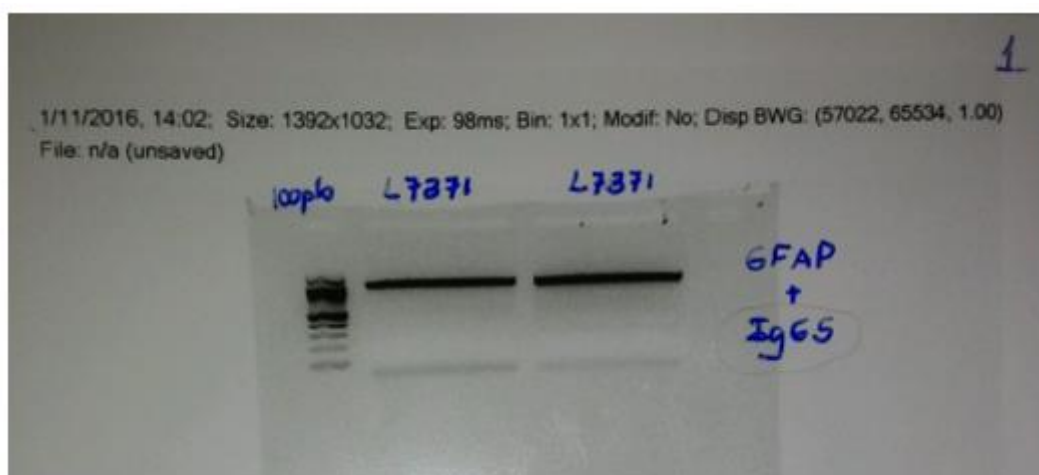


Imagem de gel representativa da expressão do DNA genômico do promotor GFAP por PCR.

Imagem de gel mostrando os fragmentos de $\cong 800$ bp obtido por PCR utilizando par de primers para a sequência IG5/hGFAP a partir do DNA genômico da cauda de animais TGR(A1-7)7371 (amostras 13 e 14 do Anexo I representadas por um retângulo).

7.2.1 Sequenciamento IG5/hGFAP

As bandas de fragmentos de DNA ilustradas no gel acima dos animais TGR(A1-7)7371 (amostras 13 e 14 do Anexo I) foram extraídas do gel e um pool dessas amostras foi sequenciado (2 e 4) e comparado ao sequenciamento dos “primers” padrões (1 e 3) identificando o promotor GFAP e a porção IG5 (IgG2b).

1) hGFAP - Padrão

```
GGTTGGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCTGCTCGCGGGGATCCTCTAGCGTTTAAAC
TTAAGCTTGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTT
TTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTTGTTT
AGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACCATGTACCCTCATGATAATTTTGTTTCTTTC
ACTTTCTACTCTGTTGACACCACCATATTGTCGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC
ATAACCTTATGTATCATAACATACGATTTAGGTGACACTATAGAACTCGAGCTAGA
GCCGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACATAAAATGCA
GTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATT
ATAAGCTGCAATAAACAAGTTAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGCATGCTAG
GGGTGGATGTATACGCGGTTCGCGTTTAGTGCGTACGCGAGATCTGGGACCAAGCCT
GGCCATGTCCACACCTCGTTCCTTCAGGCTTCTCGGATTGAGGGCATTCTCTTGAGG
AAGATCCGTTTAAAGGTGGTGGTGTCTGTCTGGGAGAGGCCTACCCGGAGACCGGGA
```

GATGGTCTTCTTCAGGTAGTAATTTTTTCAGACCCTCGTGTCTCACGTTGCATGAGAA
GGAATCTGTTTTCTCCCCTTGCTTGTTTTTCATATTGAGCTTGCTATATATGAAGTAA
GAACCGTCAGAGTCCAGGACTGGTGCGGTGTCCTTGTAGTTCTCCTCTGTATGCCCA
TTGCTGGTCCACTCCACACTGATGTCTCCAGGGTTGAAGCCCACGACCAGGCAAGTG
AGACTGACATCTTTCCTGGACAACCTGCTCTGCTGGTGGCGGCAAGATGTATACTTGT
GGAGCTCTGACTAGCCCTTTAATTTTTG

2) hGFAP – sequenciamento de fragmentos de DNA dos animais TGR(A1-7)7371

GGTTGGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCTGCTCGCGGGGATCCTCTAGCGTTTAAAC
TTAAGCTTGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTT
TTTCGCTATTGTAATAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTTCAGGGTGTTGTTT
AGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACCATGTACCCTCATGATAATTTTGTTTCTTTC
ACTTCTACTCTGTTGACACCACCATATTGTCGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC
ATAACCTTATGTATCATAACATACGATTTAGGTGACACTATAGAACTCGAGCTAGA
GCCGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAAAATGCA
GTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATT
ATAAGCTGCAATAAACAAGTTAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGCATGCTAG
GGGTGGATGTATACGCGGTTCGCTTTAGTGCGTACGCGAGATCTGGGACCAAGCCT
GGCCATGTCCACACCTCGTTCCTTCAGGCTTTCCTCGGATTGAGGGCATTCTCTTGAGG
AAGATCCGTTTAAAGGTGGTGGTGTCTGTCGGGAGAGGCCTACCCGGAGACCGGGA
GATGGTCTTCTTCAGGTAGTAATTTTTTCAGACCCTCGTGTCTCACGTTGCATGAGAA
GGAATCTGTTTTCTCCCCTTGCTTGTTTTTCATATTGAGCTTGCTATATATGAAGTAA
GAACCGTCAGAGTCCAGGACTGGTGCGGTGTCCTTGTAGTTCTCCTCTGTATGCCCA
TTGCTGGTCCACTCCACACTGATGTCTCCAGGGTTGAAGCCCACGACCAGGCAAGTG
AGACTGACATCTTTCCTGGACAACCTGCTCTGCTGGTGGCGGCAAGATGTATACTTGT
GGAGCTCTGACTAGCCCTTTAATTTTT

3) IG5 - Padrão

GTATACATCTTGCCGCCACCAGCAGAGCAGTTGTCCAGGAAAGATGTCAGTCTCACT
TGCTTGGTTCGTGGGCTTCAACCCTGGAGACATCAGTGTGGAGTGGACCAGCAATGG
GCATACAGAGGAGAACTACAAGGACACCGCACCAGTCCTGGACTCTGACGGTTCTT
ACTTCATATATAGCAAGCTCAATATGAAAACAAGCAAGTGGGAGAAAACAGATTCC
TTCTCATGCAACGTGAGACACGAGGGTCTGAAAAATTAACCTGAAGAAGACCAT
CTCCCGGTCTCCGGGTAGGCCTCTCCCGACAGACACCACCACCTTTAAACGGATCTT
CCTCAAGAGAATGCCCTCAATCCGAGAAAGCCTGAAGGAACGAGGTGTGGACATGG
CCAGGCTTGGTCCAGATCTCGCGTACGCACTAAACGCGACCGCGTATACATCCACC
CCTAGCATGCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTA
TAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTC
ACTGCATTTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGCGGC
TCTAGCTCGAGTTCTATAGTGTACCTAAATCGTATGTGTATGATACATAAGGTTAT
GTATTAATTGTAGCCGCTTCTAACGACAATATGGTGGTGTCAACAGAGTAGAAAGT

GAAAGAAACAAAATTATCATGAGGGTACATGGTGATACAAGGGACATCTTCCCATT
CTAAACAACACCCTGAAAACCTTTGCCCCCTCCATATAACATGAATTTTACAATAGCG
AAAAAGAAAGAACAATCAAGGGTCCCCAACTCACCCCTGAAGTTCTCAGGATCAAG
CTTAAGTTTAAACGCTAGAGGATCCCCGCGAGCAGCGGAAGGTGATGCGTCTCCTCT
CCAACCTGCTCTGGNTCTGCTCGCTCCTGGG

4) IG5 – sequenciamento de fragmentos de DNA dos animais TGR(A1-7)7371

GTATACATCTTGCCGCCACCAGCAGAGCAGTTGTCCAGGAAAGATGTCAGTCTCACT
TGCCTGGTTCGTGGGCTTCAACCCTGGAGACATCAGTGTGGAGTGGACCAGCAATGG
GCATACAGAGGAGAACTACAAGGACACCGCACCCAGTCCTGGACTCTGACGGTTCTT
ACTTCATATATAGCAAGCTCAATATGAAAACAAGCAAGTGGGAGAAAACAGATTCC
TTCTCATGCAACGTGAGACACGAGGGTCTGAAAAATTACTACCTGAAGAAGACCAT
CTCCCGGTCTCCGGGTAGGCCTCTCCCGACAGACACCACCACCTTTAAACGGATCTT
CCTCAAGAGAATGCCCTCAATCCGAGAAAGCCTGAAGGAACGAGGTGTGGACATGG
CCAGGCTTGGTCCCAGATCTCGCGTACGCACTAAACGCGACCGCGTATACATCCACC
CCTAGCATGCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTA
TAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTC
ACTGCATTTTAGNTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGCGG
CTCTAGCTCGAGTTCTATAGTGTACCTAAATCGTATGTGTATGATACATAAGGTTA
TGTATTAATTGTAGCCGCGTTCTAACGACAATATGGTGGTGTCAACAGAGTAGAAAG
TGAAAGAAACAAAATTATCATGAGGGTACATGGTGATACAAGGGACATCTTCCCAT
TCTAAACAACACCCTGAAAACCTTTGCCCCCTCCATATAACATGAATTTTACAATAGC
GAAAAAGAAAGAACAATCAAGGGTCCCCAACTCACCCCTGAAGTTCTCAGGATCAA
GCTTAAGTTTAAACGCTAGAGGATCCCCGCGAGCAGCGGAAGGTGATGCGTCTCCT
CTCCAACCTGCTCTGGCTCTGCTCGCTCCTGGG

7.3 Anexo III

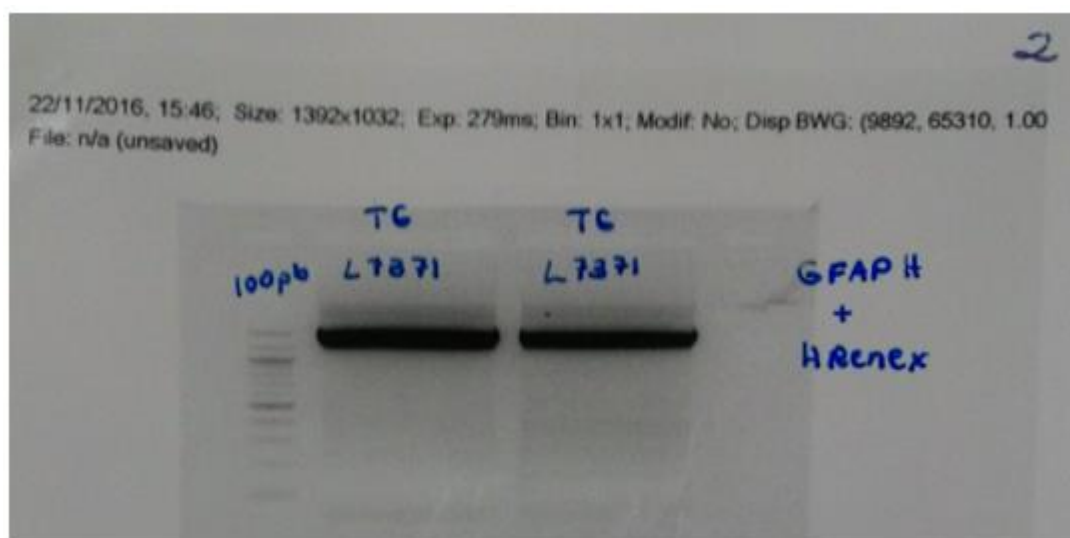


Imagem de gel representativa da expressão do DNA genômico do promotor GFAP por PCR.

Imagem de gel mostrando os fragmentos de $\cong 800$ bp obtido por PCR utilizando par de primers para a sequência hRENEX/hGFAP (1) a partir do DNA genômico da cauda de animais TGR(A1-7)7371 (amostras 13 e 14 do Anexo I representadas por um retângulo).

7.3.1 Sequenciamento hRENEX/hGFAP (1)

As bandas de fragmentos de DNA ilustradas no gel acima dos animais TGR(A1-7)7371 (amostras 13 e 14 do Anexo I) foram extraídas do gel e um pool dessas amostras foi sequenciado (2 e 4) e comparado ao sequenciamento dos “primers” padrões (1 e 3) identificando o promotor GFAP e a porção hRENEX.

1) hGFAP – Padrão

```
GGTTGGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCTGCTCGCGGGGATCCTCTAGCGTTTAAAC
TTAAGCTTGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTT
TTTCGCTATTGTAAAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTTGTTT
AGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATCACCATGGACCCTCATGATAATTTTGTTCCTTTC
ACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTTTCTTTTCATTTTCTGTAAC
TTTTCGTTAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTAAATTCACTTTTGTTTATTT
GTCAGATTGTAAGTACTTTCTCTAATCACTTTTTTTTCAAGGCAATCAGGGTATATTA
TATTGTACTTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTAATGATAAGGTAGA
ATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAATATTCTTATTGGTAGAAACAAC
TACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATACTGTTTG
AGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCTCTGCTAACCATGTTTCATG
```


4) hRENEX – sequenciamento de fragmentos de DNA dos animais TGR(A1-7)7371

```
TCTCTTGAGGAAGATCCGTTTAAAGGTGGTGGTGTCTGTCGGGAGAGGCCTACCCGG
AGACCGGGAGATGGTCTTCTTCAGGTAGTAATTTTTTCAGACCCTCGTGTCTCACGTT
GCATGAGAAGGAATCTGTTTTCTCCACTTGCTTGTTCATATTGAGCTTGCTATAT
ATGAAGTAAGAACCGTCAGAGTCCAGGACTGGTGCGGTGTCTTGTAGTTCTCCTCT
GTATGCCCATTTGCTGGTCCACTCCACACTGATGTCTCCAGGGTTGAAGCCCACGACC
AGGCAAGTGAGACTGACATCTTTCCTGGACAACCTGCTCTGCTGGTGGCGGCAAGAT
GTATACTTGTGGAGCTCTGACTAGCCCTTTAATTTTTGAGATGGTTCTCTCGATGGGT
GATGGGAGGTCTTTGTTGTTGACCTTGCATTTGAACTCCTTGCCACTCATCCAGTCCT
GGTGCTGGATGGGGAGGGTGTGACCACCCGGATAGTACTGTTGTAATCCTCTCTAT
GGGTTTGTGTCTGAGCTGTGTGTACTTCCACGTTGTTCAAAACCAGCTGATCTGGA
CGTCTGGGTCATCCTCGCTCACATCCACCACCACACACGTGACCTTGGGTGTCAGGG
AGATCATGAGTACAT
```

7.4 Anexo IV

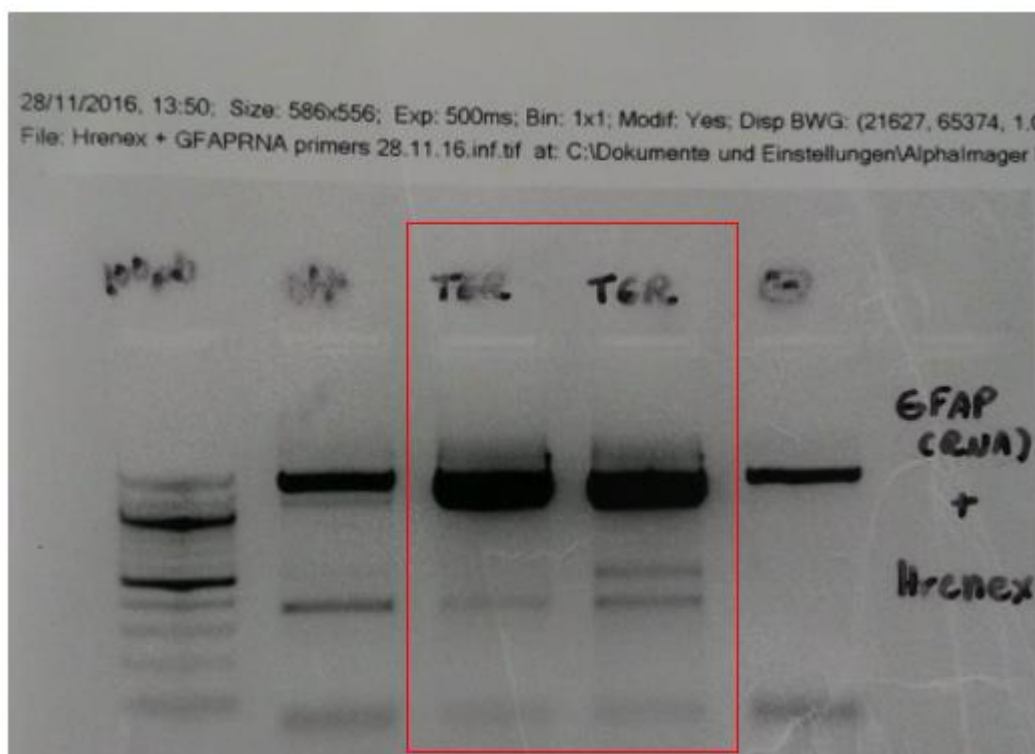


Imagem de gel representativa da expressão do DNA genômico do promotor GFAP por PCR.

Imagem de gel mostrando os fragmentos de $\cong 800$ bp obtido por PCR utilizando par de primers para a sequência hRENEX/hGFAP (2) a partir do DNA genômico da cauda de animais TGR(A1-7)7371 (amostras 13 e 14 do Anexo I representadas por um retângulo). O retângulo desenhado representa o promotor GFAP glial nos animais TGR(A1-7)7371.

7.4.1 Sequenciamento hRENEX/hGFAP (2)

Uma alíquota (20 µl) com fragmentos de \cong 800 bp obtida por RT-PCR utilizando par de primers para a sequência hRENEX/hGFAP (2) a partir do cDNA do cérebro de animais TGR(A1-7)7371 foi sequenciada (2 e 4) e comparada ao sequenciamento dos “primers” padrões (1 e 3) identificando o promotor GFAP e a porção hRENEX.

1) hGFAP – Padrão

```
TTGATCCTGAGACTTCAGGCTCCTGGGGCGGCCCGATAAGCTTGGATGGATCAATTC
CGATGGAGAAGGATGCCTCCNGGGGACTGCTGCTGCTGCTCTGGGGCTCCTGTACCT
TTGGTCTCCCGACACCGGTCGAGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAATA
TCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGACACCCAAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGATG
TGAGCGAGGATGACCCAGACGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTA
CACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTATCCGGGTGGT
CAGCACCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCA
AGGTCAACAACAAAGACCTCCCATCACCCATCGAGAGAACCATCTCAAAAATTAATA
GGGCTAGTCAGAGCTCCACAAGTATACATCTTGCCGCCACCAGCAGAGCAGTTGTCC
AGGAAAGATGTCAGTCTCACTTGCCTGGTCGTGGGCTTCAACCCTGGAGACATCAGT
GTGGAGTGGACCAGCAATGGGCATACAGAGGAGAACTACAAGGACACCCGACCCAG
TCCTGGACTCTGACGGTTCTTACTTCATATATAGCAAGCTCAATATGAAAACAAGCA
AGTGGGAGAAAACAGATTCTTCTCATGCAACGTGAGACACGAGGGTCTGAAAAT
TACTACCTGAAGAAGACCATCTCCCGGTCTCCGGGTAGGCCCTCTCCCGACAGACACC
ACCACCTTTAAACGGATCTTCTCAAGAGAATGCCCTTAATACACAGAAAGCCTGAA
GGGAACGAGGTGTGGACATGG
```

2) hGFAP – sequenciamento de fragmentos de cDNA dos animais TGR(A1-7)7371

```
TTGATCCTGAGAACTTCAGGCTCCTGGGGCGGCCCGATAAGCTTGGCATGGATCAAT
TCCGATGGAGAAGGATGCCTCGCTGGGGACTGCTGCTGCTGCTCTGGGGCTCCTGTA
CCTTTGGTCTCCCGACACCGGTCGAGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAA
ATATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGACACCCAAGGTCACGTGTGTGGTGGTGG
ATGTGAGCGAGGATGACCCAGACGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGA
GTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTATCCGGGT
GGTCAGCACCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAAT
GCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCATCACCCATCGAGAGAACCATCTCAAAAATT
AAAGGGCTAGTCAGAGCTCCACAAGTATACATCTTGCCGCCACCAGCAGAGCAGTT
GTCCAGGAAAGATGTCAGTCTCACTTGCCTGGTCGTGGGCTTCAACCCTGGAGACAT
CAGTGTGGAGTGGACCAGCAATGGGCATACAGAGGAGAACTACAAGGACACCGCA
CCAGTCCTGGACTCTGACGGTTCTTACTTCATATATAGCAAGCTCAATATGAAAACA
```

AGCAAGTGGGAGAAAACAGATTCCTTCTCATGCAACGTGAGACACGAGGGTCTGAA
AAATTACTACCTGAAGAAGACCATCTCCCGGTCTCCGGGTAGGCCTCTCCCGACAGA
CACCACCACCTTTAAACGGATCTTCNTCAAGAGAATGCCCTCAATCCGAGAAAGCCT
GAAGGAACGAGGTGTGGACATG

3) hRENEX – Padrão

CCGTTTAAAGGTGGTGGTGTCTGTCTCGGGAGAGGCCTACCCGGAGACCGGGAGATGG
TCTTCTTCAGGTAGTAATTTTTTCAGACCCTCGTGTCTCACGTTGCATGAGAAGGAATC
TGTTTTCTCCCACTTGCTTGTTTTTCATATTGAGCTTGCTATATATGAAGTAAGAACCG
TCAGAGTCCAGGACTGGTGCGGTGTCCTTGTAGTTCTCCTCTGTATGCCCATTGCTGG
TCCACTCCACACTGATGTCTCCAGGGTTGAAGCCCACGACCAGGCAAGTGAGACTG
ACATCTTTCCTGGACAACCTGCTCTGCTGGTGGCGGCAAGATGTATACTTGTGGAGCT
CTGACTAGCCCTTTAATTTTTGAGATGGTTCTCTCGATGGGTGATGGGAGGTCTTTGT
TGTTGACCTTGCATTTGAACCTCTTGCCACTCATCCAGTCCTGGTGCTGGATGGGGA
GGGTGCTGACCACCCGGATAGTACTGTTGTAATCCTCTCTATGGGTTTGTGTCTGAG
CTGTGTGTACTTCCACGTTGTTCAAAACCAGCTGATCTGGACGCTCTGGGTCATCCTC
GCTCACATCCACCACCACACGTCGACCTTGGGTGTCAGGGAGATCATGAGTACATC
CTTGATATTTGGAGGGAAGATGAAGACGGA

4) hRENEX – sequenciamento de fragmentos de cDNA dos animais TGR(A1-7)7371

AAAGGTGGTGGTGTCTGTCTCGGGAGAGGCCTACCCGGAGACCGGGAGATGGTCTTCT
TCAGGTAGTAATTTTTTCAGACCCTCGTGTCTCACGTTGCATGAGAAGGAATCTGTTTT
CTCCCACTTGCTTGTTTTTCATATTGAGCTTGCTATATATGAAGTAAGAACCGTCAGA
GTCCAGGACTGGTGCGGTGTCCTTGTAGTTCTCCTCTGTATGCCCATTGCTGGTCCAC
TCCACACTGATGTCTCCAGGGTTGAAGCCCACGACCAGGCAAGTGAGACTGACATC
TTTCCTGGACAACCTGCTCTGCTGGTGGCGGCAAGATGTATACTTGTGGAGCTCTGAC
TAGCCCTTTAATTTTTGAGATGGTTCTCTCGATGGGTGATGGGAGGTCTTTGTTGTTG
ACCTTGCATTTGAACCTCTTGCCACTCATCCAGTCCTGGTGCTGGATGGGGAGGGTG
CTGACCACCCGGATAGTACTGTTGTAATCCTCTCTATGGGTTTGTGTCTGAGCTGTGT
GTACTTCCACGTTGTTCAAAACCAGCTGATCTGGACGCTCTGGGTCATCCTCGCTCA
CATCCACCACCACACGTCGACCTTGGGTGTCAGGANATCATGAGTACATCCTTGA
TATTTGGAGNNAAGATGAAGACGGATGGTCCACCCTCGACCGGTGTCGGNAGACCA
AAGGTACAGGAGCCCCAGAGCAGCAGCAGCAGTCCCCAGCGAGGCATCCTTCTCCA
TCGGAATTGATCCATGCCAAGCTTATCGCGCCGCCCCAGGAGCCTGAAGTTCTCAGG
ATCAAGCTTAAGTTTAAACGCTAG

7.5 Anexo V

taq4 results

<http://edunivlnx05.umassmed.edu/cgi-bin/taq4/tacgi4-cgi.pl>

- 2163

Jgs I

61 ccaggtcagatgtgactagagcctaagagctccacactccctctctgtgtgggaactca 120
 ggtcagctctacactgatctcggattcctcaggggtggaggagagacacgacctgagt

Pci I Pas I

121 cagagggagacctcaggaggcagctgtccatcacatgtccaaatgcagagcataaccctg 180
 gtccctcggagtcctccgtcagacaggtagtgtacaggtttacgtctcgtatgggac

BstXI

181 ggctgggagcagtgaggcacaactgttaattccagcactttgggaggctgatgtggaagga 240
 ccgaccgcgctcaccgcgtgttgacattaaggtcgtgaaacctccgactacacctcct

Xba I Fall BpuEI

241 tcacttgagcccagaagttcttagaccacgctgggcaacatggcaagacctatctctaca 300
 agtgaactcgggtcttcaagatctggcggaccctgtgtaccgtctcgggatagagatgt

Pml I

301 aaaaaagttaaaaaatcagccacgtgtggtgacacacacctgtagctccagctattcagg 360
 tttttcaatttttttagtcggtgacacacctgtgtgtggacatcagggtcgataagttcc

Bpu10I- BbvCI- AflII Pst I BsgI-

361 aggctgaggtgaggggatcacttaaggctgggaggttgaggctgcagtgagtcgtggttg 420
 tccgactccactccctagtgaaatccgacctccaactccgacgtcactcagcacaac

Tth111 I

421 cgccactgcactccagctgggcaacagtgagacctgtctcaaaagacaaaaaaaaaaaa 480
 ggggtgacgtgaggtcggaccctgtcactctgggacagagttttctgtttttttttt

481 aaaaaaaaaaagaacatctcgtgtggagtggggagcgtgctctgacagaggctcg 540
 tttttttttttctgtataggaccacacctcatccctcggacgagactgtctccgagc

Bpu10I StuI

541 ggggctgagctggctctgtgagctgggaggaggcagacagccagcctgtctgcaag 600
 cccggactcgaccgagacactcgaccctcctcctcgtcgtccggaacagacgttc

Pas I Ear I

601 cagacctggcagcatgggctggccgccccagggcctcctctctcatgccagtgatg 660
 gtctggaccgtcgtaacccgacggcgggggtcccgaggagaagtacgggtcacttac

AlwNI

ArsI- ArsI

661 actcaccttggcacagacacaatgttcggggtgggacagtgctgctcccgcgcacc 720
 tgagtggaaacctgtctgtttacaagccccacctgtcacggacgaagggcggctgg

BsrDI-

721 ccagccccctcaaagtccctccgagaagccattgagcagggggcttgattgcacccc 780
 ggtcggggggagtttacggaaggctctcgggtaactcgtccccgaacgtaacgtgggg

Avr II

781 agcctgacagcctggcatcttgggataaaaagcagcacagccccctaggggctgccctg 840
 tcggactgtcggaccgtagaacctatctcgtcgtcggggatccccgacgggaacg

PluTI SfoI NarI KasI SgrAI

841 tgtgtggcgcaccggcgtggagacaaggctctattcagcctgtgccaggaagggg 900
 acacaccggtggccgacctctgttccgagataagtcggacacgggtcctttcccc

901 atcaggggatgccaggcatggacagtggtggcaggggggagaggagggctgtctgct 960
 tagtccctacgggtccgtacctgtcaccacgctccccctctcctcccgacagacga

961 tcccagaagtccaaggacacaaatgggtgaggggactgggagggttctgacctgtggg 1020
 agggctctcaggtcctgtgtttaccactccctgacctgcccgaagctgggacaccc

Apa I

```

                                AhdI          PspOMI
                                |             |
                                v             v
1021 accagagtggagggcgtagatggacctgaagtctccagggacaacagggcccaggtctca 1080
      tggctccacctcccgcctctacctggacttcagaggtccctgtgtcccgggtccagagt
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                PspOMI
                                |
                                v
1081 ggctcctagtgggcccagtggtccagcgtttccaaacccatccatccccagaggtct 1140
      ccgaggtcaaccgggtcaccgaggtcgcaaggtttgggtaggtagggtctccaaga
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                XhoI      PspXI      BsmBI-
                                |         |         |
                                v         v         v
1141 tcccatctctccaggctgatgtgtgggaactcgaggaataaatctccagtgggagcgg 1200
      aggttagagaggtccgactacacaccttgagctctttatttagaggtcacctctgcc
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                MscI      PstI
                                |         |
                                v         v
1201 aggggtggccagggaaacggggcgctgcaggaataaagacgagccagcacagccagctca 1260
      tcccaccgggtccctttgccccgacgtccttatttctgctcggctcgtcgtcgagct
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                StuI
                                |
                                v
1261 tgttaacggctttgtggagctgtcaaggcctggctctctgggagagggcacagggaggc 1320
      acacattccgaaacacctcgacagttccggaccagagaccctctctccgtgtccctccg
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                BstEII
                                |
                                v
1321 cagacaaggaaggggtgacctggaggacagatccaggggctaaagcctgataaggcaa 1380
      gtctgtctctcccactggacctccctgtctaggtccccgatttcaggactattccgtt
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                NaeI      NgoMIV      KfoI      AlfI
                                |         |         |         |
                                v         v         v         v
1381 gagagtgccgccccctcttccctatcaggacctccactgccacatagaggccatgatt 1440
      ctctcaccggcgggggagaaacgggatagtcctggaggtgacgggtatctccggtactaa
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                                                XcmI
                                                                |
                                                                v
1441 gacccttagacaagggtcgtgtccaatcccagccccagccccagaactccagggaaat 1500
      ctgggaatctgtttcccgaccacaggttagggtcgggggtcggggctctgaggtccctta
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                                                PfoI      XcmI
                                                                |         |
                                                                v         v
1501 gaatgggcagagagcaggaatgtgggacatctgtgttcaaggaaggactccagaggtct 1560
      cttaccgctctctcgtcttacacctgtagacacaagttccctcctgaggtcctcaga
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                StuI      XmnI      BpuEI
                                |         |         |
                                v         v         v
1561 gctgggaatgagccttagttaggaaatgaggtggcctctgagggtagacaacaggttcatt 1620
      cgacccttactccggatcactccttactccaccgggaactccatgtctgtccaagtaa
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                                                PvuII
                                                                |
                                                                v
1621 cttcgccaaattcccagaccttcagggcacttacagctgagtgagataatgcctgggt 1680
      gaagcggtttaagggtcgtggaacgtccgtgaatgtcagctcactctattacggacccaa
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                BspMI-
                                |
                                v
1681 atgaaatcaaaaagtggaaagcaggtcagaggtcatctggtacagcccttccctccct 1740
      tactttagtttttcaacctttcgtccagctccagtagacctgtcgggaaggaagggaa
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                Tth111I
                                |
                                v
1741 tttttttttttttttgtgagacaaggtctctctctgttcccaggtcggagtggcgcaa 1800
      aaaaaaaaaaaaaaaaaaacactctgttccagagagagacaacgggtccgacctcaccggtt
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                BpuEI-      PstI      Bpu10I      BbvCI
                                |         |         |         |
                                v         v         v         v
1801 acacagctcactgcagcctcaacctactgggctcaagcaatcctccagcctcagcctccc 1860
      tgtgtcgagtgcagctcggagttggatgaccggagttcgttaggaggtcggaggtcggaggg
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^
                                BstXI
                                |
                                v
1861 aaagtgtgggtataacagcatgagccaccccactcagcccttctcctcttttaattg 1920
      tttcagaccctaattgtctactcggtaggggtgagtcgggaaaggaaggaataattac
      ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^  ^

```

