



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

FABRINE FELIPE HILÁRIO

Estudo da influência do octapeptídeo TRV027 na expressão gênica dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina e ADAM 17 na região do Núcleo Para-Ventricular do Hipotálamo de animais normotensos e espontaneamente hipertensos

JOÃO PESSOA

2017

FABRINE FELIPE HILÁRIO

Estudo da influência do octapeptídeo TRV027 na expressão gênica dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina e ADAM 17 na região do Núcleo Para-Ventricular do Hipotálamo de animais normotensos e espontaneamente hipertensos

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Juliana Franco Almeida

Coorientadora:

Prof^a Dr^a Maria do Socorro de França Falcão

JOÃO PESSOA/PB

2017

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

H641e Hilário, Fabrine Felipe.

Estudo da influência do octapeptídeo TRV027 na expressão gênica dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina e ADAM 17 na região do Núcleo Para-Ventricular do Hipotálamo de animais normotensos e espontaneamente hipertensos / Fabrine Felipe Hilário. - João Pessoa, 2017.

64 f. : il.

Orientação: Juliana Franco Almeida, Maria do Socorro de França Falcão.

Monografia (Graduação) - UFPB/CEBIOTEC.

1. Hipertensão arterial. 2. Sistema Renina-Angiotensina. 3. Agonista Tendencioso - TRV027. I. Almeida, Juliana Franco. II. Falcão, Maria do Socorro de França. III. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



João Pessoa, 22 de novembro de 2017.

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e dois dias do mês de novembro de 2017, às 14:00 h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Juliana Franco Almeida e composta pelos avaliadores 1. Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves (CCS/UFPB); 2. Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (CBIOTEC/UFPB), a discente Fabrine Felipe Hilário, matrícula 11312745, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Estudo da influência do octapeptídeo TRV027 na expressão gênica dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina e ADAM 17 na região do Núcleo Para-Ventricular do Hipotálamo de animais normotensos e espontaneamente hipertensos**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Juliana Franco Almeida, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

Juliana Franco Almeida
Presidente da Banca Examinadora

Ian Porto Gurgel do Amaral
Avaliador 1

Fabrine Felipe Hilário
Discente

[Assinatura]
Avaliador 2

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o amor, apoio e incentivo de todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades e por tornar possível este momento.

Agradeço a todos os professores do Centro de Biotecnologia, por todo esforço dedicado a todos os alunos e por todo conhecimento a mim transmitido. Em especial à minha orientadora, Juliana Franco, por toda paciência e tempo que dedicou a me ajudar durante o processo de realização deste trabalho. E à minha coorientadora, Maria do Socorro de França, por todo apoio e orientação ofertado.

Ao Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) por todo suporte oferecido para a realização deste trabalho. Em especial ao professor Valdir Braga por todo o suporte oferecido para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha banca examinadora, Ian Amaral e José Luiz de Brito, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

À minha mãe, Maria de Fátima, minha heroína que sempre me deu amor, apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Ao meu pai, Félix Hilário, que apesar de todas as dificuldades me deu suporte e me fortaleceu durante todos esses anos.

Ao meu irmão, Félix Neto, por toda a paciência e companheirismo durante esses anos morando longe de nossos pais.

Ao meu namorado, Ulisses Ricardo, por estar sempre ao meu lado, me dando força, amor, carinho, paciência, compreensão e um ombro quando eu mais precisava.

Sou grata pela amizade ao longo do curso de Alex Rique, Aline Dantas, Andrwey Viana, Carol Targino, Debora Lacerda, Gabriel Nascimento, Karol Estrela, Lucas Alecrim, Melina Lins, Rafael Goulart, Ray Arruda e de Tarcísio Bonifácio. Amigos que participaram da concretização desta etapa da minha vida e que pretendo levar por toda a minha vida.

E enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta, fica registrado aqui o meu muito obrigada.

*“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho
e, então, com todo o coração, dedicar-se a ele.”*

Buda

RESUMO

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema essencial na regulação das funções cardiovasculares, além de estar relacionada ao desenvolvimento e manutenção da PA, por meio da ação da Angiotensina II (AngII), o principal peptídeo ativo do SRA. Ao se ligar no receptor AT1, que se encontra amplamente distribuído no hipotálamo, a Ang II é responsável por aumentar a atividade simpática e causar a disfunção do barorreflexo, ocasionando um aumento direto da pressão arterial. Um avanço importante na compreensão do SRA foi a descoberta da enzima ECA 2, que catalisa a conversão da Ang II em Ang 1-7, um peptídeo biologicamente ativo que atua no receptor MAS, exercendo um papel protetor no sistema cardiovascular. Porém, a ECA 2 é propensa a sofrer um processo conhecido como *shedding*, no qual ocorre a clivagem proteolítica em sua estrutura e subsequente liberação de seu ectodomínio no espaço intersticial, por intermédio da ADAM 17, esta, por sua vez, possui a sua ação estimulada pela Ang II. Desta forma, levando em consideração a importância do receptor AT1R nos efeitos induzidos pela Ang II, o atual estudo teve como objetivo principal estudar a influência do TRV027, um agonista tendencioso do AT1R, em animais normotensos Wistar Kyoto (WKY) e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), analisando os níveis de RNA mensageiro da ECA2, da ADAM 17 e do receptor AT1R, presentes na região do núcleo para-ventricular do hipotálamo (PVN). Para isso, os ratos WKY e SHR foram divididos em grupos de tratados e não tratados com o TRV027. Após duas semanas de tratamento, realizou-se a coleta dos cérebros dos animais com posterior extração de RNA total presentes na região PVN, para a subsequente síntese de cDNA e utilização da técnica da qPCR em tempo real já otimizada. Assim, observou-se que os animais hipertensos apresentam maior expressão, não estatisticamente significativa, nos níveis de mRNA da enzima ECA 2, da ADAM 17 e do AT1R, em contrapartida com animais normotensos WKY. Ademais, constatou-se que o tratamento com o TRV027 promoveu um aumento não significativo nos níveis da ECA 2, ADAM 17 e AT1R, em animais normotensos Wistar Kyoto, enquanto que em animais SHR o tratamento com o TVR027 promoveu diminuição não significativa na expressão da ECA 2, ADAM 17 e do receptor AT1R, presentes da região PVN. Logo, os dados obtidos neste estudo fornecem um maior entendimento acerca dos impactos promovidos pelo agonista tendencioso TRV027 sobre o sistema renina-angiotensina e na consecutiva expressão da ADAM 17.

PALAVRAS-CHAVE: Agonista Tendencioso; Hipertensão; Sistema Renina-Angiotensina; TRV027.

ABSTRACT

The renin-angiotensin system (RAS) is an essential system in cardiovascular functions regulation, as well as being related to the development and maintenance of BP, through the action of Angiotensin II (AngII), the main active peptide of RAS. When it binds to AT1 receptor, which is widely distributed in the hypothalamus, Ang II increases sympathetic activity and causes baroreflex dysfunction, leading to a direct increase in blood pressure. An important advance to understand RAS mechanisms was the discovery of enzyme ACE 2, which catalyzes the conversion of Ang II into Ang 1-7, a biologically active peptide that acts on the MAS receptor, exerting a protective role in the cardiovascular system. However, ACE 2 is prone to a process known as shedding *shedding*, in which a proteolytic cleavage occurs in its structure and a subsequent release of its ectodomain into interstitial space through ADAM 17 action, which is stimulated by Ang II. Thus, taking into account the importance of the AT1R receptor in effects induced by Ang II, the present study had as main objective to study the influence of TRV027, a biased agonist of AT1R, in normotensive Wistar Kyoto (WKY) animals and spontaneously hypertensive rats (SHR), analyzing messenger RNA levels of ACE 2, ADAM 17 and AT1R receptor, in the paraventricular nucleus region of hypothalamus (PVN). For this, the WKY and SHR rats were divided into TRV027-treated and untreated groups. After two weeks of treatment, the brains were collected from the animals with subsequent extraction of total RNA present in the PVN region, as well as cDNA synthesis with the already optimized real-time qPCR technique use. Thus, it was observed that the hypertensive animals presented a greater non-statistically significant expression in the mRNA levels of ACE 2, ADAM 17 and AT1R, in contrast with normotensive animals WKY. In addition, TRV027 treatment promoted a non-significant increase in ACE 2, ADAM 17 and AT1R levels in normotensive Wistar Kyoto animals, whereas in SHR animals, TVR027 treatment promoted a non-significant decrease in ACE 2, ADAM 17 and the AT1R receptor expressions in PVN region. Therefore, the data obtained in this study provide a better understanding of the impacts promoted by the biased agonist TRV027 on the renin-angiotensin system and ADAM 17 expression.

KEYWORDS: Biased Agonist; Hypertension; Renin-Angiotensin System; TRV027.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Sistema Renina Angiotensina.....	21
Figura 2 Esquema do Sistema Renina-Angiotensina, expondo as vias de formação das Angiotensinas com seus respectivos receptores e efeitos.....	22
Figura 3 Estrutura do domínio extracelular (Ser e Asp) da ECA2 humana.....	23
Figura 4 Representação esquemática da estrutura das ADAMs e do processo de clivagem de substratos alvos.....	25
Figura 5 Hiperatividade do SRA, ADAM 17 e hipertensão neurogênica.....	26
Figura 6 Ações de diferentes ligantes no AT1R e seus efeitos sistêmicos.....	27
Figura 7 Localização e divisão do núcleo para-ventricular do hipotálamo (PVN).....	29
Figura 8 Coordenada do núcleo para-ventricular do hipotálamo.....	32
Figura 9 Representação da diluição seriada do cDNA.....	35
Figura 10 Perfil da eletroforese das amostras de RNAs total extraído.....	37
Figura 11 Curva padrão obtida pela PCR em tempo real para os genes da ECA2, ADAM17, AT1R e GAPDH.....	39
Figura 12 Curvas de validação dos primers da ECA2, ADAM17 e AT1R.....	40
Figura 13 Expressão da enzima ECA2 na região PVN de ratos WKY e SHR, não tratados e tratados com o TRV027.....	41
Figura 14 Expressão da ADAM 17 na região PVN de ratos WKY e SHR, não tratados e tratados com o TRV027.....	42
Figura 15 Expressão do receptor AT1R na região PVN de ratos WKY e SHR, não tratados e tratados com o TRV027.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação da pressão arterial.....	18
Tabela 2 Sequência de aminoácidos das angiotensinas do SRA.....	20
Tabela 3 Sequência de aminoácidos comparativos entre a Ang II e o TRV027.....	28
Tabela 4 Componentes da síntese de cDNA para a RT-PCR.....	33
Tabela 5 Componentes da reação de qPCR em tempo real.....	34
Tabela 6 Descrição dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	34
Tabela 7 Valores obtidos a partir da curva padrão para a otimização do processo de qPCR.....	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Quantificação e relação 260/280 dos RNAs total extraídos da região PVN de ratos Wistar Kyoto e SHR, tratados e não tratados com o TRV027.....	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7TMRs – Receptores de Sete Domínios Transmembranares

°C – Graus Celsius

Ag – Angiotensinogênio

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

Ang 1-9 – Angiotensina 1 – 9

Ang 1-7 – Angiotensina 1 – 7

AT1R – Receptor de Angiotensina II do Tipo 1

AT2R – Receptor de Angiotensina II do Tipo 2

cDNA – DNA Complementar

Ct – Cycle Threshold

DAG – Diacilglicerol

DC – Débito Cardíaco

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina I

ECA 2 – Enzima Conversora de Angiotensina II

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GPCRs – Receptores Acoplados a Proteína G

GRK – Quinases de Receptores Acoplados a Proteína G

HA – Hipertensão Arterial

IP3 – Inositol 1,4,5-Trisfosfato

KD – Constante de Dissociação

OCVs – Órgãos Circunventriculares

PA – Pressão Arterial

PiP2 – Fosfatidilinositol 4,5-Bifosfato

PKC – Proteína Quinase C

PLC – Fosfolipase C

PVN – Núcleo Para-Ventricular

MAS – Receptor de Angiotensina 1 -7

NTS – Núcleo do Trato Solitário

RVLM – Bulbo Ventrolateral Rostral

RVPT – Resistência Vascular Periférica Total

SFO – Órgão Subfornical

SHR – Ratos Espontaneamente Hipertensos

SNC – Sistema Nervoso Central

SRA – Sistema Renina Angiotensina

Observação: as abreviaturas, siglas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Hipertensão.....	17
2.2 Sistema Renina-Angiotensina.....	19
2.3 Enzima Conversora de Angiotensina 2.....	23
2.4 ADAM 17.....	24
2.5 Agonismo Tendencioso no AT1R.....	26
2.6 TRV027.....	27
2.7 Núcleo Para-Ventricular do Hipotálamo.....	28
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Geral.....	30
3.2 Específicos.....	30
4. METODOLOGIA.....	31
4.1 Animais.....	31
4.2 Tratamento.....	31
4.3 Coleta das amostras.....	31
4.4 Extração de RNA.....	32
4.5 Quantificação e qualificação do RNA.....	32
4.6 Síntese de cDNA.....	33
4.7 PCR quantitativa em tempo real.....	33
4.8 Otimização da qPCR em tempo real.....	35
4.9 Análise dos resultados.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Quantificação e qualificação das amostras de RNA	36
5.2 Otimização da qPCR em tempo real.....	38
5.2.1 Curva padrão da ECA 2, ADAM 17, AT1R e GAPDH.....	38
5.2.2 Curva de validação dos <i>primers</i> ECA 2, ADAM 17 e AT1R.....	40
5.3 Análises de expressão gênica.....	41
5.3.1 Expressão gênica da ECA 2.....	41
5.3.2 Expressão gênica da ADAM 17.....	41
5.3.3 Expressão gênica do AT1R.....	42
6. DISCUSSÃO.....	43

7. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 17,5 milhões de pessoas morrem a cada ano devido às doenças cardiovasculares (DCVs), correspondendo a cerca de 31% da mortalidade mundial (Organização Mundial da Saúde, 2017). A hipertensão arterial (HA), caracterizada pelos níveis elevados e sustentados da pressão arterial (PA), é considerada o principal fator de risco no aumento das taxas de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares. A regulação da PA depende da ação integrada dos sistemas cardiovascular, endócrino, renal e neural, sendo assim considerada uma das funções fisiológicas mais complexas do sistema biológico (Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2010; Oparil et al., 2005).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema hormonal essencial no controle cardiovascular, especialmente na regulação central e periférica da pressão arterial e no controle hidroeletrólítico do sangue (Morishita et al., 2000; Oudit et al., 2003). O principal peptídeo ativo do SRA é a Angiotensina II (Ang II), seus impactos centrais estão relacionados ao aumento da pressão arterial por consequência do aumento direto da atividade simpática e da disfunção do barorreflexo, causados, em parte, pela liberação de espécies reativas de oxigênio decorrente da ligação da Ang II ao seu receptor em regiões como o órgão subfornical (SFO), o núcleo para-ventricular do hipotálamo (PVN), o núcleo do trato solitário (NTS) e o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (Braga et al. 2011; Averill et al., 2000). O peptídeo Ang II pode agir em dois tipos de receptores: AT1R e AT2R, sendo o AT1R o principal responsável por suas ações fisiológicas, com expressão em neurônios e astrócitos presentes no hipotálamo e em outras regiões centrais (Bader et al., 2008; Coleman et al., 2009).

Recentemente, um novo componente do sistema renina-angiotensina foi caracterizado, a enzima ECA 2 (Enzima Conversora de Angiotensina 2), enzima esta capaz de clivar Ang I e Ang II em Ang 1-9 e Ang 1-7, respectivamente (Chang et al., 2011). Sendo a degradação de Ang II formando Ang 1-7, considerada o papel principal da ECA 2 (Vickers et al., 2002). A Ang 1-7, por sua vez, atua no receptor MAS, antagonizando vários efeitos mediados pelo receptor AT1R e exercendo efeitos benéficos para o sistema cardiovascular como a geração de óxido nítrico, vasodilatação, natriurese, inibição da insuficiência cardíaca, diminuição da atividade simpática e aumento da sensibilidade do barorreflexo. Porém, estudos apontam que durante a hipertensão arterial, a expressão e a atividade da enzima ECA 2 são reduzidas (Xia et al., 2013; Xia et al., 2009; Yamazato et al., 2007). Além disso, a ECA 2 está sujeita a sofrer um processo conhecido como *shedding*, ocorrendo a clivagem e liberação do seu ectodomínio

cataliticamente ativo da superfície celular para o meio extracelular, reduzindo assim sua ação (Lambert et al., 2005).

A desintegrina e metaloproteínase ADAM 17, também denominada de TNF α convertase (TACE), é a principal responsável pelo processo de clivagem e liberação da forma solúvel da ECA 2. A ADAM 17 é a protease pertencente à família das ADAMS mais bem estudada até o presente momento, com evidências de sua atuação ampla e funcional como *shedase*, clivando várias proteínas da superfície celular e controlando os processos de liberação de citocinas, de fatores de crescimento, da adesão celular e da transdução de sinal. Recentemente, estudos apontam que a ligação de Ang II ao seu receptor AT1R além de promover o aumento da pressão arterial, possibilita uma regulação positiva da ADAM 17, que ao promover a clivagem da enzima ECA 2, contribui para a redução dos efeitos compensatórios promovidos pela ECA 2 na hipertensão arterial (Xia et al., 2013; Garton et al., 2006; Iwata et al., 2009; Lambert et al., 2005).

Levando em consideração a importância do receptor AT1R nos efeitos centrais desencadeados pela Ang II, a utilização de “agonistas tendenciosos” vem ganhando mais atenção aos estudos que objetivam melhorar os parâmetros cardiovasculares, pois esses agonistas possuem a capacidade de se ligar a receptores acoplados a proteína G (GPCR), promovendo uma ativação preferencial a uma determinada via de sinalização (Kenakin, 2007). Entre os agonistas tendenciosos desenvolvidos até o momento, o mais ativo e promissor é o TRV027, que se diferencia da Ang II pela substituição do primeiro aminoácido por Sarcosina e oitavo por D-Alanina. O TRV027 possui a capacidade de ativar apenas a via da β -arrestina de forma independente da sinalização da proteína G, diminuindo a PA sem ocasionar o efeito indesejado do inotropismo negativo característico dos antagonistas (Granier e Kobilka, 2012; Violin et al., 2014; Violin et al., 2010).

Neste contexto, a hipótese preliminar deste trabalho é que devido os níveis elevados de Ang II, os ratos SHR regulam de forma positiva a enzima ADAM 17 e o receptor AT1R em áreas envolvidas com a modulação simpática da pressão arterial, como o núcleo paraventricular do hipotálamo, conseqüentemente ao promover o *shedding* da ECA 2, a ADAM 17 contribui para o processo hipertensivo. Assim, o agonista tendencioso TRV027 pode melhorar os parâmetros cardiovasculares nos animais SHR, por regular negativamente a ADAM 17, a partir de sua ligação ao AT1R, impedindo, pois, o *shedding* da ECA 2.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo realizar a avaliação da expressão gênica da enzima ECA 2, da ADAM 17 e do receptor AT1R, em nível de RNA mensageiro, na região do núcleo para-ventricular do hipotálamo, em ratos normotensos e espontaneamente

hipertensos, tratados e não tratados com a droga TRV027. Tendo em vista contribuir para o avanço da compreensão sobre o papel da ADAM 17 e do sistema renina-angiotensina na hipertensão, além de auxiliar para o entendimento dos impactos provocados pelo TRV027 no sistema cardiovascular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hipertensão

A pressão arterial (PA) é a força do fluxo sanguíneo exercida na parede arterial. Sua geração e manutenção se dão pela interação entre a força propulsora cardíaca, a capacidade de dilatação da aorta e a resistência ao fluxo sanguíneo exercido pelas artérias e arteríolas. Assim, a pressão arterial equivale ao produto do débito cardíaco (DC) pela resistência vascular periférica total (RVPT) (Aires, 2012).

A pressão sanguínea no sistema arterial é de natureza pulsátil, ou seja, oscila entre um nível máximo e um nível mínimo. Na sístole é obtido o nível máximo de pressão, a pressão sistólica, que corresponde à pressão empregada na artéria após o sangue ser ejetado pelo ventrículo esquerdo. Já o nível mínimo de pressão ocorre durante a diástole, sendo denominado de pressão diastólica, que corresponde à pressão na artéria durante o relaxamento do ventrículo sem ejeção sanguínea (Aires, 2008; Constanzo, 2014; Silverthorn, 2010). Em homeostase a pressão sistólica alcança uma média próxima de 120 mmHg e cai para aproximadamente 80 mmHg na pressão diastólica, garantindo uma adequada perfusão tecidual (Marteli, 2013).

A regulação da PA é uma das funções fisiológicas mais complexas do sistema biológico, que necessita da ação integrada do sistema cardiovascular com os sistemas renal, neural e endócrino (Oparil et al., 2005). O controle da pressão arterial ainda pode ocorrer a curto e a longo prazo. O controle a curto prazo é mediado pela associação do sistema nervoso autônomo com os barorreceptores e quimiorreceptores. Já o controle a longo prazo, por sua vez, é realizado principalmente por intermédio do sistema renina-angiotensina. As alterações nos mecanismos de controle da PA estão associadas com o desenvolvimento da hipertensão (Dampney et al., 2002).

A hipertensão arterial trata-se de um estado alterado de saúde que acarreta em uma pressão arterial do sangue acima dos valores considerados normais, ou seja, quando a pressão sanguínea de um indivíduo fica acima dos valores de 140/90 mmHg, de forma sustentada, como resultado do desequilíbrio dos mecanismos envolvidos na regulação da pressão arterial (Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2010; Cain et al., 2002). De acordo com dados da

American Heart Association (2017), os níveis da PA de indivíduos adultos são classificados em: normal, elevado, hipertensão estágio 1 (leve), hipertensão estágio 2 (moderada) e hipertensão estágio 3 (grave), conforme a exposto na Tab. 1.

Tabela 1 – Classificação da pressão arterial.

Classificação	Pressão Sistólica (mmHg)	Pressão Diastólica (mmHg)
Normal	< 120	< 80
Elevado	120 – 129	< 80
Hipertensão		
Estágio 1	130 – 139	80 – 89
Estágio 2	≥ 140	≥ 90
Estágio 3	> 180	> 120

Fonte: American Heart Association, 2017.

A hipertensão arterial (HA) tem sido indicada como o principal fator de risco para a morbidade e mortalidade precoces causadas por doenças cardiovasculares, sendo responsável por cerca de 9,4 milhões de mortes por ano no mundo (OMS, 2013). Segundo o levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde (2016), o número de adultos com aumento da pressão arterial cresceu de 594 milhões de pessoas em 1975 para 1,13 bilhões em 2015, com aumento em grande parte nos países de média e baixa renda. No Brasil o mesmo aumento foi observado na última década, com um crescimento de 14,2% no número de pessoas que foram diagnosticadas com hipertensão (Ministério da Saúde, 2016). Entre as alterações cardiovasculares provocadas pela hipertensão estão o acidente vascular cerebral (AVC), a doença arterial coronária, a insuficiência cardíaca e a insuficiência renal crônica (Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2010).

O termo hipertensão neurogênica se aplica quando a hipertensão possui mediação neural e o aumento da pressão arterial é causado mediante a desregulação dos mecanismos simpáticos e neuroendócrinos (Stocker et al., 2017). Evidências apontam que a hiperatividade do SRA no sistema nervoso central (SNC) está implicada no desenvolvimento e manutenção da hipertensão, devido ao aumento da atividade simpática e redução da sensibilidade barorreflexa, em decorrência dos efeitos centrais da Ang II (Averill et al., 2000; Phillips et al., 1998; Saxena, 1992). O estresse oxidativo em virtude da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela

NADPH oxidase e ativação de fatores de transcrição nuclear, derivado da ação da Ang II via receptor AT1R, em regiões cerebrais envolvidas na modulação cardiovascular, está relacionado com o aumento da saída simpática, a disfunção do barorreflexo e secreção de vasopressina, sustentando a patogênese da hipertensão neurogênica (Cheng et al., 2010; Braga et al., 2011; Chan et al., 2017).

2.2 Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um complexo sistema envolvido na regulação de diferentes funções, em especial na regulação central e periférica da pressão arterial e na manutenção do balanço hidroeletrólítico, além de estar envolvido na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares (Morishita et al., 2000; Oudit et al., 2003). A influência do SRA no sistema cardiovascular pode ocorrer tanto de forma direta, alterando a morfologia e a função cardíaca e vascular, como de forma indireta, modificando o volume sanguíneo, o ganho dos reflexos cardíacos e o nível circundante e tecidual de hormônios e autacóides como o óxido nítrico, a vasopressina e as prostaglandinas (Ferrario et al., 1990).

A cascata clássica de sinalização do SRA se tem início perante a liberação da renina, uma enzima proteolítica, produzida e liberada principalmente pelas células justaglomerulares renais frente a estímulos, como a redução da pressão da perfusão renal (Atlas, 2007; Campbell, 2003). Uma vez na circulação, a renina cliva a ligação Leu10-Ceu11 do angiotensinogênio, uma alfa-globulina circulante proveniente do fígado, formando o decapeptídeo Angiotensina I (Lunde et al., 2001). A Ang I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), por sua vez, é clivada e convertida no octapeptídeo Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), uma dipeptidil carboxipeptidase presente primariamente nas células endoteliais, que também é responsável pela degradação da bradicinina, um potente vasodilatador (Atlas, 2007; Turner et al., 2002).

A Ang II é o componente biologicamente ativo mais importante do eixo clássico do SRA. Uma vez formado, o peptídeo Ang II atua em diversos órgãos e sistemas, quando ligado aos seus receptores. Dois receptores, ambos acoplados a proteína G, medeiam as ações da Angiotensina II: o receptor de angiotensina do tipo 1 (AT1R) e o receptor de angiotensina do tipo 2 (AT2R). A ativação dos receptores AT1R pela Ang II promove a vasoconstrição, o aumento na secreção de aldosterona e do hormônio antidiurético (ADH), a proliferação celular e o estresse oxidativo. Já a ativação dos receptores AT2R pela Ang II, promovem efeitos contrários aos efeitos mediados pelos AT1R, estimulando os mecanismos de vasodilatação e os

efeitos anti-inflamatórios e anti-proliferativo (Fyhrquist et al., 2008; Steckelings et al., 2005; Shringarpure et al., 2003; Atlas, 2007).

Há pouco tempo, novos componentes do sistema renina-angiotensina foram descritos, como a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2), recentemente caracterizada em humanos e roedores (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000). A ECA 2 é uma carboxipeptidase que possui 42% de homologia com a ECA e originalmente descrita com a capacidade de gerar Ang 1-9 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His), um peptídeo com funções ainda desconhecidas, a partir da hidrólise do aminoácido -Leu da Ang I (Donoghue et al., 2000). Além disso, esta enzima também atua removendo o resíduo -Phe da Ang II para formar a Ang 1-7 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro), sendo esta conversão considerada sua principal função, pois sua afinidade catalítica para a Ang II é 400 vezes maior em comparação para com a Ang I (Vickens et al., 2002). As sequências de aminoácidos das angiotensinas que sofrem conversão pela ação da ECA e ECA 2, então listadas na Tab. 2, para um melhor entendimento dos pontos de degradação.

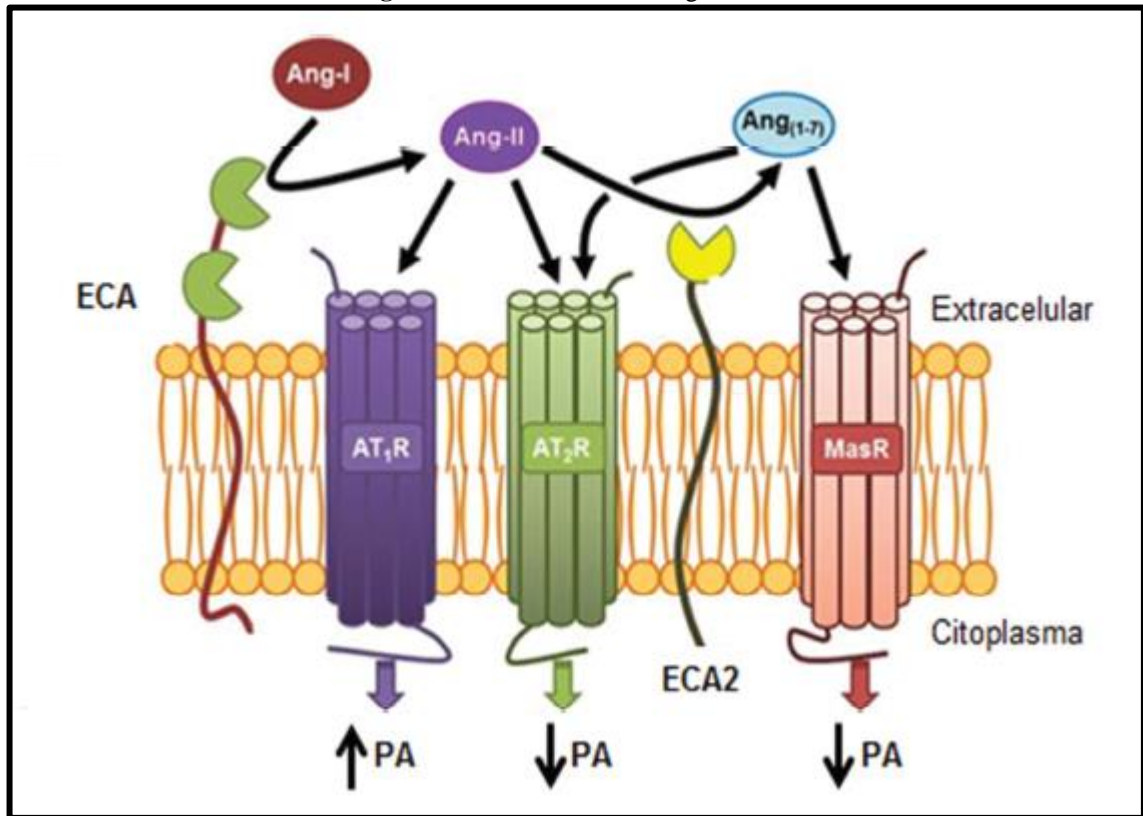
Tabela 2 - Sequência de aminoácidos das angiotensinas do SRA.

Peptídeos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ang I	Asp	Arg	Val	Tyr	Ili	His	Pro	Phe	His	Leu
Ang 1-9	Asp	Arg	Val	Tyr	Ili	His	Pro	Phe	His	
Ang II	Asp	Arg	Val	Tyr	Ili	His	Pro	Phe		
Ang 1-7	Asp	Arg	Val	Tyr	Ili	His	Pro			

Fonte: Autor (2017).

O coração, o cérebro e os rins são as principais fontes de produção da Ang 1-7 (Ferrario et al., 2005). A maioria das ações da Ang 1-7 ocorrem mediante a sua ligação ao seu receptor seletivo, o receptor MAS, acoplado a proteína G (Santos et al., 2003). Em muitas circunstâncias, os efeitos da Ang 1-7 são antagonistas daqueles induzidos pela Ang II no sistema cardiovascular, tais como a geração de óxido nítrico, vasodilatação, efeitos anti-proliferativos, diminuição da atividade simpática e aumento da sensibilidade do barorreflexo, levando à diminuição da pressão arterial (Figura 1) (Ferrario et al., 1997; Santos et al., 2000; Mousa et al., 2008).

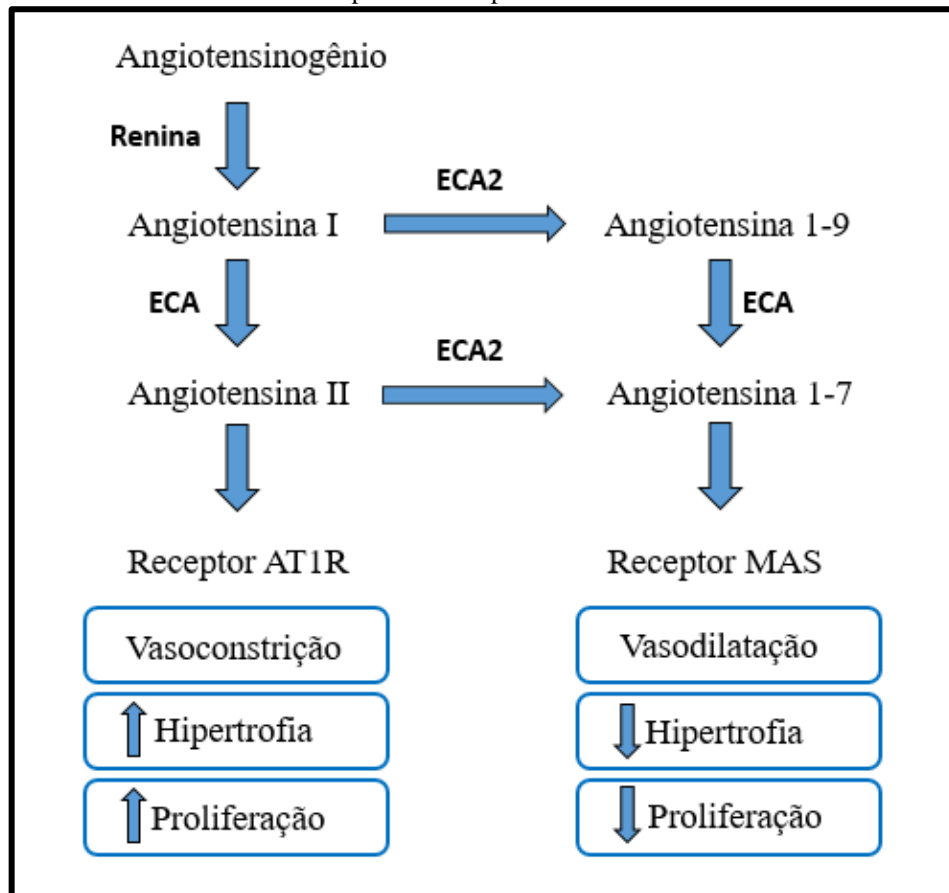
Figura 1 – Sistema Renina Angiotensina



Em condições fisiológicas basais a Ang II formada a partir da Ang I, por intermédio da ECA, pode se ligar aos receptores AT₁R e AT₂R, promovendo o aumento e diminuição da PA, respectivamente. Já a Ang 1-7, por sua vez, se liga ao receptor Mas, induzindo diminuição da PA. (PA: pressão arterial; Ang I: angiotensina I; Ang II: angiotensina II; Ang 1-7: angiotensina 1-7; AT₁R: receptor de angiotensina do tipo 1; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; ADAM17: desintegrina e mataloprotease 17; MasR: receptor específico para Ang 1-7, receptor Mas). Fonte: Adaptado de Xia et al., 2013.

Assim, o sistema renina-angiotensina reúne duas vias com ações distintas que se completam e que em conjunto contribuem para a homeostasia do sistema biológico, uma das vias é em termos gerais vasoconstritora/hipertrofica/proliferativa e possui como principal mediador a Ang II, já a outra via é caracterizada como vasodilatadora/anti-hipertrofica/anti-proliferativa sendo mediada principalmente pela Ang 1-7, como explanado na Fig. 2 (Santos et al., 2013).

Figura 2 – Esquema do Sistema Renina-Angiotensina, expondo as vias de formação das Angiotensinas com seus respectivos receptores e efeitos



ECA: Enzima Conversora de Angiotensina; ECA2: Enzima Conversora de Angiotensina 2; AT1R: Receptor de Angiotensina do Tipo 1. Fonte: Autor (2017).

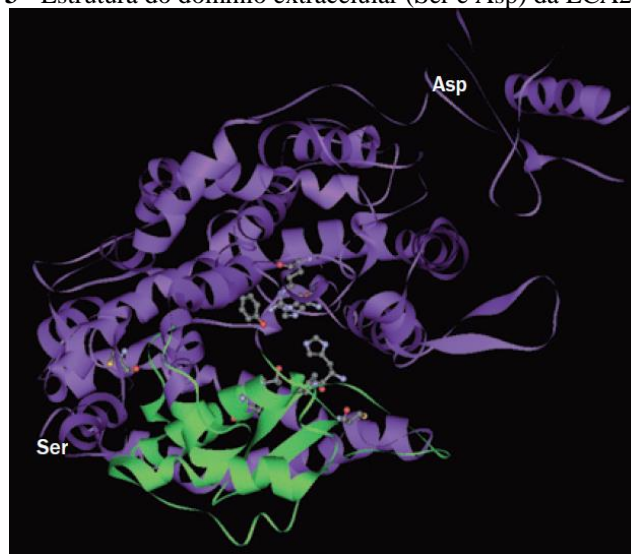
Estudos também apontam a existência de sistemas locais do SRA em variados tecidos, tais como no cérebro, coração, tecido adiposo, pâncreas, ovários e músculo esquelético, capazes de fornecer angiotensinas e seus respectivos receptores, de forma independente do SRA circulante (Campbell, 1987; Leung, 2004). Em órgãos como o cérebro e a glândula adrenal, o SRA local opera de forma independente do SRA circulante, à medida que no coração e rins interagem fortemente em cada uma das situações, ambos os sistemas trabalham completando um ao outro, e não de forma antagônica (Fyhrquist et al, 2008; Leung, 2007). No cérebro, os integrantes do sistema renina-angiotensina são expressos, em modo geral, em neurônios, astrócitos e células da glia, particularmente em regiões do cérebro envolvidos na regulação cardiovascular, no qual desempenham um importante papel na regulação da pressão arterial por meio da modulação da atividade simpática (Nakagawa e Sigmund, 2017; Nunes e Braga, 2011).

2.3 Enzima Conversora de Angiotensina 2

A ECA 2 foi inicialmente descrita por Tipnis et al. (2000) como uma enzima homóloga à enzima conversora de angiotensina humana (ECA). No mesmo ano, Donoghue (2000) também descreveu uma enzima homóloga à ECA com a capacidade de converter Ang I em Ang 1-9, denominando-a de ECA 2. Ambos os estudos destacaram o potencial do novo componente do SRA, introduzindo-o para o foco de inúmeras pesquisas, principalmente no sistema cardiovascular (Bassan et al., 2011).

A enzima ECA 2 é uma proteína transmembranar do tipo I, composta por 805 aminoácidos que estruturalmente possui um domínio extracelular, uma região transmembranar e uma calda intracelular. A região extracelular da ECA 2 contém o domínio catalítico N-terminal, com 42% de homologia com a ECA, contendo a região de ligação ao substrato e uma zona de ligação ao zinco de metaloproteinase (Figura 3). Já a sua região C-terminal, possui 48% de homologia com a collectrina, uma proteína transportadora (Jiang et al., 2014; Donoghue et al., 2000; Guang et al., 2012; Guy et al., 2005). Diferente da ECA, a ECA 2 possui apenas um sítio enzimático ativo, assim ela funciona como uma carboxipeptidase, removendo um único aminoácido da Ang II para gerar Ang 1-7, sendo esta considerada sua principal função, e hidrolisando um aminoácido da Ang I para gerar Ang 1-9. A ECA 2 também pode hidrolisar outros peptídeos bioativos, não relacionados ao SRA, como a apelina-13, β -casomorfina, dinorfina A1-13 e grelina (Vickers et al., 2002).

Figura 3 - Estrutura do domínio extracelular (Ser e Asp) da ECA2 humana.



O domínio extracelular é dividido em dois subdomínios (verde e roxo), formando uma fenda profunda que se propõe ser o local ativo para a ligação do substrato e a subsequente catálise. O domínio catalítico tem uma região de ligação ao substrato e um local de ligação de zinco de metaloproteinase. As regiões mostradas na figuração em forma de bola, são regiões de ligação propostas para o inibidor de ACE2, o MLN-4760. Fonte: Jiang et al., 2014.

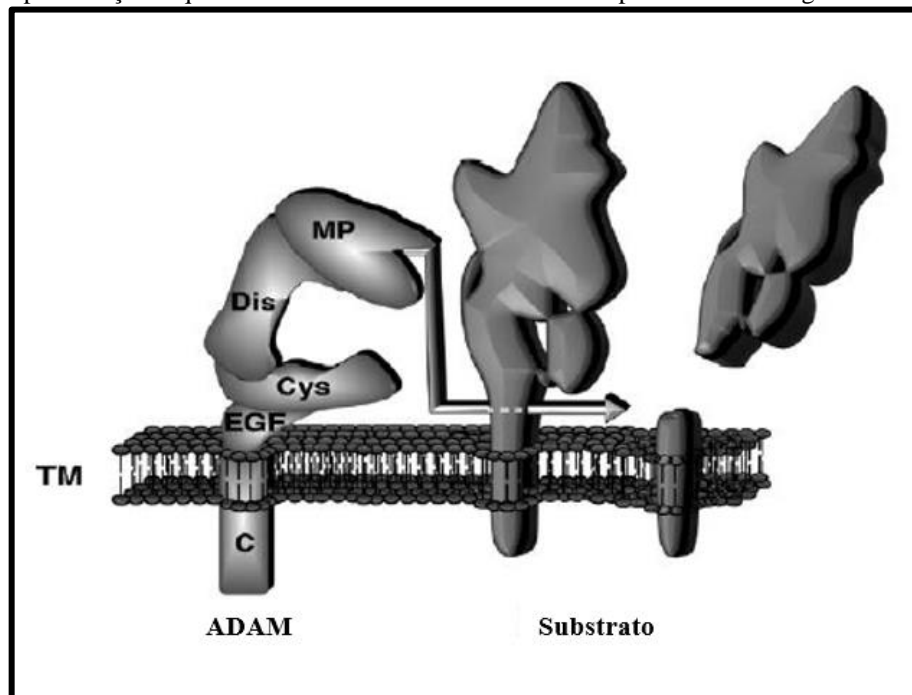
Inicialmente, a expressão da ECA 2 foi relatada no coração, nos rins e nos testículos (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000). Mas, estudos posteriores evidenciaram a expressão da ECA 2 em uma ampla diversidade de tecidos, abrangendo o cérebro e a maioria dos tecidos cardiovasculares (Igase et al., 2005, Sakima et al., 2005, Doobay et al., 2007). A presença da proteína e do mRNA da ECA 2, no cérebro de camundongos, já foi relatada em núcleos envolvidos na regulação central da função cardiovascular, como o órgão subfornical (SFO), o núcleo paraventricular (PVN), o núcleo do trato solitário (NTS) e o bulbo ventrolateral rostral (RVLM), bem como em áreas não envolvidas com a regulação cardiovascular, como o córtex motor e núcleos da rafe, sendo expressa predominantemente em neurônios (Doobay et al., 2007).

Estudos também denotam que a superexpressão da ECA 2, em neurônios, além de atenuar a expressão do AT1R, aumenta a expressão dos receptores Mas e AT2R, enquanto que o bloqueio do AT1R aumenta a atividade da ECA 2 presente no cérebro de camundongos hipertensos, deslocando o equilíbrio do SRA para o eixo da proteção, (Xiao et al., 2009; Sriramula et al., 2011; Feng et al., 2010; Xia et al., 2009). Além disso, a infusão sistêmica ou a injeção intracerebroventricular da Ang II causam um *down-regulation* da ECA 2 e um *up-regulation* do AT1R, presentes no tronco cerebral, SFO e PVN, sendo essa condição revertida por meio da superexpressão da ECA 2 humana, comprovando que a expressão da ECA 2 e os níveis de AT1R parecem estar intimamente ligados (Feng et al., 2010; Feng et al., 2008; Sriramula et al., 2011; Gironacci et al., 2014).

2.4 ADAM 17

As ADAMs (A Desintegrin And Metalloproteinase) constituem uma família de proteínas transmembranares, formadas por uma complexa estrutura de multidomínios frente à existência de um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, uma região rica em cisteína, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal, região transmembrana e uma cauda citoplasmática, como evidenciado na Fig. 4 (Wolfsberg et al., 1995; Reiss et al., 2009). O domínio metaloprotease é o principal responsável pela atividade enzimática das ADAMs, por promover a liberação de ectodomínios de moléculas alvos (Seals; Courtneidge, 2003). Entre os alvos relevantes das ADAMs estão as citocinas, os fatores de crescimento, seus receptores e moléculas de adesão, no qual provocam processos de sinalização, adesão, migração e proteólise (Murphy, 2008).

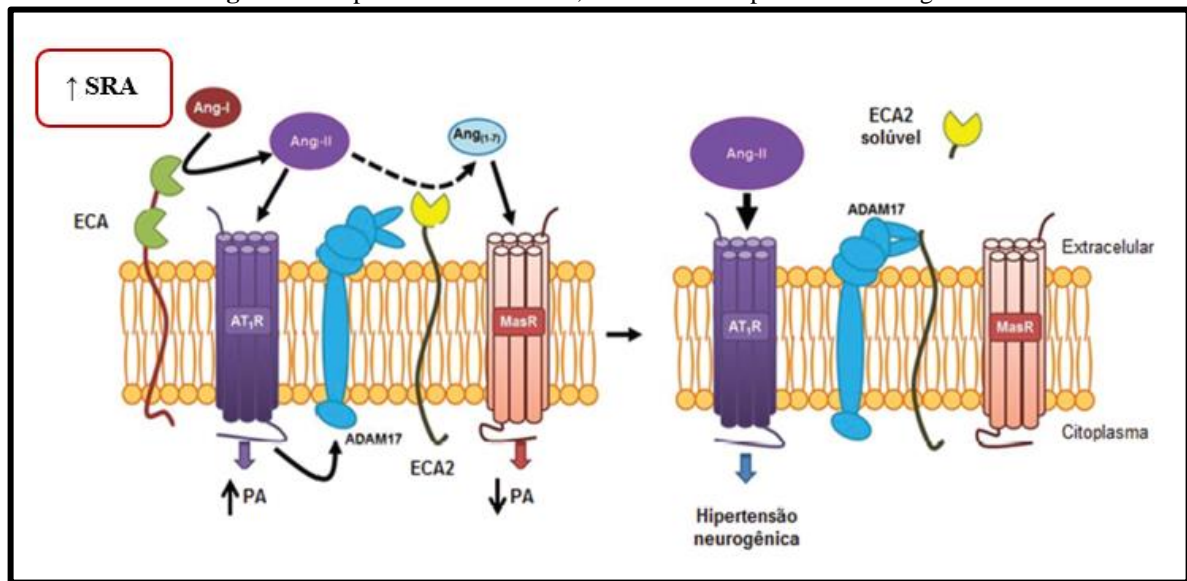
Figura 4 – Representação esquemática da estrutura das ADAMs e do processo de clivagem de substratos alvos.



MP: domínio metaloprotease; Dis domínio desintegrina); Cys: região rica em cisteína; EGF: domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal); TM: domínio transmembrana; C: domínio citoplasmático. Fonte: Adaptado de Reiss et al., 2009.

A ADAM 17, também denominada como enzima conversora de $\text{TNF}\alpha$ (TACE) por ser responsável pela conversão do $\text{TNF}\alpha$ em sua forma solúvel, foi a primeira proteína identificada da família das ADAMs e a melhor estudada até o presente momento (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Entre outras funções, a ADAM 17 é a principal responsável pela liberação da forma solúvel da ECA 2, pelo processo conhecido como *shedding*, no qual ocorre a clivagem e a liberação do ectodomínio cataliticamente ativo da ECA 2, presente na superfície celular, para o meio extracelular (Lambert et al., 2005; Iwata et al., 2009). A relevância fisiológica da ECA 2 solúvel ainda não é totalmente compreendida, mas foi notado que sua atividade no plasma é aumentada em pacientes com insuficiência cardíaca crônica, além de estar associada a uma maior disfunção cardíaca (Epelman et al., 2008; Epelman et al., 2009; Iwata et al., 2009). Ademais, Xia et al. (2013) constataram que a ativação dos receptores AT1R mediada pela Ang II, no cérebro, promovem uma regulação positiva da ADAM 17, que, por sua vez, viabiliza o *shedding* da ECA 2, prejudicando a atividade compensatória cerebral da ECA 2, contribuindo para o desenvolvimento da hipertensão neurogênica (Figura 5).

Figura 5 – Hiperatividade do SRA, ADAM 17 e hipertensão neurogênica.



Com o aumento da atividade do SRA, a Ang II se liga ao seu receptor AT1R e promove a ativação e o aumento da expressão do ADAM17, que por sua vez cliva a ECA2, resultando em níveis reduzidos de ECA2 na membrana, diminuindo a formação de Ang 1-7 e seu efeito compensatório, contribuindo para o desenvolvimento da hipertensão neurogênica. (Ang I: angiotensina I; Ang II: angiotensina II; Ang 1-7: angiotensina 1-7; AT1R: receptor de angiotensina do tipo 1; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; ADAM17: desintegrina e mataloprotease 17; MasR: receptor específico para Ang 1-7, receptor Mas). Fonte: Adaptado de Xia et al., 2013.

2.5 Agonismo tendencioso no AT1R

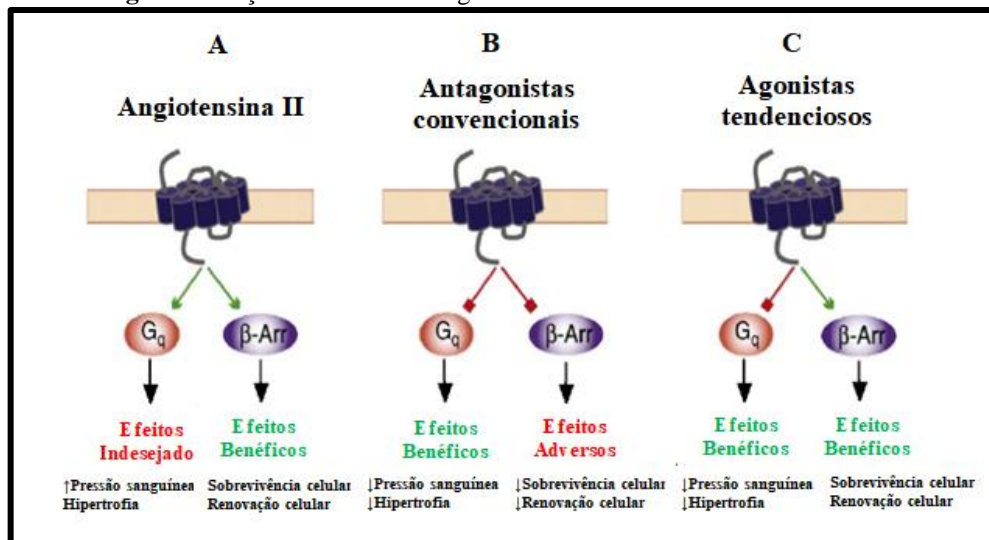
O receptor AT1R é integrante da família dos GPCRs (Receptores Acoplados a Proteína G), também conhecidos como receptores de sete domínios transmembranares (7TMRs), devido a sua estrutura que contém sete domínios transmembranários α -helíce, além de três alças extracelulares que possui a amina terminal e três alças intracelulares que integra o carboxi-terminal e a proteína G (Venkatakrishnan et al., 2013).

A cascata de sinalização do AT1R se dá início perante o acoplamento de um ligante, presente no meio extracelular, ao receptor. Assim, diante da ligação da Ang II ao AT1R ocorre uma alteração na conformação do receptor, que resulta na ativação da proteína G, por meio da mudança de ligação do GDP para GTP na subunidade $G\alpha$, e na dissociação da proteína G heterotrimérica nas subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$. Uma vez dissociada, a subunidade $G\alpha$ ativa a fosfolipase C (PLC) que ao atuar no fosfolípido de membrana PI_2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato), fornece o IP_3 (trifosfato de inositol) e o DAG (diacilglicerol). O IP_3 atua aumentando o influxo de cálcio proveniente do retículo endoplasmático, que subsequentemente ativa a proteína quinase C (PKC) e a calmodulina, que também atua ativando a PKC e outras proteínas quinases. O DAG, por sua vez, é responsável por ativar diretamente a PKC, que age

fosforilando proteínas alvo e gerando respostas no sistema biológico, como o aumento da pressão sanguínea e a hipertrofia (Aplin et al., 2009; Zimmerman et al., 2012; Xiao et al., 2010).

Após a ativação, a porção citosólica do AT1R é fosforilada por quinases de receptores acoplados à proteína G (GRK), dando início ao processo de dessensibilização. Assim, a porção fosforilada do receptor promove o recrutamento da β -arrestina, que se liga ao AT1R e promove uma interferência na interação entre o receptor e a proteína G, acarretando na internalização do receptor e na interrupção da sinalização (Lefkowitz et al., 2005). Além disso, sabe-se que é possível ocorrer a ativação da β -arrestina gerando segundos mensageiros, tais como a MAPK, PI3K e Akt, que ativam outras cascatas de sinalização, independentes da proteína G, atuando nos processos de renovação e sobrevivência celular (Aplin et al., 2009; Ikeda et al., 2015). Esta ativação seletiva também pode ser obtida mediante ao uso de agonistas tendenciosos. O agonismo tendencioso trata-se de um termo utilizado para definir ligantes capazes de se conectarem a receptores acoplados a proteína G, produzindo e direcionando seletivamente uma via de sinalização específica, que pode ser dependente de proteína G ou da β -arrestina, como exposto na Fig. 6 (Kenakin, 2007; Azzi et al., 2003).

Figura 6 – Ações de diferentes ligantes no AT1R e seus efeitos sistêmicos.



(A) AngII: agonista endógeno do AT1R. A AngII ativa a sinalização mediada pela proteína G e pela β -arrestina. (B) Antagonistas convencionais: Inibem a via de sinalização da proteína G e da β -arrestina. (C) Agonistas Tendenciosos (TRV027): Inibem a sinalização da proteína G, mas ativam a sinalização mediada pela β -arrestina. Fonte: Adaptado de Aplin et al., 2009.

2.6 TRV027

Entre os agonistas tendenciosos para a via da β -arrestina destaca-se o octapeptídeo TRV027 (ou TRV120027), um análogo da Angiotensina II que possui substituição em seu

primeiro aminoácido por Sarcosina e no último aminoácido por D-alanina (Violin et al., 2010). A Tab. 3 ilustra de forma comparativa a sequência de aminoácidos da Ang II e do TRV027.

Tabela 3 – Sequência de aminoácidos comparativos entre a Ang II e o TRV027.

Agonista	Sequência Peptídica							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ang II	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe
TRV027	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	D-Ala

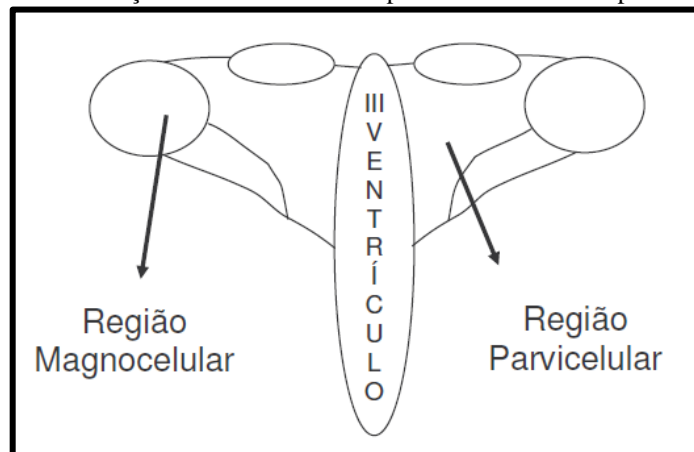
Fonte: Autor (2017).

Além de possuir alta afinidade pelo AT1R ($K_D=19$ nM), estudos também apontam a eficácia do TRV027 em reduzir a pressão arterial e aumentar o desempenho cardíaco. Isto se deve ao fato do TRV027 não ativar a via da proteína G ao mesmo tempo em que não bloqueia os efeitos benéficos da via da β -arrestina, ou seja, não causa o efeito inotrópico negativo característico dos antagonistas. (Violin et al., 2010; Boerrigter et al., 2011; Boerrigter et al., 2012). O TRV027 é na atualidade o agonista tendencioso mais promissor, encontrando-se em testes clínicos de Fase IIb (BLAST-AHF), visando determinar a dose e o desempenho da droga para o tratamento de insuficiência cardíaca (Felker et al., 2015). Portanto, o TRV027 se mostra um exemplo promissor na evolução de pesquisas ao GPCR para o desenvolvimento de medicamentos inovadores (Ikeda et al., 2015).

2.7 Núcleo para-ventricular do hipotálamo

O PVN localiza-se adjacente ao 3^a ventrículo do prosencéfalo, no qual pode ser dividido em duas regiões fundamentais: magnocelular e parvicelular (Figura 7). Os neurônios magnocelulares se localizam nas porções laterais do PVN e atuam na síntese da vasopressina, enviando-a até a hipófise posterior através de projeções neuronais para ser armazenada e posteriormente liberada na circulação, onde atua no controle da pressão arterial da volemia e da osmolaridade no organismo frente ao seu efeito renal de retenção hídrica e vasoconstritora (Badoer, 2011; Aires, 2012; Blair et al., 1996). Os neurônios parvicelulares, por sua vez, se localizam na região medial do núcleo e compõem uma população heterogênea de neurônios que se diferem de acordo com o padrão de disparo, as projeções, a localização dentro do PVN e a morfologia. Parte desses neurônios se projetam para outras regiões do SNC envolvidas no controle das funções autônomas, (Braga et al., 2011; Badoer, 2001; Blair et al., 1996).

Figura 7 – Localização e divisão do núcleo para-ventricular do hipotálamo (PVN).



Fonte: Adaptado de Bair et al., 1996.

A Ang II circulante contribui para o desenvolvimento da hipertensão neurogênica mediante a ativação de uma via presente no SNC em que a região PVN faz parte, o eixo SFO-PVN-RVLM. O SFO é um dos órgãos circumventriculares (CVOs) que não possui proteção pela barreira hematoencefálica, possuindo, assim, livre acesso a Ang II circulante que, ao ativar o receptor AT1R presente no SFO, promove a síntese de Ang II local e a excitação dos neurônios angiotensinérgicos que se projetam para o PVN, desencadeando na produção local de Ang-II em áreas cerebrais protegidas pela barreira hematoencefálica. Além do mais, a ativação do AT1R pela Ang II local causa a excitabilidade dos neurônios presentes na região PVN, no qual se projetam para as regiões da medula espinhal, influenciando diretamente na atividade simpática, e para a região do RVLM, influenciando indiretamente na atividade nervosa simpática (Braga et al., 2011; Nunes e Braga, 2011; Shafton et al., 1998).

Desta forma, a Ang II atua no PVN como um neurotransmissor causando excitabilidade dos neurônios presentes nesta região, promovendo assim alterações no reflexo e/ou atividade simpática e na sensibilidade do barorreflexo, mediante a ativação dos receptores AT1R (Ferguson et al., 2001; Coote, 2007; Burmeister et al., 2011). Algumas das ações da Ang II no núcleo para-ventricular do hipotálamo envolve a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), em decorrência do efeito da Ang II sobre a NADPH oxidase, como na modulação do reflexo aferente simpático cardíaco (Zhang et al., 2006). Segundo Sriramula et al. (2011), a Ang II também atua aumentando a expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias presentes na região PVN, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, que promovem a inflamação vascular com consequente aumento da PA. Sendo estas ações revertidas por meio da superexpressão da ECA 2 no PVN, no qual leva a ativação do eixo anti-hipertensivo do SRA (ECA2/ Ang 1-7/ MAS) e atenua a hipertensão intermediada pela Ang II.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão gênica da ECA 2, da ADAM 17 e do receptor AT1R, na região do núcleo para-ventricular do hipotálamo (PVN), de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos Wistar Kyoto (WKY), tratados e não tratados com o TRV027.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar o tratamento dos ratos Wistar Kyoto e SHR, pertencentes ao grupo experimental, com o agonista tendencioso TRV027;
- Executar a extração de RNA da região do núcleo para-ventricular do hipotálamo de ratos Wistar Kyoto e SHR;
- Otimizar as reações de qPCR em tempo real, para os genes de interesse e de referência;
- Analisar a expressão gênica da ECA 2, da ADAM 17 e do receptor AT1R, a nível de RNA mensageiro.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR), com peso entre 200 g – 300 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada, com ciclo claro-escuro de 12:12 horas e com acesso livre a água e a ração (Labina®, Purina). Todos os experimentos desenvolvidos foram realizados seguindo os princípios éticos e com a devida aprovação da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba - UFPB sob parecer nº 067/2016.

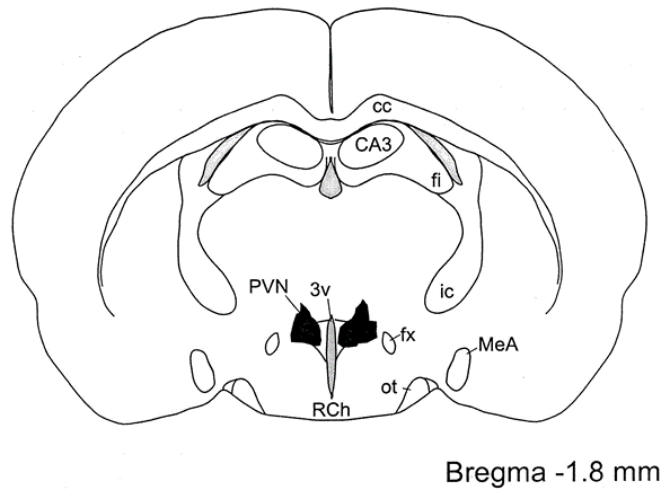
4.2 Tratamento

Os animais do grupo experimental foram tratados com a droga TRV027, a qual foi cedida pelo laboratório do Prof. Dr. Eric Lazartiques, da Louiseane States Univerty, Health Sciences Center (LA – EUA). O TRV027 foi solubilizado em solução salina e administrado aos animais com auxílio de minibombas osmóticas (Alzet ®), que possuem a capacidade de administrar soluções de forma contínua e precisa em animais de laboratório, garantindo a eliminação da necessidade de uma dosagem repetitiva e o manuseio frequente dos animais. Assim, as minibombas osmóticas foram acopladas a uma cânula guia previamente instalada no ventrículo lateral direito por meio da cirurgia estereotáxica para posteriormente serem implantadas na região subcutânea dos animais. A bomba inoculava a droga em uma concentração de 20 ng por hora, com um volume de 20 µL por hora continuamente durante duas semanas.

4.3 Coleta das amostras

Os animais foram eutanasiados por decapitação com 13 semanas de idade. Imediatamente após a eutanásia, os cérebros dos animais foram retirados e armazenados a -80 °C até a realização da coleta da área de interesse do estudo, a região do núcleo para-ventricular do hipotálamo (PVN), identificada de acordo com o Atlas de Paxinos & Watson (1998) como demonstrado na Fig. 8, foi cuidadosamente cortada e coletada com o auxílio do Criostato Leica CM1850 sob *Tissue Tek*. Após as coletas, as amostras foram armazenadas e congeladas, até o período de realização dos experimentos, em *ependorfs* devidamente identificados contendo o reagente de estabilização RNA Later (Sigma™).

Figura 8 - Coordenada do núcleo para-ventricular do hipotálamo.



Fonte: Paxinos e Watson (1998).

4.4 Extração de RNA

A extração de RNA foi conduzida de acordo com as recomendações do fabricante TRI Reagent® (Sigma). Desta forma, a lise do tecido foi obtida perante a homogeneização das amostras junto a 500 µL de TRI Reagente, que possui a capacidade de desestabilizar as células e permite a dissociação dos complexos nucleoproteicos. A seguir, adicionou-se 100 µL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos e posterior incubação à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. A mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C, obtendo-se a formação de três fases: a orgânica (proteína), a interfase (DNA) e a fase aquosa, que possui o componente de interesse para presente estudo, o RNA.

Assim, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e, em seguida, foram adicionados 250 µL de isopropanol para a precipitação do RNA. O material foi incubado por 10 minutos em temperatura ambiente e posteriormente centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Após o processo de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado pela adição de 500 µL de etanol 75%, seguido de vortex e centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C. O sedimento foi rapidamente seco ao ar livre e dissolvido em 30 µL de água livre de ribonucleases (RNase free).

4.5 Quantificação e qualificação do RNA

A quantificação do RNA total foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) a uma absorvância de 260 nm. Para atestar a qualidade da extração do RNA foi empregada a relação entre as absorvâncias 260/280 nm, cuja razão esperada para a aceitação da amostra deve estar entre 1,8 e 2,0. Assim, a análise foi realizada

utilizando-se 1 μL de cada amostra de RNA e 1 μL de água RNase *free* como branco para zerar o equipamento. A integridade do RNA extraído foi verificada mediante a eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 0,5 X (Tris-base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM e pH 8). Logo, 1 μg de cada amostra de RNA foi submetida junto ao corante GelRed™ (Uniscience) e ao tampão de carga, a uma corrente constante de 100V durante 40 minutos em um sistema de eletroforese horizontal. Posteriormente, os RNAs foram visualizados por meio do equipamento ChemiDoc™ XRS + (BioRad) utilizando-se o software Image Lab (BioRad).

4.6 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA (DNA complementar) foi realizada utilizando o Kit Verso cDNA Synthesis (Thermo Scientific). Assim, 0,8 μg de RNA total foram adicionados a um *microtubo* contendo o tampão (5X), o mix de dNTPs, o *primer*, o enhancer, a enzima transcriptase reversa e água, totalizando um volume final de 20 μL , como exposto na Tab. 4. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, diferindo apenas na substituição de RNA por água livre de RNases. Em sequência, a reação foi incubada a 42 °C por 30 minutos e posteriormente a 95 °C durante 2 minutos para a inativação da enzima. Todas as incubações foram efetuadas no equipamento Rotor-Gene Q (QIAGEN). O cDNA foi armazenado a -20 °C até a realização da amplificação.

Tabela 4 - Componentes da síntese de cDNA para a RT-PCR.

REAGENTES	VOLUME E CONCENTRAÇÃO
Tampão (5X)	4 μL (1X)
dNTP	2 μL (500 μM)
<i>Primer</i>	1 μL
Enhancer	1 μL
Enzima RT	1 μL
RNA	0,8 μg
Água	11 μL
Volume Total	20 μL

4.7 PCR Quantitativa em Tempo Real

Os experimentos para a análise de expressão do RNA mensageiro de interesse foram realizados utilizando o reagente Hot FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (5X) (Solis

BioDyne). A qPCR em tempo real, foi efetuada a partir de 2 μL do cDNA sintetizado à um *ependorff* contendo os componentes da reação, que estão listados na Tab. 5, para o volume total de 15 μL . As sequências dos *primers* específicos para os genes referência e de interesse, estão disponibilizadas na Tab. 6. A amplificação dos fragmentos alvos foi executada no termociclador Rotor-Gene Q (QIAGEN), com um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 15 segundos, o anelamento a 60 °C por 20 segundos e alongamento a 72 °C durante 20 segundos.

Tabela 5 - Componentes da reação de qPCR em tempo real.

REAGENTES	VOLUME E CONCENTRAÇÃO	
	ECA2	GAPDH
Mix	3 μL	3 μL
Primer	2,4 μL (0,4 μM)	3 μL (0,2 μM)
Água	7,6 μL	7 μL
cDNA	2 μL	2 μL
Volume Total	15 μL	15 μL

Tabela 6 - Descrição dos *primers* utilizados nas reações de qPCR em tempo real.

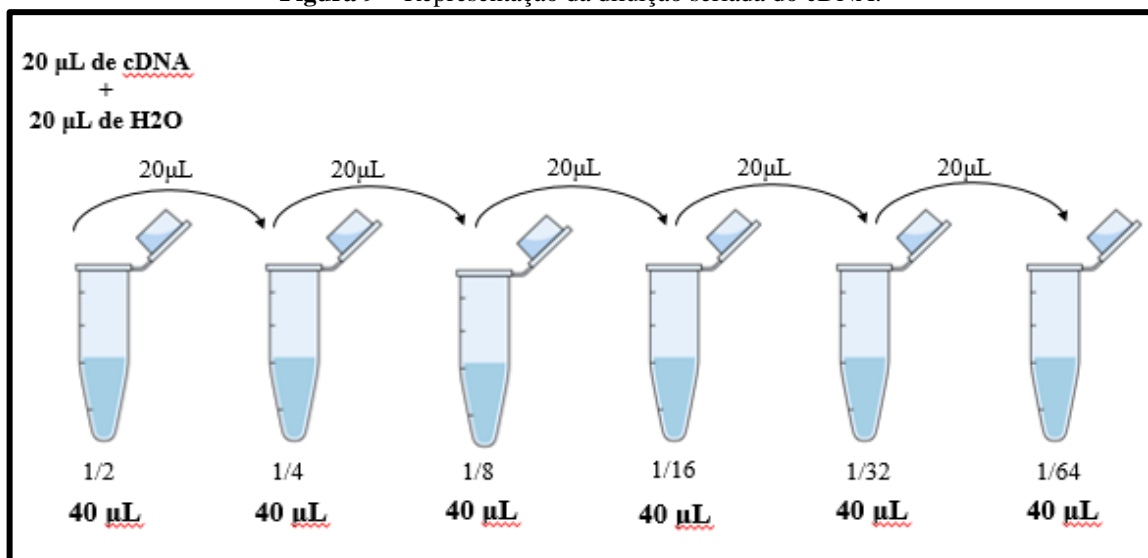
Gene	Primers	Sequência	Tm	Ampl.
ECA2	Forward	ACCCTTCTTACATCAGCCCTACTG	58,1	67
	Reverse	TGTCCAAACCTACCCACATAT	56	
ADAM17	Forward	CAGGACGTAATTGAGCGGTTTT	55,7	83
	Reverse	AACGATGTTGTCTGCCAGAAACT	55,1	
AT1R	Forward	CAAAAGGAGATGGGAGGTCA	54,3	253
	Reverse	TGACAAGCAGTTTGGCTTTG	54,2	
GAPDH	Forward	TCCATGACAACCTTTGGCATTG	66,7	103
	Reverse	TCACGCCACAGCTTTCCA	67,0	

ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; ADAM17: desintegrina e metaloprotease 17; AT1R: receptor de angiotensina do tipo 1; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

4.8 Otimização da qPCR em Tempo Real

A otimização do processo de qPCR em tempo real foi atestada perante a realização da curva padrão e da curva de validação dos *primers* utilizados. Assim, a curva padrão e de validação foram obtidas mediante a realização de uma diluição seriada do cDNA amplificado para cada gene em estudo (Fig. 9). Após a amplificação a curva padrão foi plotada em uma representação gráfica de regressão linear a partir da correlação do Ct (*Cycle Threshold*) com a concentração de cDNA em cada ponto da diluição. A partir do gráfico foi mensurado os valores do coeficiente angular da reta (slope), do coeficiente de correlação (R^2) e a eficiência da reação (E) de amplificação com os *primers* utilizados. A curva de validação, por sua vez, foi obtida correlacionando o ΔCt (Ct do gene de estudo – Ct do gene de referência) com o Log de diluição do cDNA, no qual o valor do slope foi mesurado como o “a” da equação gerada a partir da curva.

Figura 9 – Representação da diluição seriada do cDNA.



Utilizou-se 20 µL de cDNA e 20 µL de água livre de RNases para a solução matriz com um volume final de 40 µL, retirando-se 20 µL de cada diluição e completado o volume de 40 µl com água. Fonte: Autor (2017).

4.9 Análise dos Resultados

Os dados obtidos a partir da PCR em tempo real foram analisados utilizando o Q-Rex Software (QIAGEN). A averiguação da expressão dos genes ECA2, ADAM 17, AT1R e do GAPDH, ao nível de RNA mensageiro, foi obtida mediante a quantificação relativa do Método de Ct Comparativo (expressão relativa = $2^{-\Delta\Delta ct}$). Para a análise estatística foi aplicado a análise de variância (ANOVA) seguido do Studentized Newman Keuls (SNK), sendo as diferenças entre os grupos consideradas significativas quando $p < 0,05$. O programa utilizado foi o GraphPad Prism versão 7.00®.

5 RESULTADOS

5.1 Quantificação e qualificação das amostras de RNA

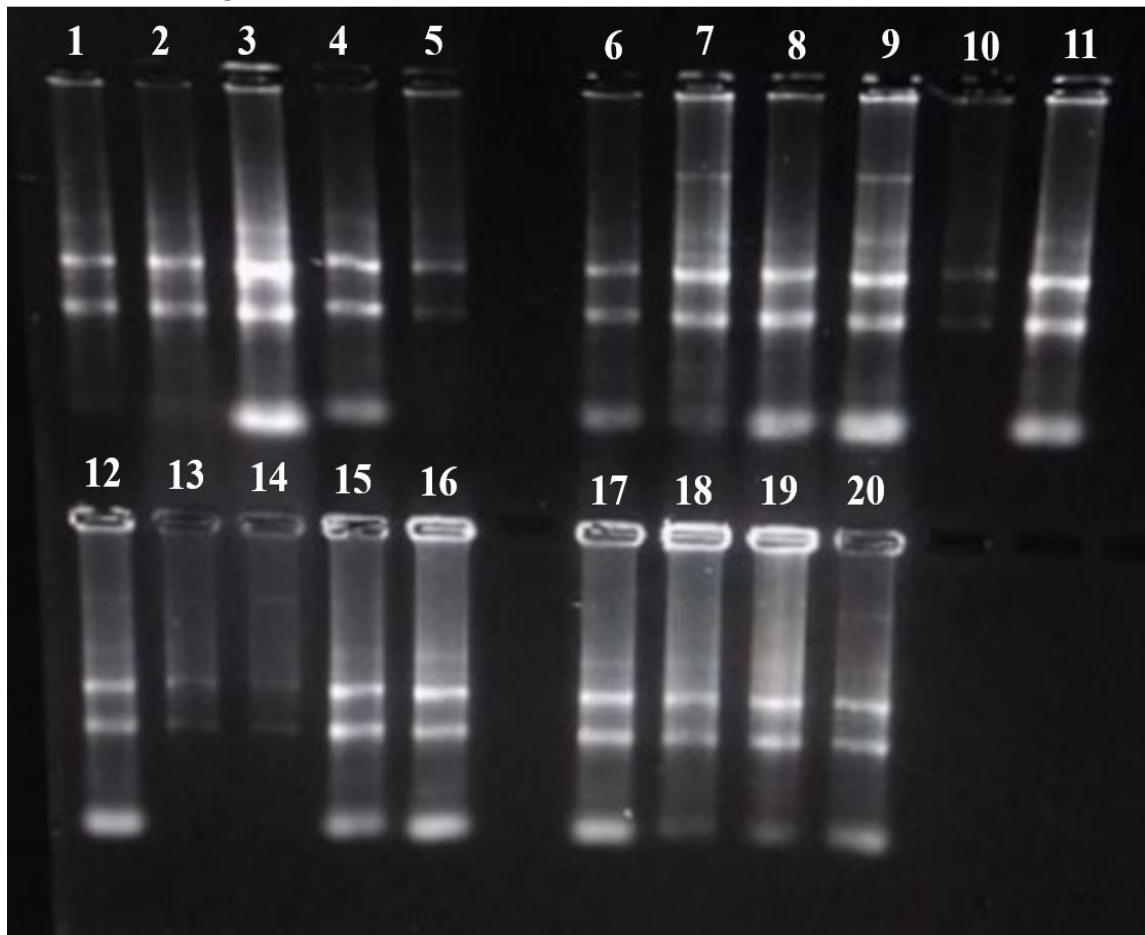
O quadro 1 apresenta as concentrações das amostras de RNA total, obtidas da região PVN de animais normotensos e espontaneamente hipertensos, pertencentes ao grupo controle e ao grupo experimental tratado com o agonista tendencioso TRV027. A qualidade da extração foi determinada por meio da análise de pureza do RNA, estimada pela razão entre as absorbâncias medidas a 260 e 280 nm, que deve ser igual ou superior a 1,75. Desta forma, uma amostra de RNA pura deve ter uma relação A260/A280 entre 1,8 a 2,0, valores inferiores a estes resultam que ocorreu contaminação por proteína (Chong et al., 2001). As razões A260/A280 das preparações de RNA total, extraídos da região PVN, ficaram entre 1,6 e 1,9.

Quadro 1 – Quantificação e relação 260/280 dos RNAs total extraídos da região PVN.

	AMOSTRAS	Concentração (ng/μL)	260/280
Grupo Controle WKY	WCP2	138,3	1,7
	WCP3	104,5	1,7
	WCP5	465,2	1,9
	WCP6	139,2	1,8
	WCP8	73,5	1,6
Grupo Experimental WKY	WTP1	101,4	1,6
	WTP2	127,6	1,9
	WTP6	112,9	1,7
	WTP7	236,3	1,8
	WTP9	187,7	1,8
Grupo Controle SHR	SCP1	258,1	1,7
	SCP2	134,8	1,7
	SCP3	97,7	1,6
	SCP10	87	1,8
	SCP11	88,3	1,7
	SCP12	224,8	1,8
Grupo Experimental	STP3	111,3	1,8
	STP4	353,2	1,8
	STP8	212,1	1,7
	STP9	149,4	1,7

A eletroforese em gel de agarose 1% também foi empregada para analisar a integridade do RNA total extraído. Na Fig. 10, pode-se observar as bandas 28s e 18s do RNA ribossômico e um perfil eletroforético sem arraste, indicando a integridade das amostras de RNA extraídas da região do núcleo para-ventricular do hipotálamo de ratos Wistar Kyoto e SHR, tratados e não tratados com o TRV027 (Streit et al, 2008). A utilização de um RNA intacto é um elemento chave para a aplicação bem-sucedida de métodos modernos da biologia molecular, como a qPCR em tempo real (Becker et al., 2010). Segundo Vermeulen et al., (2011), a qualidade e a integridade, do RNA total extraído, são pontos cruciais para conseguir um cDNA representativo dos genes expressos e conseqüentemente para a obtenção de dados de expressão gênica significativos e confiáveis, além de assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

Figura 10 - Perfil da eletroforese das amostras de RNAs total extraído.



Amostras 1-5 (Grupo Controle WKY); Amostras 6-11 (Grupo Experimental WKY); Amostras 12-16 (Grupo Controle SHR); Amostras 17-20 (Grupo Experimental SHR).

5.2 Otimização da qPCR em Tempo Real

5.2.1 Curva padrão da ECA2, ADAM 17, AT1R e GAPDH

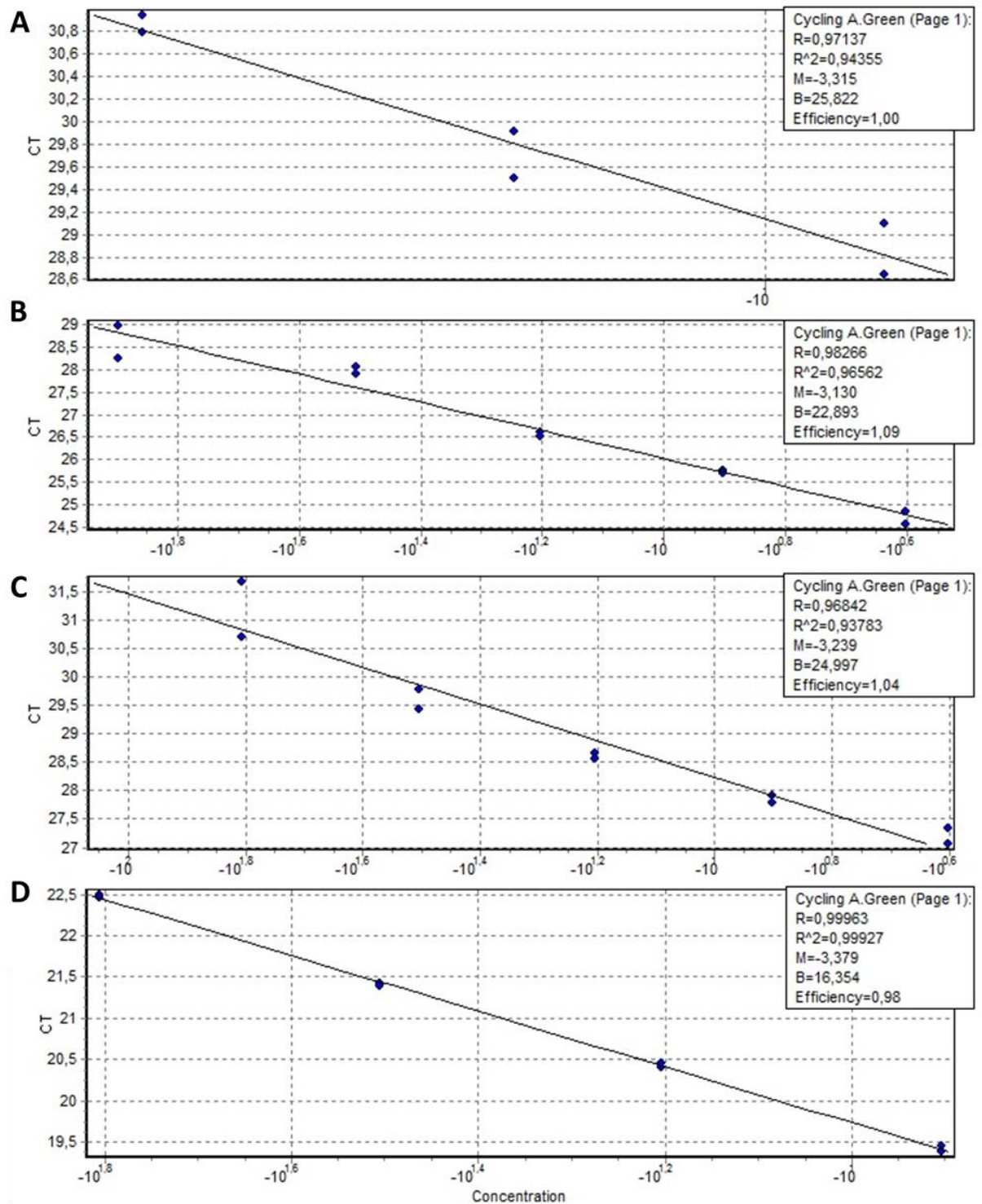
A eficiência da reação de amplificação foi atestada perante a construção da curva padrão, responsável por traçar o Ct (Threshold Cycle) contra a concentração do *template*, utilizando isoladamente os *primers* específicos para a amplificação dos genes da ECA2, ADAM 17, AT1R e do GAPDH. Para a obtenção de uma curva padrão de qualidade é necessário que os valores do coeficiente de correlação (R^2) seja próximo de 1.0 e que a inclinação da curva padrão (*slope*) seja entre -3.58 e -3.10, para a eficiência (E) da reação ser próximo de 100% (100 ± 10). A Tab. 7 expõe os valores de R^2 , do *slope* (M) e da eficiência, obtidos dos genes de estudo e do gene de referência, indicando que a PCR quantitativa em tempo real utilizada é confiável para a detecção dos genes da enzima ECA2, da ADAM 17 e do receptor AT1R, de acordo com que é descrito na literatura (Applied Biosystem, 2004; Bustin et al., 2009).

Tabela 7 – Valores obtidos a partir da curva padrão para a otimização do processo de qPCR.

Gene	R^2	M (<i>slope</i>)	Eficiência
ECA2	0,94	-3,31	1.00 (100%)
ADAM 17	0,96	-3,13	1.09 (109%)
AT1R	0,93	-3,23	1.04 (104%)
GAPDH	0,99	-3,37	0.98 (98%)

Segundo Bustin et al. (2009), a curva padrão fornece uma indicação simples, rápida e reprodutível da eficiência média da PCR quantitativa, da sensibilidade analítica e da robustez do ensaio. A análise utilizando a curva padrão também simplifica os cálculos e as soluções de problemas teóricos e práticos nas avaliações dos resultados da qPCR (Larionov et al., 2005). A Fig. 11 fornece a análise do gráfico gerado pela curva padrão para os genes de estudo (ECA 2, ADAM 17, AT1R) e para o gene de referência (GAPDH).

Figura 11 - Curva padrão obtida pela PCR em tempo real para os genes da ECA2, ADAM17, AT1R e GAPDH.

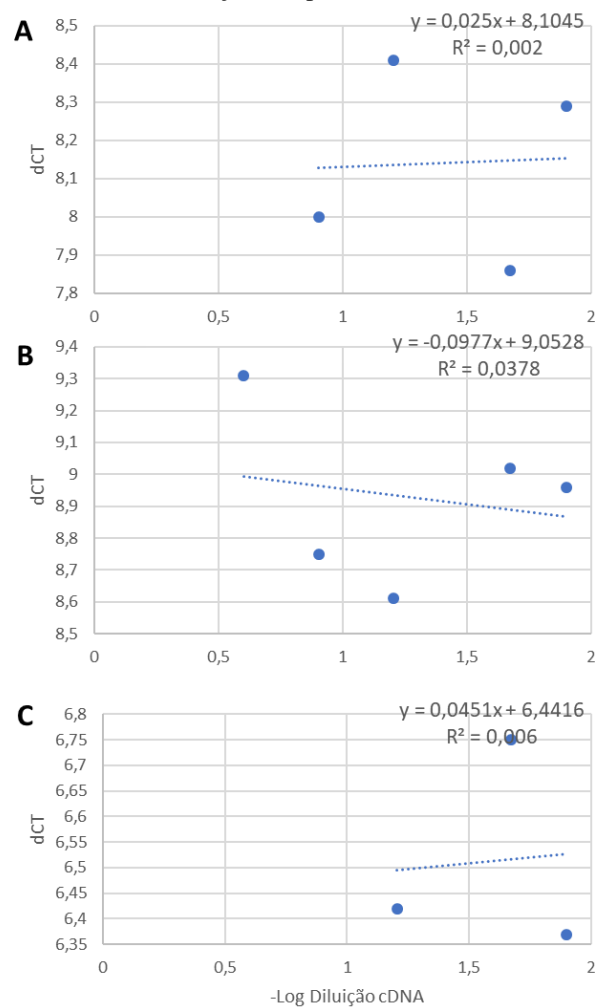


A – Curva padrão da ECA2: R² = 0,94, M = -3,31; E = 1,00. B – Curva padrão do ADAM17: R² = 0,96, M = -3,13, E = 1,09; C – Curva Padrão do AT1R: R² = 0,93, M = -3,23, E = 1,04; D - Curva padrão do GAPDH: R² = 0,99, M = -3,37, E = 0,98.

5.2.2 Curva de validação dos *primers* ECA 2, ADAM 17 e AT1R

Uma análise de quantificação relativa, pelo método do Ct comparativo, é considerada válida quando a eficiência da amplificação do gene de estudo e do gene de referência são aproximadamente iguais. Assim, para a validação da eficiência e especificidade de amplificação dos iniciadores dos genes de interesse ECA 2, ADAM 17 e AT1R, foram gerados gráficos plotando o ΔCT (Ct do gene de estudo – Ct do gene de referência) contra o Log de diluição do *template* de entrada, criando uma linha de regressão semi-logarítmica. A inclinação da linha de regressão semi-logarítmica resultante, ou seja, o slope, é utilizada como o critério geral para a validação do processo e deve ser inferior a 0.1. Na Figura 12, observa-se que o slope, que se encontra como o “a” da equação ($y = ax + b$), foi igual a 0,025, 0,045 e 0,097 para a ECA 2, AT1R e ADAM 17, respectivamente, comprovando a validação dos *primers* utilizados (Applied Biosystems, 2004).

Figura 12 - Curvas de validação dos primers da ECA2, ADAM17 e AT1R.



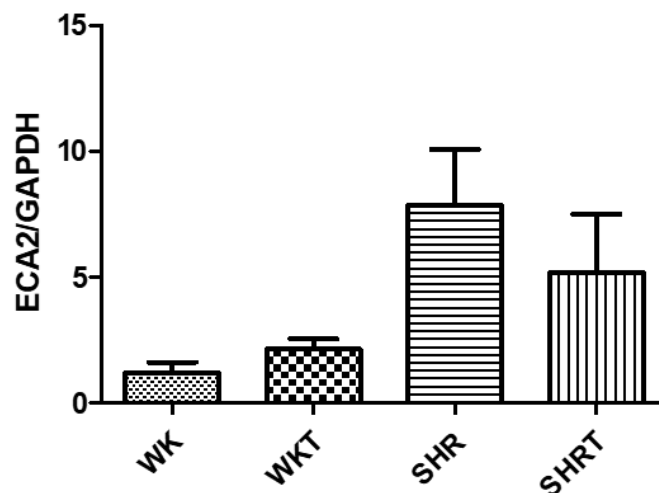
A confiabilidade dos iniciadores foi validada a partir do slope < 0.1. A – ECA2: M = 0,025; B – AT1R: M = 0,097; C – ADAM17: M = 0,045.

5.3 Análises de expressão gênica

5.3.1 Expressão gênica da ECA 2

Como ilustrado na Fig. 13, observamos que os níveis de RNA mensageiro da ECA 2, presente na região do núcleo para-ventricular do hipotálamo, são mais elevados em animais espontaneamente hipertensos quando comparado com os animais normotensos Wistar Kyoto. Analisando o tratamento com o octapeptídeo TRV027 foi constatado que os animais normotensos Wistar Kyoto tratados, obtiveram um aumento não estatisticamente significativo na expressão do mRNA da enzima ECA 2 quando confrontado com os animais não tratados. Divergentemente, em animais espontaneamente hipertensos foi observado que o tratamento com o agonista tendencioso em estudo, promoveu uma diminuição não significativa da expressão da ECA 2 em comparação com os animais SHR não tratados.

Figura 13 - Expressão da enzima ECA 2 na região PVN de ratos WKY e SHR, não tratados e tratados com o TRV027.

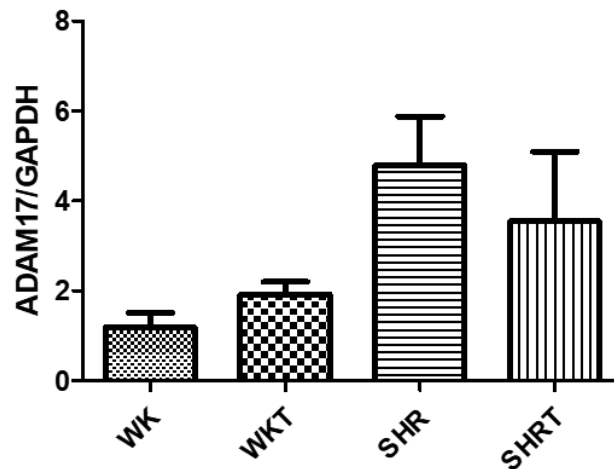


Os dados são normalizados para GAPDH. WK (n = 4); WKT (n = 5); SHR (n = 4) e SHRT (n = 5).

5.3.2 Expressão gênica da ADAM 17

A Fig. 14 expõe que a expressão gênica da metaloproteinase ADAM 17 no núcleo para-ventricular do hipotálamo, a nível de mRNA, é maior em animais espontaneamente hipertensos em contraste com os animais normotensos utilizados neste estudo. Ademais, verifica-se um aumento não significativo nos níveis de RNA mensageiro da ADAM 17 nos ratos Wistar Kyoto tratados quando comparado com os animais controle do mesmo modelo animal. Todavia, em ratos espontaneamente hipertensos constata-se diminuição, não estatisticamente significativo, nos animais tratados com o TRV027, comparando-se com os ratos SHR não tratados.

Figura 14 - Expressão da ADAM 17 na região PVN de ratos WKY e SHR, não tratados e tratados com o TRV027.

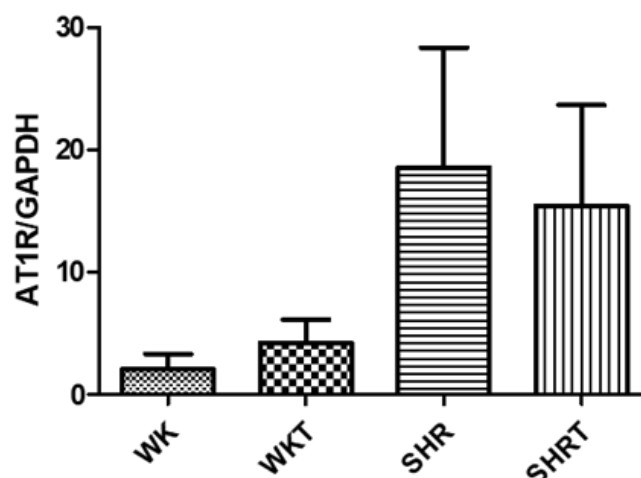


Os dados são normalizados para GAPDH. WK (n = 4); WKT (n = 5); SHR (n = 6) e SHRT (n = 4).

5.3.3 Expressão gênica do AT1R

A partir do cálculo da expressão relativa empregado neste estudo, verificou-se que os receptores AT1R presentes na região PVN são mais expressos, a nível de RNA mensageiro, em animais hipertensos SHR quando confrontado com animais normotensos Wistar Kyoto, como apresentado na Fig. 15. Averiguando o tratamento com o TRV027, observa-se que o tratamento causou um aumento não significativo nos níveis de mRNA do receptor AT1R nos animais normotensos em contraste com os animais normotensos não tratados. Nos ratos espontaneamente hipertensos, por sua vez, verifica-se diminuição na expressão do AT1R em animais tratados, e aumento na expressão do mesmo receptor nos animais não tratados.

Figura 15 - Expressão do receptor AT1R na região PVN de ratos WKY e SHR, não tratados e tratados com o TRV027.



Os dados são normalizados para GAPDH. WK (n = 4); WKT (n = 5); SHR (n = 6) e SHRT (n = 3).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi realizado uma pesquisa molecular da expressão gênica, a nível de mRNA, da enzima ECA 2, da ADAM 17 e do receptor AT1R, presentes na região do núcleo para-ventricular do hipotálamo, em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos que foram tratados e não tratados com o octapeptídeo TRV027. Assim, observou-se que os animais hipertensos possuem maior expressão, não estatisticamente significativa, da enzima ECA 2, da ADAM 17 e do AT1R, em contrapartida com animais normotensos. Além do mais, foi constatado que o tratamento com o TRV027 promove um pequeno aumento nos níveis da ECA 2, ADAM 17 e AT1R, em animais normotensos Wistar Kyoto, enquanto que em animais espontaneamente hipertensos o tratamento com o TVR027 promoveu diminuição não significativa na expressão da ECA 2, ADAM 17 e do receptor AT1R.

No presente estudo, foi verificado um aumento não significativo na expressão da ECA 2, da ADAM 17 e do AT1R em ratos modelo SHR. Em concordância com os resultados deste trabalho, Wang et al. (2017) relataram que os estudos na expressão dos níveis de mRNA da ECA 2 e do AT1R presentes no hipotálamo de ratos Wistar Kyoto e de ratos hipertensos SHR, obtiveram uma alteração não significativa entre os dois grupos. Em contrapartida com os dados obtidos da expressão nos níveis de mRNA da ECA2, o mesmo estudo verificou que a expressão proteica da ECA 2 em SHR foi significativamente inibida em comparação com o grupo de ratos Wistar Kyoto. Assim, sugere-se que o processo de *shedding* mediado pela ADAM 17, é um fator importante para a diminuição dos níveis proteicos da ECA 2, em animais SHR. Tal como relatado por Xia et al. (2013), no qual foi observado que no modelo de hipertensão DOCA-Sal é evidenciado uma redução na expressão e na atividade da ECA 2, mas em camundongos nocautes para ADAM 17 a redução é prevenida, sendo a ativação do receptor AT1R, pela Ang II, responsável por estimular a ADAM 17, reduzindo assim os efeitos compensatórios da ECA 2 na hipertensão DOCA-Sal.

Porém, em oposição aos resultados obtidos neste estudo, outros trabalhos apontam que os níveis do receptor AT1R presente no hipotálamo, são aumentados em muitos modelos animais de hipertensão, incluindo no modelo SHR (Veerasingham e Raizada, 2003). Além do mais, a literatura sugere a existência de uma interação importante entre a atividade ECA 2 e AT1R na hipertensão, devido à estudos que evidenciaram um *down-regulation* do AT1R e atenuação da hipertensão neurogênica, perante a superexpressão da ECA 2 no cérebro de ratos, enquanto que também é evidenciado um *down-regulation* da ECA 2 no coração, rim e cérebro de vários modelos de animais hipertensos e em populações de pacientes, sendo este *down-*

regulation comumente atribuído a ativação do receptor AT1R (Sriramula et al., 2011; Feng et al. 2010; Xia e Lazartiques, 2008).

Neste projeto, também foi demonstrado que em ratos Wistar Kyoto o tratamento com o TRV027 promoveu um pequeno aumento não significativo na expressão dos níveis de ECA 2, ADAM 17 e AT1R. É sabido que o agonista tendencioso TRV027 diminui a pressão arterial pela inibição da vasoconstrição mediada pela ativação do receptor AT1R com subsequente ativação da via de sinalização da proteína G (Ikeda et al., 2015). Mas, os efeitos de redução da PA por intermédio do TRV027 só são observados em indivíduos com o sistema renina-angiotensina ativado, fornecendo um recurso de segurança intrínseco, devido ao fato do TRV027 apresentar efeito apenas em indivíduos com a fisiopatologia alvo, isto é, com o SRA ativado (Soergel et al., 2013). O losartan, um antagonista do receptor AT1R, também atua diminuindo a pressão arterial em ratos hipertensos SHR, bem como em outros modelos de hipertensão, mas não afeta a PA em animais normotensos (Veerasingham e Raizada, 2003). Adicionalmente, em um estudo realizado por Souza et al. (2013), o tratamento com o losartan também não apresentou alteração na expressão da enzima ECA 2, bem como nos receptores AT2R e MAS e na enzima ECA, presentes nas artérias coronárias dos corações de ratos machos Wistar, sugerindo, pois, que em ratos normotensos, o TRV027, assim como o losartan, não interferem na expressão gênica dos componentes do sistema renina-angiotensina, como também não interferem na pressão arterial de animais e indivíduos que não possuem o SRA ativado.

Por fim, este estudo apontou que o tratamento com o TRV027, em ratos SHR, promove diminuição não significativa na expressão dos genes da ECA 2, ADAM 17 e AT1R. Sugerindo que o agonista tendencioso TRV027 do receptor AT1R não influencia, ou influencia pouco na expressão dos níveis mRNA da ECA2, ADAM 17 e AT1R presentes na região PVN, para o modelo animal SHR. Segundo dados de Gowrisankar e Clark (2016), a incubação de astrócitos com o losartan também não apresentou diferença nos níveis de mRNA da enzima ECA 2 em comparação com os níveis basais de amostras provenientes do tronco encefálico e do cerebelo de animais normotensos e SHR. É descrito que a regulação do gene da ECA 2 também pode depender diretamente de fatores como a idade, o sexo, os hormônios do estresse, a epigenética e a ingestão de sódio (Williamson et al., 2017). Também já foi relatado a existência de um mecanismo de feedback entre os níveis de Ang 1-7 e ECA 2, onde o nível elevado de Ang 1-7 possa ser responsável pela diminuição da circulação de ECA2 (Tan et al., 2011), comprovando a complexidade presente na regulação da enzima ECA 2 no organismo biológico. De acordo com Xia et al. (2013), em animais hipertensos DOCA-Sal, o bloqueio do AT1R com o losartan, impediu o aumento da expressão dos níveis da ADAM 17, em correspondência a este trabalho,

no qual também se evidenciou diminuição na expressão do mRNA da ADAM 17 em ratos tratados com o TRV027, mas os resultados não foram estatisticamente significativos. Ademais, se sugere que o TRV027 promova a internalização com consequente dessensibilização do receptor AT1R mediante a ativação da β -arrestina (Ikeda et al., 2015). Em conformidade, este estudo apontou uma diminuição na expressão dos níveis do AT1R em animais SHR tratados com o TRV027, porém não foi significativo estatisticamente.

7 CONCLUSÃO

Em concordância à hipótese preliminar levantada neste estudo, foi observado um aumento, não estatisticamente significativo, nos níveis de RNA mensageiro da enzima ADAM 17 e do receptor AT1R, em animais espontaneamente hipertensos. Porém, no mesmo modelo animal, foi observado níveis elevados de mRNA da ECA 2, provavelmente devido a ação do mecanismo de compensação homeostático, em resposta aos níveis elevados de Ang II em animais SHR. A partir dos dados obtidos também podemos concluir que o tratamento com o agonista tendencioso TRV027, em ratos normotensos Wistar Kyoto e em ratos espontaneamente hipertensos SHR, não influencia de maneira estatisticamente significativa a expressão em nível de RNA mensageiro da ECA 2, da ADAM 17 e do receptor AT1R, presentes no núcleo para-ventricular do hipotálamo (PVN).

Levando em conta que os agonistas tendenciosos, como o TRV027, são uma importante ferramenta para o desenvolvimento de drogas com potencial terapêutico, devido a capacidade de inibir seletivamente vias de sinalização que acarretam na diminuição da ocorrência de efeitos colaterais, este estudo se demonstra útil para uma maior compreensão acerca dos impactos provocados pelo agonista TRV027 sobre os componentes do sistema renina-angiotensina e na expressão da ADAM 17. No entanto, a complementação desse estudo se faz importante para validação dos dados obtidos, tais como, verificar as expressões da ECA 2, da ADAM 17 e do AT1R em outras áreas centrais envolvidas com a modulação simpática da pressão arterial, como o órgão subfornical (SFO) e o bulbo ventrolateral rostral (RVLM), tanto a nível de mRNA quanto de proteína, além de aumentar o número de animais do grupo controle e do grupo experimental.

REFERÊNCIAS

- APPLIED BIOSYSTEMS. **Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR**, 2004. Disponível em: < http://www.gu.se/digitalAssets/1125/1125331_ABI_Guide_Relative_Quantification_using_realttime_PCR.pdf >. Acesso em 23 Out. 2017.
- AIRES, Margarida de Mello – **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- APLIN, M.; BONDE, M. M.; HANSEN, J. L. Molecular determinants of angiotensin II type 1 receptor functional selectivity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 46, n. 1, p. 15-24, Jan 2009. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262482800003 >.
- ATLAS, S. A. The renin-angiotensin aldosterone system: Pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 13, n. 8, p. S9-S20, Oct 2007. ISSN 1083-4087. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250757000002 >.
- AVERILL, D. B.; DIZ, D. I. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: Pathways and mechanisms of the medulla oblongata. **Brain Research Bulletin**, v. 51, n. 2, p. 119-128, Jan 2000. ISSN 0361-9230. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085101100005 >.
- AZZI, M. et al. beta-Arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11406-11411, Sep 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000185685700043 >.
- BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine-Jmm**, v. 86, n. 6, p. 615-621, Jun 2008. ISSN 0946-2716. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000255746900003 >.
- BADOER, E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 1-2, p. 95-99, Jan-Feb 2001. ISSN 1440-1681. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000167673800018 >.
- BASSAN, F. B. et al. Eixo renina-angiotensina-aldosterona: bases fisiológicas e fisiopatológicas. **Rev. Hosp. Univ. Pedro Ernesto**, v. 10, p. 20-20, 2011.
- BECKER, C. et al. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 237-243, Apr 2010. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276262100005 >.
- BLAIR, M. L. et al. Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in cardiovascular regulation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 23, n. 2, p. 161-165, Feb 1996. ISSN 1440-1681. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UJ73800012 >.
- BOERRIGTER, G. et al. Cardiorenal Actions of TRV120027, a Novel beta-Arrestin-Biased Ligand at the Angiotensin II Type I Receptor, in Healthy and Heart Failure Canines A Novel

Therapeutic Strategy for Acute Heart Failure. **Circulation-Heart Failure**, v. 4, n. 6, p. 770-778, Nov 2011. ISSN 1941-3289. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297166100018 >.

BOERRIGTER, G. et al. TRV120027, a Novel beta-Arrestin Biased Ligand at the Angiotensin II Type I Receptor, Unloads the Heart and Maintains Renal Function When Added to Furosemide in Experimental Heart Failure. **Circulation-Heart Failure**, v. 5, n. 5, p. 627-634, Sep 2012. ISSN 1941-3289. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000313579500015 >.

BRAGA, V. A. et al. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 871-876, Sep 2011. ISSN 0100-879X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295721500007 >.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. **Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito**. Brasília, DF, 2016.

BURMEISTER, M. A. et al. In Vivo Bioluminescence Imaging Reveals Redox-Regulated Activator Protein-1 Activation in Paraventricular Nucleus of Mice With Renovascular Hypertension. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 289-U286, Feb 2011. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000286379200033 >.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 1, Aug 2002. ISSN 0952-5041. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000177760900004 >.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, Apr 2009. ISSN 0009-9147. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264774200006 >.

CAIN, A. E.; KHALIL, R. A. Pathophysiology of essential hypertension: Role of the pump, the vessel, and the kidney. **Seminars in Nephrology**, v. 22, n. 1, p. 3-16, Jan 2002. ISSN 0270-9295. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000173264000002 >.

CAMPBELL, D. J. CIRCULATING AND TISSUE ANGIOTENSIN SYSTEMS. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 1, p. 1-6, Jan 1987. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987F429800001 >.

CAMPBELL, D. J. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 6, p. 784-791, Jun 2003. ISSN 1357-2725. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182501200007 >.

CHAN, S. H. H.; CHAN, J. Y. H. Mitochondria and Reactive Oxygen Species Contribute to Neurogenic Hypertension. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 308-321, Jul 2017. ISSN 1548-9213. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000403602600006 >.

CHANG, S. Y. et al. Angiotensin II Type II Receptor Deficiency Accelerates the Development of Nephropathy in Type I Diabetes via Oxidative Stress and ACE2.

Experimental Diabetes Research, 2011. ISSN 1687-5214. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000298467400001 >.

CHENG, W. H. et al. Angiotensin II Inhibits Neuronal Nitric Oxide Synthase Activation Through the ERK1/2-RSK Signaling Pathway to Modulate Central Control of Blood Pressure. **Circulation Research**, v. 106, n. 4, p. 788-U304, Mar 2010. ISSN 0009-7330. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000275190500020 >.

CHONG, L. Molecular cloning - A laboratory manual, 3rd edition. **Science**, v. 292, n. 5516, p. 446-446, Apr 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000168187300027 >.

COLEMAN, C. G. et al. Angiotensin ii type 2 receptors have a major somatodendritic distribution in vasopressin-containing neurons in the mouse hypothalamic paraventricular nucleus. **Neuroscience**, v. 163, n. 1, p. 129-142, Sep 2009. ISSN 0306-4522. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000269404600012 >.

CONSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

COOTE, J. H. Landmarks in understanding the central nervous control of the cardiovascular system. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 1, p. 3-18, Jan 2007. ISSN 0958-0670. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243472700002 >.

DONOGHUE, M. et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. E1-E9, Sep 2000. ISSN 0009-7330. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000089334000015 >.

DOOBAY, M. F. et al. Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. R373-R381, Jan 2007. ISSN 0363-6119. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243171900043 >.

EPELMAN, S. et al. Soluble Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Human Heart Failure: Relation With Myocardial Function and Clinical Outcomes. **Journal of Cardiac Failure**, v. 15, n. 7, p. 565-571, Sep 2009. ISSN 1071-9164. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000269755700003 >.

EPELMAN, S. et al. Detection of soluble angiotensin-converting enzyme 2 in heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 9, p. 750-754, Aug 2008. ISSN 0735-1097. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258619300006 >.

FELKER, G. M. et al. Heart Failure Therapeutics on the Basis of a Biased Ligand of the Angiotensin-2 Type 1 Receptor Rationale and Design of the BLAST-AHF Study (Biased Ligand of the Angiotensin Receptor Study in Acute Heart Failure). **Jacc-Heart Failure**, v. 3, n. 3, p. 193-201, Mar 2015. ISSN 2213-1779. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000365650600001 >.

FENG, Y. M. et al. Brain-Selective Overexpression of Human Angiotensin-Converting Enzyme Type 2 Attenuates Neurogenic Hypertension. **Circulation Research**, v. 106, n. 2, p.

373-U91, Feb 2010. ISSN 0009-7330. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274258500019 >.

FENG, Y. M. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in the subfornical organ prevents the angiotensin II-mediated pressor and drinking responses and is associated with angiotensin II type 1 receptor downregulation. **Circulation Research**, v. 102, n. 6, p. 729-736, Mar 2008. ISSN 0009-7330. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254466000015 >.

FERGUSON, A. V.; WASHBURN, D. L. S.; LATCHFORD, K. J. Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 2, p. 85-96, Feb 2001. ISSN 1535-3702. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167253300004 >.

FERRARIO, C. M. et al. PATHWAYS OF ANGIOTENSIN FORMATION AND FUNCTION IN THE BRAIN. **Hypertension**, v. 15, n. 2, p. I13-I19, Feb 1990. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990CR78300004 >.

FERRARIO, C. M. et al. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 535-541, Sep 1997. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997XY88000002 >.

FERRARIO, C. M.; TRASK, A. J.; JESSUP, J. A. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 6, p. H2281-H2290, Dec 2005. ISSN 0363-6135. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233176600001 >.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine**, v. 264, n. 3, p. 224-236, Sep 2008. ISSN 0954-6820. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258327400002 >.

GARTON, K. J.; GOUGH, P. J.; RAINES, E. W. Emerging roles for ectodomain *shedding* in the regulation of inflammatory responses. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 6, p. 1105-1116, Jun 2006. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243015400002 >.

GIRONACCI, M. M. et al. Protective axis of the renin-angiotensin system in the brain. **Clinical Science**, v. 127, n. 5-6, p. 295-306, Sep 2014. ISSN 0143-5221. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000339859900002 >.

GOWRISANKAR, Y. V.; CLARK, M. A. Angiotensin II regulation of angiotensin-converting enzymes in spontaneously hypertensive rat primary astrocyte cultures. **Journal of Neurochemistry**, v. 138, n. 1, p. 74-85, Jul 2016. ISSN 0022-3042. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000380263200005 >.

GRANIER, S.; KOBILKA, B. A new era of GPCR structural and chemical biology. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 8, p. 670-673, Aug 2012. ISSN 1552-4450. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000306527600002 >.

GUANG, C. et al. Three key proteases - angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin - within and beyond the renin-angiotensin system. **Archives of Cardiovascular Diseases**, v. 105, n. 6-7, p. 373-385, Jun-Jul 2012. ISSN 1875-2136. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000307919500006 >.

GUY, J. L. et al. Identification of critical active-site residues in angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) by site-directed mutagenesis. **Febs Journal**, v. 272, n. 14, p. 3512-3520, Jul 2005. ISSN 1742-464X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000230293100003 >.

IGASE, M. et al. Angiotensin II AT(1) receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 3, p. H1013-H1019, Sep 2005. ISSN 0363-6135. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231208000008 >.

IKEDA, Y. et al. Biased Agonism of the Angiotensin II Type I Receptor A Potential Strategy for the Treatment of Acute Heart Failure. **International Heart Journal**, v. 56, n. 5, p. 485-488, Sep 2015. ISSN 1349-2365. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000365458200002 >.

IWATA, M.; ENCISO, J. E. S.; GREENBERG, B. H. Selective and specific regulation of ectodomain *shedding* of angiotensin-converting enzyme 2 by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 297, n. 5, p. C1318-C1329, Nov 2009. ISSN 0363-6143. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271263500026 >.

KENAKIN, T. Functional selectivity through protean and biased agonism: Who steers the ship? **Molecular Pharmacology**, v. 72, n. 6, p. 1393-1401, Dec 2007. ISSN 0026-895X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251029700001 >.

LAMBERT, D. W. et al. Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain *shedding* of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 34, p. 30113-30119, Aug 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231362500017 >.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **Bmc Bioinformatics**, v. 6, Mar 2005. ISSN 1471-2105. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228166200001 >.

LEFTOWITZ, R. J.; SHENOY, S. K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 512-517, Apr 2005. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228810500042 >.

LEUNG, P. S. The peptide hormone angiotensin II: Its new functions in tissues and organs. **Current Protein & Peptide Science**, v. 5, n. 4, p. 267-273, Aug 2004. ISSN 1389-2037. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000222543100005 >.

LEUNG, P. S. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. **Journal of Physiology-London**, v. 580, n. 1, p. 31-37, Apr 2007. ISSN 0022-3751. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000245646800009 >.

LUNDE, P. K. et al. Skeletal muscle disorders in heart failure. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 171, n. 3, p. 277-294, Mar 2001. ISSN 0001-6772. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000169352500010 >.

MORISHITA, R.; AOKI, M.; OGIHARA, T. Functional analysis of cardiovascular renin-angiotensin system using a gain or loss of function approach. **Hypertension Research**, v. 23, n. 2, p. 137-141, Mar 2000. ISSN 0916-9636. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000086512900006 >.

MOUSA, T. M. et al. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 3, p. 616-624, Mar 2008. ISSN 8750-7587. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253822900008 >.

MURPHY, G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 12, p. 929-941, Dec 2008. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261127200013 >.

NAKAGAWA, P.; SIGMUND, C. D. How Is the Brain Renin-Angiotensin System Regulated? **Hypertension**, v. 70, n. 1, p. 10-18, Jul 2017. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000402880500004 >.

NUNES, F. C.; BRAGA, V. A. Chronic angiotensin II infusion modulates angiotensin II type I receptor expression in the subfornical organ and the rostral ventrolateral medulla in hypertensive rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 12, n. 4, p. 440-445, Dec 2011. ISSN 1470-3203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297765700007 >.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. A global brief on Hypertension: Silent killer, global public health crisis. Geneva, 2013.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015. Geneva, 2016.

OPARIL, S.; SILFANI, T. N.; WALKER, J. F. Role of angiotensin receptor blockers as monotherapy in reaching blood pressure goals. **American Journal of Hypertension**, v. 18, n. 2, p. 287-294, Feb 2005. ISSN 0895-7061. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227394100020 >.

OUDIT, G. Y. et al. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 13, n. 3, p. 93-101, Apr 2003. ISSN 1050-1738. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182045200001 >.

PHILLIPS, M. I.; SUMNERS, C. Angiotensin II in central nervous system physiology. **Regulatory Peptides**, v. 78, n. 1-3, p. 1-11, Nov 1998. ISSN 0167-0115. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000077559900001 >.

REISS, K.; SAFTIG, P. The "A Disintegrin And Metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. **Seminars in Cell & Developmental**

Biology, v. 20, n. 2, p. 126-137, Apr 2009. ISSN 1084-9521. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000266823600002 >.

SAKIMA, A. et al. Impaired heart rate baroreflex in older rats - Role of endogenous angiotensin-(1-7) at the nucleus tractus solitarii. **Hypertension**, v. 46, n. 2, p. 333-340, Aug 2005. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000230829700020 >.

SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regulatory Peptides**, v. 91, n. 1-3, p. 45-62, Jul 2000. ISSN 0167-0115. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000089342000005 >.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. R1-R17, Feb 2013. ISSN 0022-0795. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000315733400001 >.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8258-8263, Jul 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000184222500041 >.

SAXENA, P. R. Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 19, p. S80-S88, 1992. ISSN 0160-2446. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992JG62300013 >.

SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes & Development**, v. 17, n. 1, p. 7-30, Jan 2003. ISSN 0890-9369. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180280700002 >.

SHAFTON, A. D.; RYAN, A.; BADOER, E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Brain Research**, v. 801, n. 1-2, p. 239-243, Aug 1998. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000075451100033 >.

SHRINGARPURE, R. et al. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 1, p. 311-318, Jan 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180255700042 >.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: Uma abordagem integrada**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 13, p. 8-11, 2010.

SOERGEL, D. G. et al. First Clinical Experience With TRV027: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Healthy Volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 53, n. 9, p. 892-899, Sep 2013. ISSN 1552-4604. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000325864400003 >.

SOUZA, A. P. S. et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. **Clinical Science**, v. 125, n. 9-10, p.

449-459, Nov 2013. ISSN 0143-5221. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000325231900005 >.

SRIRAMULA, S. et al. ACE2 overexpression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 92, n. 3, p. 401-408, Dec 2011. ISSN 0008-6363. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000296977000009 >.

STECKELINGS, U. M.; KASCHINA, E.; UNGER, T. The AT2 receptor - A matter of love and hate. **Peptides**, v. 26, n. 8, p. 1401-1409, Aug 2005. ISSN 0196-9781. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231181700016 >.

STOCKER, S. D.; KINSMAN, B. J.; SVED, A. F. Recent Advances in Neurogenic Hypertension Dietary Salt, Obesity, and Inflammation. **Hypertension**, v. 70, n. 3, p. 474-478, Sep 2017. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000407241500004 >.

STREIT, S. et al. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 37-43, 2009. ISSN 1754-2189. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000265781800005 >.

TAN, Z.; WU, J. G.; MA, H. Regulation of angiotensin-converting enzyme 2 and Mas receptor by Ang-(1-7) in heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 12, n. 4, p. 413-419, Dec 2011. ISSN 1470-3203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297765700004 >.

TIPNIS, S. R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme - Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33238-33243, Oct 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000090104600011 >.

TURNER, A. J.; HOOPER, N. M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 4, p. 177-183, Apr 2002. ISSN 0165-6147. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000174821000014 >.

VENKATAKRISHNAN, A. J. et al. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 494, n. 7436, p. 185-194, Feb 2013. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000315137700030 >.

VICKERS, C. et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14838-14843, Apr 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175203000063 >.

VIOLIN, J. D. et al. Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 7, p. 308-316, Jul 2014. ISSN 0165-6147. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000338979500002 >.

VIOLIN, J. D. et al. Selectively Engaging beta-Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 335, n. 3, p. 572-579, Dec 2010. ISSN 0022-3565. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000284308800006 >.

WANG, K. et al. Insufficient hypothalamic angiotensin-converting enzyme 2 is associated with hypertension in SHR rats. **Oncotarget**, v. 8, n. 12, p. 20244-20251, Mar 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000396879200129 >.

WILLIAMSON, C. R. et al. Comparative Analysis of Renin-Angiotensin System (RAS)-Related Gene Expression Between Hypertensive and Normotensive Rats. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 23, p. 20-24, 2017. ISSN 2325-4416. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000411012600003 >.

WOLFSBERG, T. G. et al. ADAM, A NOVEL FAMILY OF MEMBRANE-PROTEINS CONTAINING A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE DOMAIN - MULTIPOTENTIAL FUNCTIONS IN CELL-CELL AND CELL-MATRIX INTERACTIONS. **Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 2, p. 275-278, Oct 1995. ISSN 0021-9525. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995RZ59500001 >.

XIA, H. J. et al. Angiotensin II Type 1 Receptor-Mediated Reduction of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activity in the Brain Impairs Baroreflex Function in Hypertensive Mice. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 210-U192, Feb 2009. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000262625400019 >.

XIA, H. J. et al. Brain Angiotensin-Converting Enzyme Type 2 *Shedding* Contributes to the Development of Neurogenic Hypertension. **Circulation Research**, v. 113, n. 9, p. 1087-1096, Oct 2013. ISSN 0009-7330. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329483800012 >.

APLIN, M.; BONDE, M. M.; HANSEN, J. L. Molecular determinants of angiotensin II type 1 receptor functional selectivity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 46, n. 1, p. 15-24, Jan 2009. ISSN 0022-2828. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000262482800003 >.

ATLAS, S. A. The renin-angiotensin aldosterone system: Pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 13, n. 8, p. S9-S20, Oct 2007. ISSN 1083-4087. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000250757000002 >.

AVERILL, D. B.; DIZ, D. I. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: Pathways and mechanisms of the medulla oblongata. **Brain Research Bulletin**, v. 51, n. 2, p. 119-128, Jan 2000. ISSN 0361-9230. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000085101100005 >.

AZZI, M. et al. beta-Arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11406-11411, Sep 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185685700043 >.

BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine-Jmm**, v. 86, n. 6, p. 615-621, Jun 2008. ISSN 0946-2716. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255746900003 >.

BADOER, E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 1-2, p. 95-99, Jan-Feb 2001. ISSN 1440-1681. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167673800018 >.

BLAIR, M. L. et al. Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in cardiovascular regulation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 23, n. 2, p. 161-165, Feb 1996. ISSN 1440-1681. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UJ73800012 >.

BOERRIGTER, G. et al. Cardiorenal Actions of TRV120027, a Novel beta-Arrestin-Biased Ligand at the Angiotensin II Type I Receptor, in Healthy and Heart Failure Canines A Novel Therapeutic Strategy for Acute Heart Failure. **Circulation-Heart Failure**, v. 4, n. 6, p. 770-778, Nov 2011. ISSN 1941-3289. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297166100018 >.

BOERRIGTER, G. et al. TRV120027, a Novel beta-Arrestin Biased Ligand at the Angiotensin II Type I Receptor, Unloads the Heart and Maintains Renal Function When Added to Furosemide in Experimental Heart Failure. **Circulation-Heart Failure**, v. 5, n. 5, p. 627-634, Sep 2012. ISSN 1941-3289. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000313579500015 >.

BRAGA, V. A. et al. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 871-876, Sep 2011. ISSN 0100-879X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295721500007 >.

BURMEISTER, M. A. et al. In Vivo Bioluminescence Imaging Reveals Redox-Regulated Activator Protein-1 Activation in Paraventricular Nucleus of Mice With Renovascular Hypertension. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 289-U286, Feb 2011. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000286379200033 >.

CAIN, A. E.; KHALIL, R. A. Pathophysiology of essential hypertension: Role of the pump, the vessel, and the kidney. **Seminars in Nephrology**, v. 22, n. 1, p. 3-16, Jan 2002. ISSN 0270-9295. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000173264000002 >.

CAMPBELL, D. J. Circulating and tissue angiotensin systems. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 1, p. 1-6, Jan 1987. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987F429800001 >.

CAMPBELL, D. J. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 6, p. 784-791, Jun 2003. ISSN 1357-2725. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182501200007 >.

CHAN, S. H. H.; CHAN, J. Y. H. Mitochondria and Reactive Oxygen Species Contribute to Neurogenic Hypertension. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 308-321, Jul 2017. ISSN 1548-9213. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000403602600006 >.

CHANG, S. Y. et al. Angiotensin II Type II Receptor Deficiency Accelerates the Development of Nephropathy in Type I Diabetes via Oxidative Stress and ACE2. **Experimental Diabetes Research**, 2011. ISSN 1687-5214. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000298467400001 >.

CHENG, W. H. et al. Angiotensin II Inhibits Neuronal Nitric Oxide Synthase Activation Through the ERK1/2-RSK Signaling Pathway to Modulate Central Control of Blood Pressure. **Circulation Research**, v. 106, n. 4, p. 788-U304, Mar 2010. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275190500020 >.

COLEMAN, C. G. et al. angiotensin ii type 2 receptors have a major somatodendritic distribution in vasopressin-containing neurons in the mouse hypothalamic paraventricular nucleus. **Neuroscience**, v. 163, n. 1, p. 129-142, Sep 2009. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269404600012 >.

COOTE, J. H. Landmarks in understanding the central nervous control of the cardiovascular system. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 1, p. 3-18, Jan 2007. ISSN 0958-0670. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243472700002 >.

DONOGHUE, M. et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. E1-E9, Sep 2000. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089334000015 >.

DOOBAY, M. F. et al. Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. R373-R381, Jan 2007. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243171900043 >.

EPELMAN, S. et al. Soluble Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Human Heart Failure: Relation With Myocardial Function and Clinical Outcomes. **Journal of Cardiac Failure**, v. 15, n. 7, p. 565-571, Sep 2009. ISSN 1071-9164. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269755700003 >.

EPELMAN, S. et al. Detection of soluble angiotensin-converting enzyme 2 in heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 9, p. 750-754, Aug 2008. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258619300006 >.

FELKER, G. M. et al. Heart Failure Therapeutics on the Basis of a Biased Ligand of the Angiotensin-2 Type 1 Receptor Rationale and Design of the BLAST-AHF Study (Biased Ligand of the Angiotensin Receptor Study in Acute Heart Failure). **Jacc-Heart Failure**, v. 3, n. 3, p. 193-201, Mar 2015. ISSN 2213-1779. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000365650600001 >.

FENG, Y. M. et al. Brain-Selective Overexpression of Human Angiotensin-Converting Enzyme Type 2 Attenuates Neurogenic Hypertension. **Circulation Research**, v. 106, n. 2, p. 373-U91, Feb 2010. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274258500019 >.

FENG, Y. M. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in the subfornical organ prevents the angiotensin II-mediated pressor and drinking responses and is associated with angiotensin II type 1 receptor downregulation. **Circulation Research**, v. 102, n. 6, p. 729-736, Mar 2008. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000254466000015 >.

FERGUSON, A. V.; WASHBURN, D. L. S.; LATCHFORD, K. J. Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 2, p. 85-96, Feb 2001. ISSN 1535-3702. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167253300004 >.

FERRARIO, C. M. et al. PATHWAYS OF ANGIOTENSIN FORMATION AND FUNCTION IN THE BRAIN. **Hypertension**, v. 15, n. 2, p. I13-I19, Feb 1990. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990CR78300004 >.

FERRARIO, C. M. et al. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 535-541, Sep 1997. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997XY88000002 >.

FERRARIO, C. M.; TRASK, A. J.; JESSUP, J. A. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 6, p. H2281-H2290, Dec 2005. ISSN 0363-6135. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233176600001 >.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine**, v. 264, n. 3, p. 224-236, Sep 2008. ISSN 0954-6820. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258327400002 >.

GARTON, K. J.; GOUGH, P. J.; RAINES, E. W. Emerging roles for ectodomain *shedding* in the regulation of inflammatory responses. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 6, p. 1105-1116, Jun 2006. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243015400002 >.

GIRONACCI, M. M. et al. Protective axis of the renin-angiotensin system in the brain. **Clinical Science**, v. 127, n. 5-6, p. 295-306, Sep 2014. ISSN 0143-5221. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000339859900002 >.

GRANIER, S.; KOBILKA, B. A new era of GPCR structural and chemical biology. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 8, p. 670-673, Aug 2012. ISSN 1552-4450. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000306527600002 >.

GUANG, C. et al. Three key proteases - angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin - within and beyond the renin-angiotensin system. **Archives of Cardiovascular Diseases**, v. 105, n. 6-7, p. 373-385, Jun-Jul 2012. ISSN 1875-2136. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000307919500006 >.

GUY, J. L. et al. Identification of critical active-site residues in angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) by site-directed mutagenesis. **Febs Journal**, v. 272, n. 14, p. 3512-3520, Jul 2005. ISSN 1742-464X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000230293100003 >.

IGASE, M. et al. Angiotensin II AT(1) receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 3, p. H1013-H1019, Sep 2005. ISSN 0363-6135. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231208000008 >.

IKEDA, Y. et al. Biased Agonism of the Angiotensin II Type I Receptor A Potential Strategy for the Treatment of Acute Heart Failure. **International Heart Journal**, v. 56, n. 5, p. 485-488, Sep 2015. ISSN 1349-2365. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000365458200002 >.

IWATA, M.; ENCISO, J. E. S.; GREENBERG, B. H. Selective and specific regulation of ectodomain *shedding* of angiotensin-converting enzyme 2 by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 297, n. 5, p. C1318-C1329, Nov 2009. ISSN 0363-6143. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271263500026 >.

KENAKIN, T. Functional selectivity through protean and biased agonism: Who steers the ship? **Molecular Pharmacology**, v. 72, n. 6, p. 1393-1401, Dec 2007. ISSN 0026-895X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251029700001 >.

LAMBERT, D. W. et al. Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain *shedding* of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 34, p. 30113-30119, Aug 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231362500017 >.

LEFTOWITZ, R. J.; SHENOY, S. K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 512-517, Apr 2005. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228810500042 >.

LEUNG, P. S. The peptide hormone angiotensin II: Its new functions in tissues and organs. **Current Protein & Peptide Science**, v. 5, n. 4, p. 267-273, Aug 2004. ISSN 1389-2037. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000222543100005 >.

LEUNG, P. S. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. **Journal of Physiology-London**, v. 580, n. 1, p. 31-37, Apr 2007. ISSN 0022-3751. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000245646800009 >.

LUNDE, P. K. et al. Skeletal muscle disorders in heart failure. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 171, n. 3, p. 277-294, Mar 2001. ISSN 0001-6772. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000169352500010 >.

MORISHITA, R.; AOKI, M.; OGIHARA, T. Functional analysis of cardiovascular renin-angiotensin system using a gain or loss of function approach. **Hypertension Research**, v. 23, n. 2, p. 137-141, Mar 2000. ISSN 0916-9636. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000086512900006 >.

MOUSA, T. M. et al. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 3, p. 616-624, Mar 2008. ISSN 8750-7587. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253822900008 >.

MURPHY, G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 12, p. 929-941, Dec 2008. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261127200013 >.

NAKAGAWA, P.; SIGMUND, C. D. How Is the Brain Renin-Angiotensin System Regulated? **Hypertension**, v. 70, n. 1, p. 10-18, Jul 2017. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000402880500004 >.

NUNES, F. C.; BRAGA, V. A. Chronic angiotensin II infusion modulates angiotensin II type I receptor expression in the subfornical organ and the rostral ventrolateral medulla in hypertensive rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 12, n. 4, p. 440-445, Dec 2011. ISSN 1470-3203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297765700007 >.

OPARIL, S.; SILFANI, T. N.; WALKER, J. F. Role of angiotensin receptor blockers as monotherapy in reaching blood pressure goals. **American Journal of Hypertension**, v. 18, n. 2, p. 287-294, Feb 2005. ISSN 0895-7061. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227394100020 >.

OUDIT, G. Y. et al. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 13, n. 3, p. 93-101, Apr 2003. ISSN 1050-1738. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182045200001 >.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2 ed. Nova Iorque: Academic Press, 1998.

PHILLIPS, M. I.; SUMNERS, C. Angiotensin II in central nervous system physiology. **Regulatory Peptides**, v. 78, n. 1-3, p. 1-11, Nov 1998. ISSN 0167-0115. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000077559900001 >.

REISS, K.; SAFTIG, P. The "A Disintegrin And Metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 2, p. 126-137, Apr 2009. ISSN 1084-9521. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000266823600002 >.

SAKIMA, A. et al. Impaired heart rate baroreflex in older rats - Role of endogenous angiotensin-(1-7) at the nucleus tractus solitarii. **Hypertension**, v. 46, n. 2, p. 333-340, Aug 2005. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000230829700020 >.

SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regulatory Peptides**, v. 91, n. 1-3, p. 45-62, Jul 2000. ISSN 0167-0115. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000089342000005 >.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. R1-R17, Feb 2013. ISSN 0022-0795. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000315733400001 >.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8258-8263, Jul 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000184222500041 >.

SAXENA, P. R. INTERACTION BETWEEN THE RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERONE AND SYMPATHETIC NERVOUS SYSTEMS. **Journal of**

Cardiovascular Pharmacology, v. 19, p. S80-S88, 1992. ISSN 0160-2446. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992JG62300013 >.

SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes & Development**, v. 17, n. 1, p. 7-30, Jan 2003. ISSN 0890-9369. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180280700002 >.

SHRINGARPURE, R. et al. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 1, p. 311-318, Jan 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180255700042 >.

SOUZA, A. P. S. et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. **Clinical Science**, v. 125, n. 9-10, p. 449-459, Nov 2013. ISSN 0143-5221. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000325231900005 >.

SRIRAMULA, S. et al. ACE2 overexpression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 92, n. 3, p. 401-408, Dec 2011. ISSN 0008-6363. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000296977000009 >.

STECKELINGS, U. M.; KASCHINA, E.; UNGER, T. The AT2 receptor - A matter of love and hate. **Peptides**, v. 26, n. 8, p. 1401-1409, Aug 2005. ISSN 0196-9781. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231181700016 >.

STOCKER, S. D.; KINSMAN, B. J.; SVED, A. F. Recent Advances in Neurogenic Hypertension Dietary Salt, Obesity, and Inflammation. **Hypertension**, v. 70, n. 3, p. 474-478, Sep 2017. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000407241500004 >.

STREIT, S. et al. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 37-43, 2009. ISSN 1754-2189. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000265781800005 >.

TAN, Z.; WU, J. G.; MA, H. Regulation of angiotensin-converting enzyme 2 and Mas receptor by Ang-(1-7) in heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 12, n. 4, p. 413-419, Dec 2011. ISSN 1470-3203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297765700004 >.

TIPNIS, S. R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme - Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33238-33243, Oct 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000090104600011 >.

TURNER, A. J.; HOOPER, N. M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 4, p. 177-183, Apr 2002. ISSN 0165-6147. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000174821000014 >.

VEERASINGHAM, S. J.; RAIZADA, M. K. Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 191-202, May 2003. ISSN 0007-1188. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000183298400003 >.

VENKATAKRISHNAN, A. J. et al. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 494, n. 7436, p. 185-194, Feb 2013. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000315137700030 >.

VERMEULEN, J. et al. Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 9, May 2011. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000290589500008 >.

VICKERS, C. et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14838-14843, Apr 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175203000063 >.

VIOLIN, J. D. et al. Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 7, p. 308-316, Jul 2014. ISSN 0165-6147. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000338979500002 >.

VIOLIN, J. D. et al. Selectively Engaging beta-Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 335, n. 3, p. 572-579, Dec 2010. ISSN 0022-3565. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000284308800006 >.

WILLIAMSON, C. R. et al. Comparative Analysis of Renin-Angiotensin System (RAS)-Related Gene Expression Between Hypertensive and Normotensive Rats. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 23, p. 20-24, 2017. ISSN 2325-4416. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000411012600003 >.

WOLFSBERG, T. G. et al. ADAM, A novel family of membrane-proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain - multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 2, p. 275-278, Oct 1995. ISSN 0021-9525. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995RZ59500001 >.

XIA, H. J. et al. Angiotensin II Type 1 Receptor-Mediated Reduction of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activity in the Brain Impairs Baroreflex Function in Hypertensive Mice. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 210-U192, Feb 2009. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000262625400019 >.

XIA, H. J.; LAZARTIGUES, E. Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 6, p. 1482-1494, Dec 2008. ISSN 0022-3042. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261205200002 >.

XIA, H. J. et al. Brain Angiotensin-Converting Enzyme Type 2 *Shedding* Contributes to the Development of Neurogenic Hypertension. **Circulation Research**, v. 113, n. 9, p. 1087-1096, Oct 2013. ISSN 0009-7330. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329483800012 >.

XIAO, K. H. et al. Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 34, p. 15299-15304, Aug 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000281311500065 >.

XIAO, L.; GAO, L.; ZUCKER, I. H. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Attenuates the Angiotensin II-Induced Upregulation of Angiotensin II Type 1 Receptor in CATH.a Neurons. **Hypertension**, v. 54, n. 4, p. E70-E71, Oct 2009. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000269852600247 >.

YAMAZATO, M. et al. Overexpression of angiotensin-converting enzyme 2 in the rostral ventrolateral medulla causes long-term decrease in blood pressure in the spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 49, n. 4, p. 926-931, Apr 2007. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000245104300033 >.

ZHANG, Y. et al. NAD(P)H oxidase in paraventricular nucleus contributes to the effect of angiotensin II on cardiac sympathetic afferent reflex. **Brain Research**, v. 1082, p. 132-141, Apr 2006. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000236931400015 >.

ZIMMERMAN, B. et al. Differential beta-Arrestin-Dependent Conformational Signaling and Cellular Responses Revealed by Angiotensin Analogs. **Science Signaling**, v. 5, n. 221, Apr 2012. ISSN 1937-9145. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000303170500002 >.