



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



**AGONISTA TENDENCIOSO PARA O RECEPTOR AT<sub>1</sub> EXERCE EFEITOS  
BENÉFICOS SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

**Orientada:** Cristiane Rodrigues de Almeida Silva Alves

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Socorro França Falcão

JOÃO PESSOA – PB

2017

CRISTIANE RODRIGUES DE ALMEIDA SILVA ALVES

**AGONISTA TENDENCIOSO PARA O RECEPTOR AT<sub>1</sub> EXERCE EFEITOS  
BENÉFICOS SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Socorro de França Falcão

JOÃO PESSOA – PB

2017

A474a Alves, Cristiane Rodrigues de Almeida Silva.

Agonista tendencioso para o receptor AT1 exerce efeitos benéficos sobre parâmetros cardiovasculares de ratos espontaneamente hipertensos / Cristiane Rodrigues de Almeida Silva Alves. - João Pessoa, 2017.

79 f. : il.

Orientação: Maria do Socorro de França Falcão.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Fisiologia. 2. Hipertensão. 3. Barorreflexo. 4. Estresse oxidativo. 5. Angiotensina II. 6. TRV120027.  
I. Falcão, Maria do Socorro de França. II. Título.

UFPB/BC

CRISTIANE RODRIGUES DE ALMEIDA SILVA ALVES

**AGONISTA TENDENCIOSO PARA O RECEPTOR AT<sub>1</sub> EXERCE EFEITOS  
BENÉFICOS SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Dissertação de Mestrado aprovada em 01 de novembro de 2017.

**Banca Examinadora**



Profª. Drª. Maria do Socorro de França Falcão

(Universidade Federal da Paraíba)

Orientadora

---

Profª. Drª. Fernanda Barbosa Lima Christian

(Universidade Federal de Santa Catarina)

Examinadora Externa



Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

(Universidade Federal da Paraíba)

Examinador Interno

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais **Antonia Rodrigues** e **Nivaldo Correia** (*in memoriam*), as minhas irmãs **Ana Rita** e **Williane**, ao meu esposo **Daniel Berg** e aos meus amados filhos **Daniel** e **Valentina**.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida, imenso amor e proteção!

A minha orientadora, **Profa. Maria do Socorro de França Falcão**, por ter dado essa grande oportunidade. Agradeço por ter acreditado em alguém sem experiência alguma e que você nem conhecia. Aprendi muito durante esse tempo! Você é um exemplo de profissional. Sou grata por todo incentivo, paciência e disponibilidade em sempre ajudar. A você todo o meu respeito, carinho, gratidão e grande admiração.

A minha mãe, **Antonia Rodrigues** por tudo que fez e faz por mim. Só ela sabe o quanto se esforçou, renunciou e se anulou para proporcionar o melhor para nós. Sou imensamente grata a Deus por ter exemplo de mãe, mulher, amiga, conselheira sempre disposta que me incentivou a lutar e não desistir dos meus sonhos. Amo você!

As minhas irmãs, **Williane e Ana Rita** por todo incentivo apoio e torcida. Agradeço a Deus por vocês existirem.

Ao meu esposo, **Daniel Berg** por me acompanhar nessa jornada e mesmo não entendendo algumas ausências necessárias, nunca hesitou em ajudar se tornando meu melhor amigo sendo moldado por Deus da melhor maneira.

Ao meu filho amado, **Daniel Berg Ben** sua chegada inesperada transtornou minha vida, porém a encheu de muito amor e alegria, obrigada por cada sorriso, cada beijo, cada afago me fazendo cada vez mais querer ser melhor para você e também a minha filha **Valentina** uma pequena guerreira que nascerá em breve trazendo luz para nossas vidas. Mamãe ama muito vocês!!

Aos meus familiares tios (**tias**), **avós e avôs**, **primos (as)** por torcerem sempre por mim!

As professoras da banca de qualificação **Profa. Camille Balarini e Profa. Josiane Cruz**, pelas contribuições dadas a este trabalho.

Aos demais professores do **Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas** por fazerem parte da minha formação profissional.

A todos do **Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA, UFPB)**, por fazerem parte do meu dia-a-dia

e pelo acolhimento e aprendizado, em especial a **Leonidas, Thyago, Alynne e Danilo**.

As técnicas que fazem parte do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial, **Clênia Cavalcanti e Sara Madeiro** por toda colaboração concedida.

À **minha turma de mestrado**, em especial a **Taísa, Clênia e Marcia** pela amizade, incentivo e momentos compartilhados.

Aos funcionários do **Biotério**, em especial a José Crispim, meus agradecimentos.

A todos da **Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP)**, em especial aos meus colegas de turma pelos momentos de estudos juntos e por estarem sempre dispostos a ajudar em um momento de tantas turbulências. Obrigada também aos professores por todo o conhecimento compartilhado. Foi uma experiência maravilhosa!

A Todos da **Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)**, em especial ao **professor Marcio Moraes** e aos colegas de turma **Sergio, Fátima e Simone** pelo aprendizado compartilhado, troca de experiências e por estarem sempre à disposição para ajudar. Foi uma experiência fantástica!

Aos professores da banca de mestrado, **Ian Porto Gurgel do Amaral** (Cbiotec, UFPB) e **Fernanda Barbosa Lima Christian** (UFSC), por prontamente aceitarem o convite para participar desta banca e pelas contribuições dadas a este trabalho.

A Universidade Federal da Paraíba (**UFPB**) por possibilitar a realização desta pesquisa. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (**CAPES**) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pelo suporte técnico e financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa.

*Muito obrigada!*

*Resumo*

SILVA- ALVES, C.R.A. **Agonista tendencioso para o receptor AT<sub>1</sub> exerce efeitos benéficos sobre parâmetros cardiovasculares de ratos espontaneamente hipertensos**. 2017. 79f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

## RESUMO

A hipertensão arterial (HA) é uma desordem que resulta do prejuízo nos mecanismos de controle da pressão arterial, dentre os quais destacam-se o barorreflexo e o Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA). As ações da Angiotensina II no receptor do tipo AT<sub>1</sub> (AT<sub>1</sub>R) são determinantes para a elevação da pressão arterial via ativação da proteína G<sub>q/11</sub>. Devido a esse fato, antagonistas do AT<sub>1</sub>R têm sido boas opções para o tratamento da HA, porém com efeitos colaterais indesejados. O TRV120027 é um agonista tendencioso para o receptor AT<sub>1</sub>, ou seja, é capaz de se ligar ao AT<sub>1</sub>R sem ativar a proteína G<sub>q/11</sub>, mas sim algumas MAPKs e a β-arrestina, promovendo efeitos cardioprotetores. Estudos apontam o TRV120027 como uma droga em potencial para o tratamento da insuficiência cardíaca, porém nada tem sido relatado sobre esse composto na hipertensão. O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do TRV120027 sobre a pressão arterial e sua modulação autonômica, a sensibilidade do barorreflexo e o estresse oxidativo sérico e tecidual em ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR). Os ratos WKY e SHR foram divididos em quatro grupos: WKY e SHR não tratados (WKY-C e SHR-C) e tratados com o TRV120027 (WKY+TRV e SHR+TRV). O tratamento com o TRV120027 foi realizado por via intracerebroventricular utilizando minibombas osmóticas acopladas a uma cânula guia implantadas em direção ao ventrículo lateral dos animais, por meio das quais o composto foi injetado durante 14 dias (20 ng/kg/dia). No 13º dia, foram implantados cateteres na veia e artéria femorais dos animais para administração de drogas e avaliação dos parâmetros cardiovasculares, respectivamente. Em seguida, os animais foram sacrificados e foi feita a coleta de sangue, rins e fígado para avaliação do estresse oxidativo pelo método do ácido tiobarbitúrico. Todos os protocolos foram aprovados pelo CEUA-UFPB (parecer nº 090/2016). O tratamento com TRV120027 não induziu alterações significativas na pressão arterial dos animais normotensos (WKY-C: 119 ± 6 vs. WKY+TRV: 108 ± 5 mmHg), mas foi eficiente em reduzir a pressão arterial nos animais SHR+TRV quando comparados ao grupo SHR-C (160 ± 5 vs. 181 ± 3 mmHg, respectivamente,  $p < 0,05$ ), não foi observada diferença significativa na frequência cardíaca entre os grupos avaliados. O tratamento melhorou o tônus cardíaco vagal nos animais SHR+TRV quando comparados ao grupo SHR-C ( $\Delta FC = +83 \pm 1$  vs.  $+54 \pm 3$  bpm, respectivamente,  $p < 0,05$ ), assim como melhorou o tônus vasomotor simpático ( $\Delta PAM = -47 \pm 2$  vs.  $-64 \pm 5$  mmHg,  $p < 0,05$ ). Adicionalmente, nos animais SHR tratados houve melhora na sensibilidade do barorreflexo induzido (SHR-C:  $-1,4 \pm 0,2$  vs. SHR+TRV:  $2,4 \pm 0,3$  bpm/mmHg,  $p < 0,05$ ), e espontâneo (SHR-C:  $0,5 \pm 0,1$  vs. SHR+TRV:  $1,8 \pm 0,2$ , ms/mmHg,  $p < 0,05$ ). O TRV120027 também foi capaz de reduzir os níveis séricos e renais de MDA nos animais SHR+TRV quando comparados ao grupo SHR-C (Soro:  $0,37 \pm 0,05$  vs.  $2,58 \pm 0,08$  nmol/ml; Rins:  $8,18 \pm 0,03$  vs.  $11,7 \pm 0,05$  nmol/mg do órgão). Os resultados obtidos demonstram que o TRV120027, atuando no Sistema Nervoso Central, é capaz de reduzir a PA de ratos espontaneamente hipertensos, melhorar a função autonômica, restaurar a sensibilidade do barorreflexo e reduzir o estresse oxidativo periférico presente nesses animais. Esses dados reforçam o envolvimento da via dependente da proteína G<sub>q/11</sub> acoplada ao AT<sub>1</sub>R no processo hipertensivo e apontam para o potencial benéfico do agonista tendencioso TRV120027 contra a hipertensão e eventos a ela relacionados ao ativar a via da β-arrestina acoplada ao mesmo receptor, de maneira tendenciosa.

**Palavras-chave:** Hipertensão; Barorreflexo; Estresse oxidativo; Angiotensina II; TRV120027.

*Abstract*

SILVA- ALVES, C.R.A. **Biased agonist of the AT<sub>1</sub> receptor exerts beneficial effects on cardiovascular parameters of spontaneously hypertensive rats.** 2017. 79f. Dissertation (Masters in Physiology). Federal University of Paraíba, João Pessoa-PB.

## ABSTRACT

Arterial hypertension (AH) is a disorder that results from impairment in blood pressure control mechanisms, among which the baroreflex and the Renin Angiotensin Aldosterone System (RAAS) stand out. The actions of Angiotensin II in the AT<sub>1</sub> receptor type (AT<sub>1</sub>R) are determinants for the elevation of arterial pressure via G<sub>q/11</sub> protein-coupled AT<sub>1</sub>R activation. Because of this, AT<sub>1</sub>R antagonists have been good options for HA treatment, but with undesirable side effects. TRV120027 is an AT<sub>1</sub> receptor biased agonist, in other words, it is capable of binding to AT<sub>1</sub>R without activating G<sub>q/11</sub> protein, but rather some MAPKs and β-arrestin, promoting cardioprotective effects. Studies point to TRV120027 as a potential drug for the treatment of heart failure, but nothing has been reported regarding the effects of this compound on hypertension. The aim of the present study was to investigate the effects of TRV120027 on arterial pressure and its autonomic modulation, baroreflex sensitivity and serum and tissue oxidative stress in normotensive Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats. The WKY and SHR rats were divided into four groups: WKY and SHR untreated (WKY-C and SHR-C) and treated with TRV120027 (WKY+TRV and SHR+TRV). Treatment with TRV120027 was performed intracerebroventricularly using osmotic minipumps implanted towards the lateral ventricle of the animals, through which the compound was injected for 14 days (20 ng/h/day). On the 13th day, catheters were implanted in the femoral vein and artery of the animals for drug administration and evaluation of cardiovascular parameters, respectively. After that, the animals were sacrificed and blood, kidneys and liver were collected to evaluate oxidative stress by the thiobarbituric acid method. All protocols were approved by CEUA-UFPB (N. 090/2016). Treatment with TRV120027 did not change the arterial pressure of normotensive animals (WKY-C: 119 ± 3 vs. WKY+TRV: 108 ± 3 mmHg), but was effective in reducing arterial pressure in SHR+TRV animals when compared to SHR-C group (160 ± 5 vs. 181 ± 3 mmHg, respectively, *p* < 0.05), no significant difference in heart rate was observed between the groups evaluated. Treatment improved the cardiac vagal tone in SHR+TRV when compared to SHR-C (ΔHR = +83 ± 1 vs. +54 ± 3 bpm, *p* < 0, 05), as well as improved the sympathetic vasomotor tone (ΔPAM = -47 ± 2 vs. -64 ± 5 mmHg, *p* < 0,05). In addition, in SHR+TRV there was an improvement in the induced (SHR-C: -1,4 ± 0,2 vs. SHR+TRV: 2,4 ± 0,3 bpm/mmHg, *p* < 0,05) and spontaneous (SHR-C: 0,5 ± 0,1 vs. SHR+TRV: 1,8 ± 0,2, ms/mmHg, *p* < 0,05) baroreflex sensitivity. The TRV120027 was also able to reduce serum and renal MDA levels in SHR+TRV animals when compared to SHR-C group (Serum: 0.37 ± 0.05 vs. 2.58 ± 0.08 nmol/ml; Kidneys: 8.18 ± 0.03 vs. 11.7 ± 0.05 nmol/mg organ). The results obtained demonstrate that TRV120027, acting in the Central Nervous System, is able to reduce the arterial pressure in spontaneously hypertensive rats, improve autonomic function, restore baroreflex sensitivity and reduce peripheral oxidative stress present in these animals. These data reinforce the involvement of G<sub>q/11</sub> protein-dependent pathway coupled to AT<sub>1</sub>R in the hypertensive process and point to beneficial potential of the biased agonist, TRV120027, against hypertension and related events by activating β-arrestin pathway-coupled to AT<sub>1</sub>R in a biased way.

**Keywords:** Arterial hypertension; Baroreflex; Oxidative stress; Angiotensin II; TRV120027.

## LISTA DE FIGURAS

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 1:</b>  | Aferências e eferências do barorreflexo.....  | 22 |
| <b>Figura 2:</b>  | A, a Ang II no eixo SFO-PVN-RVLM. B, Mecanismos envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio(EROS) induzida pela angiotensina-II (Ang- II)..... | 25 |
| <b>Figura 3:</b>  | Ilustração mostrando a ativação da via clássica e da via da $\beta$ -arrestina pelo receptor AT <sub>1</sub> R.....                                       | 28 |
| <b>Figura 4:</b>  | Ilustração mostrando a ativação da via da $\beta$ -arrestina e como acontece a internalização do receptor.....  | 28 |
| <b>Figura 5:</b>  | Efeitos da $\beta$ -arrestina na via do AT <sub>1</sub> R.....  | 30 |
| <b>Figura 6:</b>  | Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental.....  | 38 |
| <b>Figura 7:</b>  | Implantação de minibombas osmóticas.....  | 39 |
| <b>Figura 8:</b>  | Ilustração do procedimento de implantação dos cateteres vasculares.....   | 40 |
| <b>Figura 9:</b>  | Equipamento utilizado para medida de PA e FC.....   | 41 |
| <b>Figura 10:</b> | Equipamento de análise bioquímica Chem Well.....  | 43 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Gráfico 1:</b>  | Traçados representativos de um animal de cada grupo mostrando a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).....   | 46 |
| <b>Gráfico 2:</b>  | Pressão arterial média basal dos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9), SHR +TRV (n=6) que receberam infusão intracerebroventricular do TRV027 (20 ng/hora/dia) por 14 dias.....   | 47 |
| <b>Gráfico 3:</b>  | Frequência cardíaca basal dos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6) que foram tratados com TRV027 (20 ng/h/dia) por 14 dias.....   | 47 |
| <b>Gráfico 4:</b>  | Variações na frequência cardíaca após administração intravenosa de atropina (2mg/kg) nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6) .....   | 48 |
| <b>Gráfico 5:</b>  | Variações na frequência cardíaca após administração intravenosa de propranolol (5mg/kg) nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6) .....  | 49 |
| <b>Gráfico 6:</b>  | Variação da pressão arterial média ( $\Delta$ mm Hg) após administração intravenosa de hexametônio (30mg/kg) nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6) .....   | 49 |
| <b>Gráfico 7:</b>  | Efeito do tratamento ICV com o TRV027 (20 ng/h/dia) por 14 dias na sensibilidade do barorreflexo ativado farmacologicamente com injeção em <i>bolus</i> de FEN e NPS nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6) ..... | 51 |
| <b>Gráfico 8:</b>  | Efeito do tratamento ICV com TRV027 (20 ng/h/dia) por 14 dias na sensibilidade do barorreflexo espontâneo nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV(n=9), SHR-C(n=9) e SHR+TRV(n=6).....  | 51 |
| <b>Gráfico 9:</b>  | Níveis séricos de MDA (nmol/mL de soro) nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6) .....  | 52 |
| <b>Gráfico 10:</b> | Níveis renais de MDA (nmol/mg do órgão) nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6) .....  | 53 |
| <b>Gráfico 11:</b> | Níveis hepáticos de MDA (nmol/mg do órgão) nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6) .....   | 53 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|        |  |
|--------|--|
| Ang II | Angiotensina II                                |
| Ang I  | Angiotensina I                                 |
| ARBs   | Bloqueadores dos receptores de angiotensina II |
| BHE    | Barreira Hematoencefálica                      |
| CVLM   | Bulbo ventrolateral caudal                     |
| DAG    | Diacilglicerol                                 |
| DC     | Débito cardíaco                                |
| DCVs   | Doenças cardiovasculares                       |
| DGKs   | Diacilglicerol kinases                         |
| ECA    | Enzima conversora de angiotensina              |
| ECA 2  | Enzima conversora de angiotensina 2            |
| EROs   | Espécies reativas de oxigênio                  |
| ERNs   | Espécies reativas de nitrogênio                |
| FC     | Frequência cardíaca                            |
| FEN    | Fenilefrina                                    |
| GPCR   | Receptores acoplados a proteína G              |
| GRKs   | Protein-coupled receptor kinases               |
| HA     | Hipertensão arterial                           |
| IP     | Intervalo de Pulso                             |
| MDA    | Malondialdeído                                 |

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| NA                          | Núcleo ambíguo   |
| NADPH oxidase               | Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidase |
| NPS                         | Nitroprussiato de sódio                                    |
| NTS                         | Núcleo do trato solitário                                  |
| NO                          | Óxido nítrico  |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Ânion superóxido   |
| OCVs                        | Órgãos circunventriculares                                 |
| PA                          | Pressão arterial   |
| PAM                         | Pressão arterial média                                     |
| PAS                         | Pressão arterial sistólica                                 |
| PAP                         | Pressão arterial pulsátil                                  |
| PKC                         | Proteína kinase C  |
| PLC                         | Fosfolipase C  |
| PVN                         | Núcleo paraventricular do hipotálamo                       |
| RVPT                        | Resistencia vascular periférica total                      |
| RVLM                        | Bulbo ventrolateral rostral                                |
| SBRE                        | Sensibilidade do barorreflexo espontâneo                   |
| SHR                         | Ratos espontaneamente Hipertensos                          |
| SRAA                        | Sistema renina angiotensina aldosterona                    |
| SFO                         | Órgão Subfornical  |
| SNC                         | Sistema nervoso central                                    |

|        |  |
|--------|--|
| SNS    | Sistema nervoso simpático                    |
| TBARS  | Ácido Tiobarbitúrico                         |
| VS     | Volume sistólico                             |
| VSMC   | Células musculares lisas vasculares          |
| WKY    | Wistar Kyoto                                 |
| 7 TMRS | Receptores de sete domínios transmembranares |

# *Sumário*

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.Introdução</b> .....   | <b>20</b> |
| 1.1. Controle neural da pressão arterial - Barorreflexo .....   | <b>21</b> |
| 1.2. SRAA e a modulação da pressão arterial.....  | <b>23</b> |
| 1.3. Sinalização da Ang-II no receptor AT <sub>1</sub> .....  | <b>24</b> |
| 1.4. Agonistas tendenciosos para o receptor AT <sub>1</sub> .....   | <b>27</b> |
| 1.5. TRV120027 .....  | <b>29</b> |
| <b>2.Justificativa</b> .....  | <b>31</b> |
| <b>3.Objetivos</b> .....  | <b>34</b> |
| 3.1. Objetivo Geral.....  | <b>35</b> |
| 3.2. Objetivos Específicos .....  | <b>35</b> |
| <b>4.Material e métodos</b> .....   | <b>36</b> |
| 4.1. Animais.....   | <b>37</b> |
| 4.2. Drogas utilizadas .....  | <b>37</b> |
| 4.3. Grupos experimentais e desenho experimental .....  | <b>37</b> |
| 4.4. Implante das minibombas osmóticas.....   | <b>38</b> |
| 4.5. Implantação de Cateteres Vasculares e registro dos parâmetros cardiovasculares.....                                  | <b>39</b> |
| 4.6. Avaliação do efeito do TRV120027 sobre a sensibilidade do barorreflexo   | <b>41</b> |
| 4.7. Avaliação do efeito do TRV120027 sobre o balanço autonômico .....  | <b>42</b> |
| 4.8. Avaliação do estresse oxidativo .....  | <b>42</b> |
| 4.9. Análise Estatística .....  | <b>43</b> |
| <b>5.Resultados</b> .....   | <b>45</b> |
| 5.1. A administração intracerebroventricular do TRV120027 (20 ng/hora/dia) reduz a pressão arterial em ratos SHR .....    | <b>46</b> |
| 5.2. A administração intracerebroventricular de TRV120027 (20 ng/hora/dia) melhora a função autonômica em ratos SHR ..... | <b>48</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.3. A administração intracerebroventricular do TRV120027 melhora o barorreflexo em ratos SHR.....     | 50        |
| 5.4. A administração intracerebroventricular do TRV120027 reduz o estresse oxidativo em ratos SHR..... | 51        |
| <b>6.Discussão.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>7.Conclusão .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>8.Referências .....</b>   | <b>63</b> |
| <b>Anexo I.....</b>  | <b>78</b> |

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é um estado clínico multifatorial caracterizado pela elevação sustentada dos níveis de pressão sanguínea. Um indivíduo é considerado hipertenso se apresentar valores constantes de pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica maior ou igual a 90 mmHg (VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2016). Frequentemente a HA está associada a distúrbios metabólicos, alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo, sendo agravada pela presença de dislipidemias, obesidade e intolerância à glicose (MANCIA e cols, 2013; WHO, 2013; VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2016). Estudos apontam a elevação da pressão arterial (PA) como o principal fator de risco para a morbidade e mortalidade mundial entre homens e mulheres devido a doenças cardiovasculares (DCVs) (SARGANAS e NEUHAUSER, 2016; CHIUVE e cols., 2014; HUYNH, REID, e cols., 2014).

A HA pode ser classificada em primária ou secundária, a hipertensão primária, também chamada de hipertensão essencial é aquela cuja causa não é definida, acometendo 95% dos indivíduos hipertensos, já a hipertensão secundária tem sua etiologia definida, o que é importante para direcionar o tratamento (OPARIL, 1996; LESSA, 1998; VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2016; SILVA, 2006). A grande dificuldade está no tratamento da hipertensão primária devido à complexidade dos mecanismos subjacentes a esta desordem, os quais decorrem do desequilíbrio em um ou mais mecanismos de controle da PA.

A PA é determinada pelo produto do débito cardíaco (DC) pela resistência vascular periférica total (RVPT). O DC consiste no volume de sangue ejetado pelo coração a cada minuto, expresso como produto do volume sistólico (VS, em mL) pela frequência cardíaca (FC, em bpm); e a RVPT é determinada pelo tônus dos vasos sanguíneos (GUYTON, 2006; OATES *apud* HARDMAN e cols, 1996).

O controle da PA envolve uma ação integrada do sistema cardiovascular com os sistemas renal, nervoso, imunológico e endócrino, bem como a ação de vários hormônios e vias de sinalização (McARDLE e cols., 2003; COWLEY, 2006, GUYTON, 2006). Esse conjunto atua por mecanismos de retroalimentação que monitoram e ajustam a PA em curto e longo prazo (KRIEGER, 1964; BRISTOW e cols, 1969; DAMPNEY, 1994; DAMPNEY e cols., 2002).

Em curto prazo, a PA é regulada por mecanismos neurais de controle, já no controle em longo prazo da PA, os rins desempenham papel central por meio do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) e outros mecanismos renais (RABINOVITCH, FRIEDMAN, e cols., 2015; KOBORI, NANGAKU e NISHIYAMA, 2007).

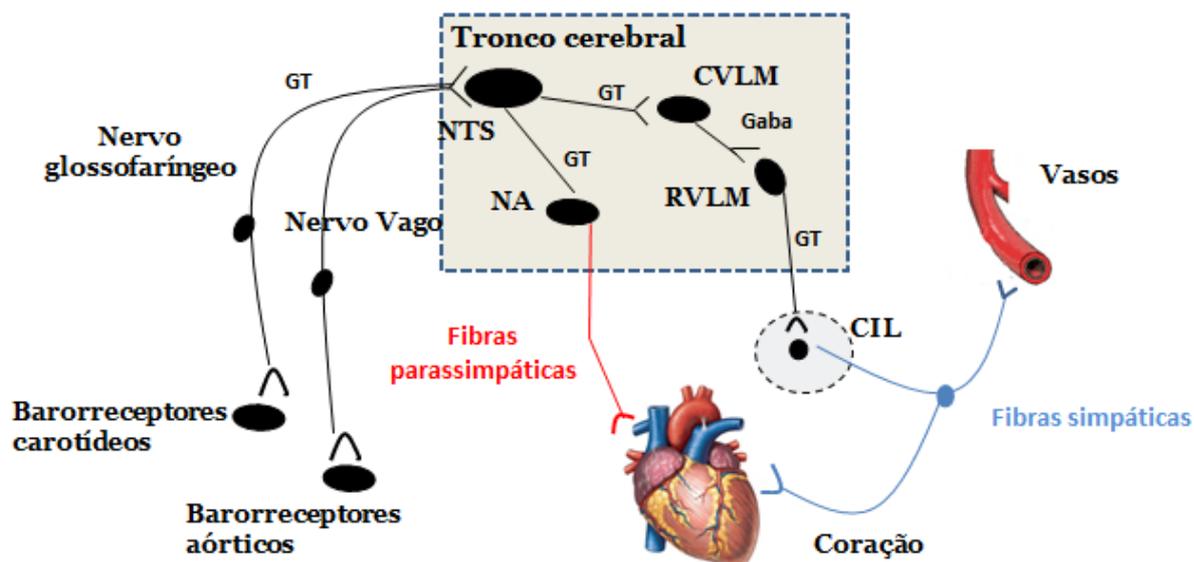
### **1.1. Controle neural da pressão arterial - Barorreflexo**

O controle em curto prazo da PA é modulado pelo sistema nervoso central (SNC) via reflexos cardiovasculares, caracterizados por promoverem ajustes rápidos de PA e frequência cardíaca (FC). Dentre eles, destaca-se o barorreflexo, capaz de monitorar a PA batimento a batimento, alterando quando necessário, o tônus simpático e parassimpático direcionado ao coração e vasos sanguíneos para que a pressão arterial seja mantida dentro dos níveis normais (BATLOUNI, 2001; CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; RABINOVITCH, FRIEDMAN, e cols., 2015).

O barorreflexo ocorre por meio dos barorreceptores (*baro* do grego: pressão), mecanorreceptores localizadas no arco aórtico e no seio carotídeo, especializados em responder ao grau de estiramento dos vasos decorrente das variações na pressão sanguínea (IRIGOYEN e cols., 2001; KRIEGER, 1964; CAMPAGNOLE-SANTOS, HAIBARA, 2001; DAMPNEY e cols., 2002).

Quando há uma elevação súbita da pressão arterial ocorre um aumento na frequência de disparo dos barorreceptores arteriais, esse estímulo é conduzido ao SNC pelo nervo depressor aórtico, o qual se junta ao nervo vago, e pelo nervo do seio carotídeo, o qual se junta ao nervo glossofaríngeo. O núcleo do trato solitário (NTS), localizado no bulbo, é o local onde ocorre a primeira sinapse das aferências oriundas dos barorreceptores arteriais. Do NTS partem duas vias distintas: a via parassimpato-excitatória e a via simpato-inibitória. Na via parassimpato-excitatória, neurônios do NTS enviam projeções excitatórias ao núcleo ambíguo (NA), onde encontram-se os corpos celulares de neurônios pré-ganglionares parassimpáticos. Na via simpato-inibitória neurônios do NTS enviam projeções excitatórias para a região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM), na qual encontram-se neurônios GABAérgicos que enviam projeções inibitórias para a região rostral ventrolateral do bulbo (RVLM), esta possui neurônios pré-

autônômicos simpáticos com atividade marcapasso, uma vez inibidos pelo CVLM, a atividade simpática direcionada a periferia é reduzida (CÔRREA e cols, 2008; DAMPNEY, 1994). A redução da atividade simpática associada ao aumento da atividade parassimpática direcionada ao coração e vasos reduz a pressão arterial até os valores normais. Por outro lado, quando há uma redução na PA, os barorreceptores não são ativados, favorecendo a simpato-excitação e a parassimpato-inibição com o aumento da PA aos valores considerados normais. Os componentes e as vias do barorreflexo estão demonstrados na Figura 1.



**Figura 1:** Aferências, eferências e regiões integradoras do barorreflexo. NTS, núcleo do trato solitário; CVLM, bulbo ventrolateral caudal; RVLM, bulbo ventrolateral rostral; CIL, coluna intermédio lateral; NA, núcleo ambíguo. GT, glutamato. Figura adaptada (ACCORSI-MEDONÇA e cols., 2005)

## 1.2. SRAA e a modulação da pressão arterial

O Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) desempenha importante papel na modulação da pressão arterial em longo prazo. A chave para a modulação de suas atividades está na variação da síntese e secreção de renina pelas células justaglomerulares. A diminuição na pressão arterial, na perfusão renal e/ou o aumento da atividade simpática induzem a liberação da renina na circulação (GUYTON e cols., 1972).

Uma vez na circulação, a renina cliva o angiotensinogênio, produzido no fígado, originando um decapeptídeo chamado angiotensina I, este sofre a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) formando um octapeptídeo denominado angiotensina II (Ang-II), considerado o principal peptídeo do SRAA (CAMPOS, 2009; SANTOS, 2013; ROMERO e cols. 2015).

A Ang-II exerce seus efeitos ligando-se a dois tipos de receptor, o AT<sub>1</sub> e o AT<sub>2</sub>. Eles estão localizados em todo o organismo, sendo a expressão do AT<sub>2</sub>R maior no período fetal, diminuindo após o nascimento, ou em estados patológicos (MEHTA; GRIENGLING, 2006). A maioria dos efeitos conhecidos da Ang-II são mediados pelo AT<sub>1</sub>R, que é amplamente distribuído em todos os órgãos, incluindo vasos sanguíneos, glândulas adrenais, coração e sistema nervoso (SADJATI e cols., 2002; CAMPOS, 2009; CAMPOS e cols., 2011).

A interação da Ang II ao AT<sub>1</sub>R promove entre outros efeitos, elevação da atividade simpática, retenção de sódio e água, secreção de aldosterona, vasoconstrição, e aumento da liberação de vasopressina, contribuindo assim para a elevação da pressão arterial (WERNER e cols., 2008).

Além dos efeitos periféricos induzidos pela Ang-II para a elevação da PA (NAKASHIMA e cols., 2006; YAN e cols., 2003; SOWERS e cols., 2004; KAWAI e cols, 2017), estudos têm mostrado que o efeito hipertensivo induzido pela Ang-II circulante é parcialmente mediado pelo SNC (BICKETON, 1960; ZIMMERMAN e cols., 2002; 2004; SAXENA, 1992; AVERILL, 2000).

Acredita-se que, em condições normais, a Ang-II circulante atua em receptores AT<sub>1</sub> presentes nos órgãos circunventriculares (OCVS), desprovidos de barreira hematoencefálica, tais como o órgão subfornical (SFO). Esta ação promove uma produção local de Ang-II em regiões centrais protegidas pela barreira hematoencefálica, onde componentes do SRAA são expressos, incluindo

áreas de controle cardiovascular como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o RVLM (COBLE e cols., 2015; PHILLIPS; SUMNERS, 1998; SAKAI, 2007; NUNES; BRAGA, 2011; SAAVEDRA, 2005).

Os OCVs enviam projeções ao PVN, importante núcleo para a modulação autonômica cardiovascular, neurônios pré-simpáticos do PVN projetam-se para o RVLM a fim de modular a descarga simpática para a periferia (BAINS e cols., 1992; KOSHIYA; GUYENET, 1996; STERN e cols., 2016). A partir desses e outros estudos, o nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a sugerir que a sinalização mediada pela Ang-II no eixo SFO-PVN-RVLM está relacionada com o aumento da atividade simpática, a redução na sensibilidade do barorreflexo e a hipertensão (BRAGA e cols., 2011).

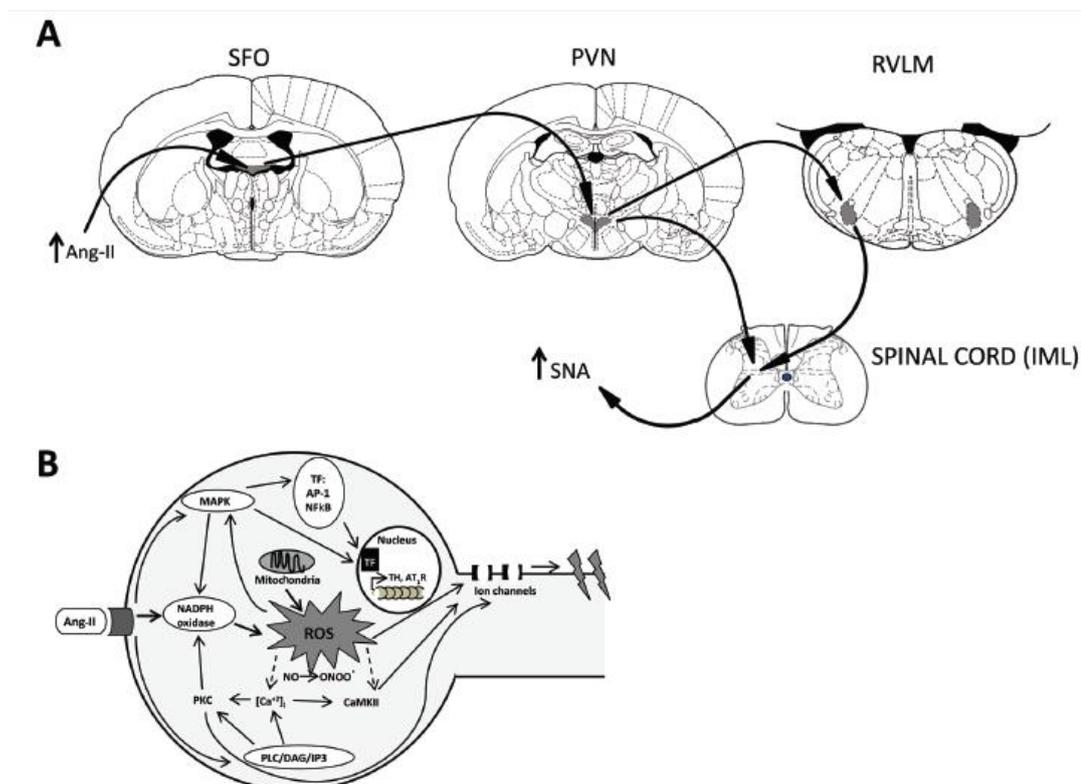
### **1.3. Sinalização da Ang-II no receptor AT<sub>1</sub>**

O receptor AT<sub>1</sub> para a Ang-II pertence ao grupo dos receptores acoplados à Proteína G (GPCRs), ou receptores de sete domínios transmembranares (7TMRS), assim denominados por sua estrutura contendo sete segmentos  $\alpha$ -hélice que atravessam a bicamada lipídica. Esses receptores são largamente conhecidos por suas inúmeras funções, podendo ser ativados por uma enorme diversidade de ligantes tais como: neurotransmissores, peptídeos, lipídeos, carboidratos e glicoproteínas que levam a ativação de proteínas G heterotriméricas seguida pelo recrutamento de  $\beta$ -arrestinas (MAUDSLEY e cols., 2012; MAUDSLEY e cols., 2005, VENKATAKRISHNAN e cols. 2013; IKEDA e cols., 2015).

A via de sinalização clássica acoplada ao AT<sub>1</sub>R envolve a ativação da Proteína G<sub>q/11</sub> e consequentemente da fosfolipase C (PLC), esta é responsável por clivar o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), produzindo trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), o IP<sub>3</sub> estimula a liberação de cálcio do retículo endoplasmático pela ativação dos receptores sensíveis ao IP<sub>3</sub>. O DAG junto com o cálcio promove a ativação de proteína cinase C (PKC), responsável por fosforilar diversos alvos gerando uma variedade de efeitos (COLLIER e cols., 2000; WEBB, 2003). Dentre os alvos da PKC convém destacar a enzima NADPH oxidase, principal enzima responsável pela produção de ânions superóxido e

consequentemente outras espécies reativas de oxigênio (EROs) (ERDOS e cols., 2006).

A ativação da NADPH oxidase pela Ang-II continua em investigação e sabe-se hoje que outras proteínas como a PI<sub>3</sub>K e MAPKs podem estar envolvidas nesse efeito (MEHTA; GRIENGLING, 2006; BRAGA e cols., 2011). Algumas MAPKs podem ainda ativar fatores de transcrição nuclear como a proteína ativadora 1 (AP-1) e o NFκB, que modulam positivamente a expressão de receptores AT<sub>1</sub>. A Figura 2 apresenta este conjunto de vias ativadas pela Ang-II no eixo SFO-PVN-RVLM.



**Figura 2:** A, a Ang-II no eixo SFO-PVN-RVLM. Diagrama mostrando quatro seções coronais onde o órgão subfornical (SFO), o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) foram destacados em cinza. B, Mecanismos envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pela Ang-II e seu papel na célula neuronal. AP-1 = proteína ativadora 1; CaMKII = proteína quinase II dependente de cálcio / calmodulina; DAG = diacilglicerol; IP<sub>3</sub> = inositol 1,4,5-trisfosfato; NFκB = fator nuclear kappa-leve-cadeia-potenciador de células B ativadas; PLC = fosfolipase C (BRAGA e cols., 2011).

A geração de EROs em regiões como o SFO, PVN e RVLM, é hoje considerada o principal fator responsável pelos efeitos da Ang II na hiperatividade simpática, disfunção do barorreflexo e no desenvolvimento e manutenção da

hipertensão arterial (BRAGA e cols, 2011; CHENG e cols, 2010). O aumento na atividade nervosa simpática decorrente das EROs ocorre, pelo menos em parte, devido a mudanças no funcionamento de canais iônicos, especialmente canais para cálcio e potássio, alterando as propriedades de disparo neuronal nessas regiões (GUYENET, 2006; ZIMMERMAN, 2002; 2004; BRAGA e cols., 2011).

Apesar da maioria dos efeitos conhecidos da Ang-II serem mediados pela ativação da Proteína  $G_{q/11}$  acoplada ao  $AT_1R$ , sabe-se que a rede de eventos desencadeada por GPCRs é complexa e geralmente envolve múltiplas vias de sinalização intracelular e nem todas as sinalizações induzidas por GPCRs derivam da ativação da proteína G (VIOLIN e cols., 2010, 2014).

As vias alternativas ativas por GPCRs mais gerais são mediadas por  $\beta$ -arrestinas, que se ligam a receptores ativados para dessensibilizar a sinalização da proteína G, promover a internalização do receptor e ativar cascatas distintas de transdução de sinal (REITER; LEFKOWITZ, 2006; DEWIRE e cols., 2008). A maioria dos GPCR irá acoplar-se a pelo menos uma proteína G e uma  $\beta$ -arrestina (SCHMID e BOHN, 2009).

Arrestinas são proteínas citoplasmáticas, sobre as quais foram descritas quatro isoformas, duas expressas exclusivamente na retina, arrestina 1 e 4; e duas expressas ubiquamente, arrestinas 2 e 3, também conhecidas como  $\beta$ -arrestina 1 e  $\beta$ -arrestina 2 (LUTTRELL; LEFKOWITZ, 2002; REITER e cols., 2006).

Estudos comprovaram que a sinalização do receptor  $AT_1$  pode ser separada em dois componentes principais, via proteína  $G_{q/11}$  e via  $\beta$ -arrestinas 1 e 2 (TOHGO e cols., 2002; WEI e cols., 2003; AHN e cols., 2004; HUNYADY e CATT, 2006). O recrutamento de  $\beta$ -arrestinas pela ativação do  $AT_1R$  induz a internalização e dessensibilização do receptor, bem como a ativação de outras vias de sinalização intracelular, promovendo uma regulação negativa do receptor e efeitos opostos aos induzidos pela Ang-II mediante a ativação da proteína  $G_{q/11}$  (MEHTA; GRIENDLING, 2006; TILLEY, 2011).

Uma recente publicação de Wang e cols (2017) relatou que na hipertensão há um decréscimo na expressão da  $\beta$ -arrestina 2 no RVLM e a sua superexpressão nesta região era capaz de reduzir a pressão arterial, frequência cardíaca e a atividade nervosa simpática em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

É importante relatar que a sinalização mediada pela  $\beta$ -arrestina acoplada ao  $AT_1R$  tornou-se relevante na busca de novas terapias contra doenças cardiovasculares, e portanto, o conceito de agonista tendencioso emergiu como um novo paradigma (NOOR e cols., 2010; VIOLIN e cols., 2013; WHALEN e cols., 2011).

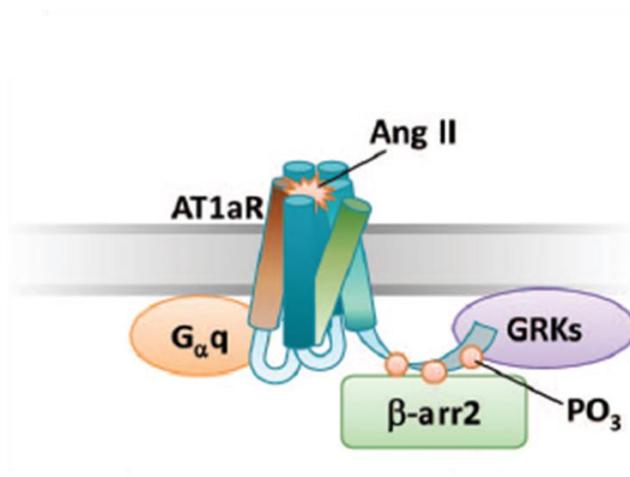
O agonista tendencioso é um composto que pode ativar seletivamente um subconjunto de vias pertencentes a sinalização normal de um receptor (WEI e cols., 2003; GESTY-PALMER e cols., 2006; MAILMAN, 2007; AHN e cols., 2009, ZIDAR e cols., 2009). Esses ligantes são agonistas quando estimulam determinadas vias do receptor, mas são antagonistas ou mesmo agonistas inversos quando inibem outras vias do receptor (VIOLIN e LEFKOWITZ, 2007; KENAKIN, 2009).

O receptor  $AT_1R$  tem sido uma rica fonte de descobertas sobre os agonistas tendenciosos, permitindo a síntese de vários análogos da Ang-II, capazes de ativar seletivamente a via da  $\beta$ -arrestina (WEI e cols., 2003; AHN e cols., 2004).

#### **1.4. Agonistas tendenciosos para o receptor $AT_1$**

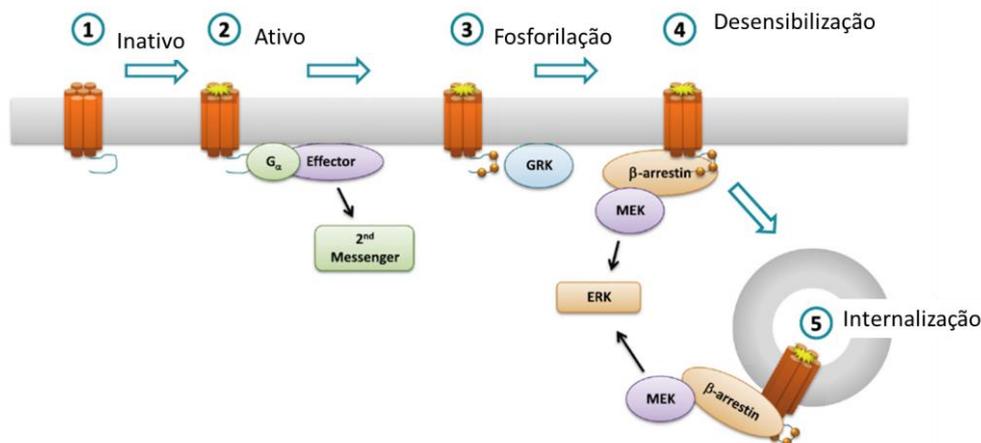
A ativação da  $\beta$ -arrestina pelo  $AT_1R$  promove todas as funções inerentes a esta classe de proteínas: dessensibilização, internalização do receptor e sinalização intracelular (VIOLIN e cols., 2006; KULE e cols., 2004; BARNES e cols., 2005; DEWIRE e cols., 2008; DEWIRE e cols. 2011).

Fisiologicamente, após a ativação da proteína  $G_{q/11}$  pelo acoplamento Ang-II/ $AT_1R$  e consequentes respostas intracelulares, a região C-terminal do receptor é fosforilada por ação de quinases de receptores acoplados a proteína G (GRKs), processo que estimula o recrutamento das arrestinas, como demonstrado na Figura 3.



**Figura 3:** Ilustração mostrando a ativação da via clássica e da via da  $\beta$ -arrestina pelo receptor AT $_1$ R (Adaptada DEWIRE e cols., 2011).

As arrestinas por sua vez medeiam a formação de vesículas, internalização e consequentemente dessensibilização desses receptores, como demonstrado na figura abaixo (DAWSON e cols., 1992; LOHSESB e cols., 1992; PIPPIG e cols., 1993).



**Figura 4:** Ilustração mostrando a ativação da via da  $\beta$ -arrestina e como acontece a internalização do receptor (Adaptada VIOLIN e cols., 2013).

Estudos realizados com análogos para Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) descreveram sua interessante capacidade seletiva na ativação da via da  $\beta$ -arrestina. O primeiro peptídeo e mais utilizado foi o SII (Sar-Arg-Val-Ile-Ile-His-Pro-Ile) descrito por Holloway e cols (2002). Este péptido foi inicialmente descrito por promover fosforilação e internalização do AT $_1$ R e ativação da ERK (HOLLOWAY, 2002), o composto foi capaz de reduzir a apoptose (AHN e cols., 2009; RAKESH e cols., 2010) estimular a quimiotaxia, (HUNTON e cols., 2005;

SUN e cols., 2000) promover síntese, crescimento e proliferação celular (DEWIRE e cols., 2008; AHN e cols., 2009; KIM e cols., 2008) e a contratilidade cardíaca (RAJAGOPAL e cols., 2006).

Recentemente foram desenvolvidos outros agonistas tendenciosos para o AT<sub>1</sub>R chamados TRV, dentre eles temos o TRV120023, TRV120026, TRV120034, TRV120044, TRV120045, TRV130, TRV100 e o TRV120027 (KIM e cols. 2012, VIOLIN e cols., 2014, VIOLIN e cols., 2013, MONASKY e cols., 2013, STRACHAN e cols., 2014). Estudos revelaram um potencial cardioprotetor para alguns dos compostos citados, e o TRV120027 ganhou destaque sendo amplamente estudado.

### 1.5. TRV120027

O TRV120027 (Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-DAla-OH) foi sintetizado pela substituição do aspartato (Asp) na posição 1 e da fenilalanina (Phe) na posição 8 da Ang-II. Esse composto é 30 vezes mais potente que o agonista tendencioso SII e tem sido estudado *in vivo* e *in vitro* em ratos e cães, como também em humanos para o tratamento da insuficiência cardíaca (VIOLIN e cols., 2010; BOERRIGTER, 2011, 2012).

Violin e cols (2010) relataram que o TRV120027, semelhante aos antagonistas do AT<sub>1</sub>R, bloqueou a ativação da proteína G mediada pelo receptor, mas, ao contrário dos antagonistas, o TRV120027 estimulou o recrutamento de  $\beta$ -arrestina para o AT<sub>1</sub>R, promovendo a sua internalização. Além disso, o TRV120027 ativou um padrão único de sinalização incluindo as proteínas ERK1/2, Src e eNOS, FAK e c-Jun, compatíveis com o recrutamento de  $\beta$ -arrestina.

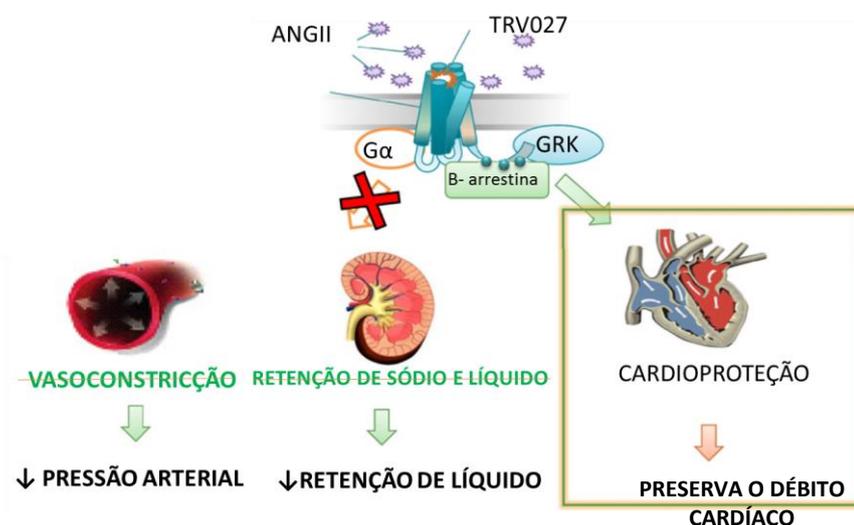
Devido as suas propriedades farmacológicas, o TRV120027 atua como um bloqueador convencional de receptores AT<sub>1</sub>, inibindo a vasoconstrição mediada pela Ang II ao ativar a proteína G<sub>q/11</sub>, ao mesmo tempo que induz vasodilatação e melhora a contratilidade dos cardiomiócitos através da ativação de vias dependentes da  $\beta$ -arrestina (BOERRIGTER, 2011; VIOLIN e cols., 2010).

Nos modelos animais de insuficiência cardíaca, o TRV120027 mostrou ser um potente vasodilatador ao passo que aumenta o débito cardíaco, preservou a taxa de filtração glomerular enquanto diminuiu a resistência vascular renal e

aumentou o fluxo sanguíneo neste órgão, diminuindo a retenção de líquido (BOERRIGTER e cols., 2011; 2012).

Adicionalmente, o TRV120027 apresentou efeito hipotensor em cães normais e com insuficiência cardíaca bem como em ratos normotensos (BOERRIGTER e cols, 2011; 2012; Violin e cols., 2010). Soergel e cols. (2013) demonstraram que o TRV120027 é seguro e promove redução na pressão arterial em humanos saudáveis com elevados níveis de renina plasmática e em pacientes com insuficiência cardíaca estável.

A figura abaixo resume os efeitos fisiológicos promovidos pelo TRV120027, este agindo pela via de sinalização da  $\beta$ -arrestina bloqueia o efeito do SRAA/Ang II na vasculatura e rim, enquanto protege ou aprimora os sinais de contratilidade cardíaca (VIOLIN e cols., 2013).



**Figura 5:** Efeitos da  $\beta$ -arrestina na via do AT<sub>1</sub>R. TRV120027 se liga no receptor AT<sub>1</sub>R, prevenindo a ligação da AngII circulante, evitando que o AT<sub>1</sub>R se ligue a proteína G e promova vasoconstrição e retenção de água e sódio, diminuindo a pressão arterial e diminuindo a retenção de líquido quando os níveis de AngII estejam aumentados. Ao mesmo tempo o TRV120027 promove o engajamento de quinases de GPCR (GRKs), que fosforilam o AT<sub>1</sub>R para facilitar a ligação da  $\beta$ -arrestina promovendo sinais independentes de proteína G que aumentam a contratilidade e previnem a apoptose cardíaca para preservar o débito cardíaco em face do estresse hemodinâmico e / ou metabólico. (Adaptada VIOLIN e cols., 2013)

Embora a administração periférica do TRV120027 tenha induzido efeitos hipotensores em animais e humanos normotensos, nenhum estudo avaliando o papel deste agonista tendencioso foi realizado na presença da hipertensão.

*Justificativa*

## 2. JUSTIFICATIVA

As DCVs configuram a principal causa de morte em todo o mundo. Cerca de 17 milhões de pessoas morrem anualmente por alguma DCV e a HA é responsável por mais de 50% desses óbitos (9,4 milhões de mortes por ano), sendo, portanto, um grave problema de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

As mudanças no estilo de vida das populações têm aumentado a incidência da HA nos últimos anos. Apesar dos avanços ocorridos na compreensão dos mecanismos determinantes da hipertensão e na obtenção de terapias contra esta desordem, dados demonstram que 29,2% da população adulta mundial deverão ter essa condição até o ano de 2025 (KEARNEY e cols., 2005; WHO, 2013). Além disso, muitos indivíduos não conseguem manter os níveis de pressão arterial sob controle apesar do tratamento (OPARIL e cols., 2005). Essa dificuldade ocorre devido à complexidade dos fatores que determinam o processo hipertensivo, justificando a importância de mais estudos com este foco.

O SRAA é estreitamente relacionado à hipertensão e outras DCVs. Como visto anteriormente, efeitos centrais e periféricos induzidos pela Ang-II no AT<sub>1</sub>R são determinantes para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão, e a sinalização deste octapeptídeo tem sido extensivamente investigada na busca de novas abordagens terapêuticas. A relevância das vias de sinalização independentes da proteína G acoplada ao AT<sub>1</sub>R, em especial a via envolvendo a  $\beta$ -arrestina ganhou importância pelo fato dos efeitos provocados serem muitas vezes contrários aos induzidos pela proteína G, o que possibilitou a síntese e o estudo de ligantes tendenciosos para o AT<sub>1</sub>R. Dentre eles, destaca-se o TRV120027, capaz de reduzir a pressão arterial e induzir outros efeitos cardioprotetores pelo recrutamento da  $\beta$ -arrestina (VIOLIN e cols., 2010; BOERRIGTER, 2011, 2012; SOERGEL e cols., 2013).

Considerando as propriedades farmacológicas do TRV120027, os efeitos cardioprotetores atribuídos à  $\beta$ -arrestina e o envolvimento da  $\beta$ -arrestina 2 central na redução da pressão arterial, frequência cardíaca e atividade simpática, como relatado por Wang e cols. (2017), nós utilizamos o TRV120027 para melhor

entender o papel da sinalização tendenciosa de receptores AT<sub>1</sub> localizados no SNC na hipertensão.

A nossa hipótese é que a administração central do TRV120027 pode reduzir a pressão arterial e a atividade nervosa simpática, promovendo efeitos periféricos cardioprotetores na presença da hipertensão. Para testar nossa hipótese, utilizamos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar Kyoto, nos quais o TRV120027 foi infundido centralmente por 14 dias, seguido de estudos *in vivo* e *in vitro* para a avaliação dos efeitos cardiovasculares induzidos por este tratamento.

*Objetivos*

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pela administração intracerebroventricular do TRV120027 em ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar se os efeitos da administração intracerebroventricular do TRV120027 reduz a pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC).
- Avaliar se os efeitos da administração intracerebroventricular do TRV120027 melhora o balanço autonômico e a sensibilidade do barorreflexo.
- Avaliar se o efeito da administração intracerebroventricular do TRV120027 reduz o estresse oxidativo sérico, renal e hepático nesses animais.

# *Material e métodos*

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Foram utilizados ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR) com 12 semanas de idade. Os ratos foram alojados em gaiolas numa sala com temperatura controlada ( $21 \pm 2$  °C), obedecendo a um ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração (Labina®, Purina). Os animais foram provenientes do Biotério Thomas George, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e do Biotério Central da Faculdade de Medicina/USP. Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB sob parecer nº090/2016 (ANEXO I).

### **4.2. Drogas utilizadas**

Foram utilizadas as seguintes substâncias: TRV120027 fornecido e desenvolvido por Treverna Inc. (GenScript, EUA). Heparina (Parinex® 5000 U.I/ml - Laboratório Hipolabor Brasil); cloridrato de cetamina (Quetamina® Laboratório – Vetnil, Brasil); xilazina (Dopaser - Laboratório Calier, Espanha). Cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN); nitroprussiato de sódio (NPS); atropina; cloridrato de propranolol; cloreto de hexametônio. Todas foram obtidas da Sigma-Aldrich®. Buprenorfina e Pentabiótico Veterinário de amplo-espectro (Fort Dodge, SP, Brasil);

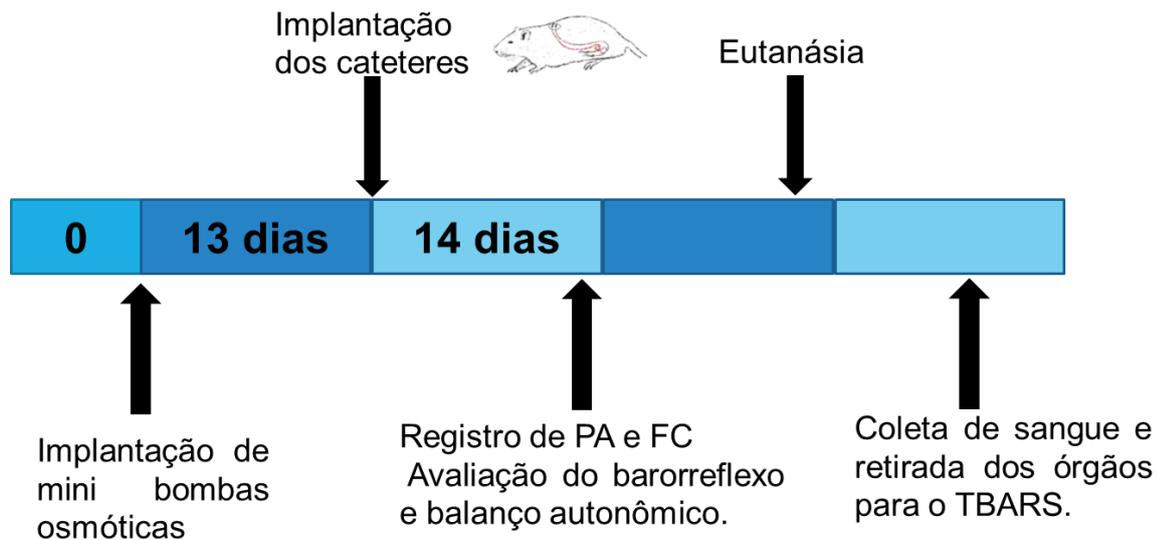
### **4.3. Grupos experimentais e desenho experimental**

Os animais foram divididos em quatro grupos:

1. WKY-C: ratos Wistar Kyoto sem tratamento
2. WKY+TRV: ratos Wistar Kyoto tratados com o TRV120027
3. SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos sem tratamento
4. SHR+TRV: ratos espontaneamente hipertensos tratados com o TRV120027.

O tratamento com o TRV120027 foi realizado por infusão intracerebroventricular (ICV), utilizando-se minibombas osmóticas (ALZET modelo 1002, taxa de infusão, 0.25  $\mu\text{l/h}$ ) para a infusão contínua do composto (20 ng/hora/dia) durante um período de 14 dias.

A Figura 6 apresenta o desenho experimental do estudo realizado com os quatro grupos de animais.



**Figura 6:** Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental.

#### 4.4. Implante das minibombas osmóticas

Após anestesiados com cetamina (75 mg/Kg, i.p.) + xilazina (20 mg/Kg, i.p.), os animais foram colocados em decúbito ventral no aparelho estereotáxico (Harvard Apparatus, Holliston, MA, Estados Unidos), a região superior da cabeça do animal foi tricotomizada e fixada por meio de duas barras auriculares ao estereotáxico. Em seguida foi realizada uma incisão na região do escalpo, expondo a região superior do crânio subjacente (Figura 7A). A torre do estereotáxico foi posicionada em angulação zero e a cabeça do animal ajustada até que os pontos Bregma e Lâmbda fossem localizados no mesmo plano horizontal. Em seguida, foram realizadas as leituras dos parâmetros antero-posterior (AP) 0,5mm; latero-lateral (L) +1,4mm; e dorso-ventral (DV) 3,9 mm, tomando-se como referência o bregma, e com o auxílio de um atlas estereotáxico

(Paxinos & Watson 1996), os pontos de introdução das cânulas guia foram determinados.

Foi implantada uma cânula guia em direção ao ventrículo lateral, a qual foi fixada com auxílio de uma cola própria (Figura 7B). Acoplada à cânula guia, a bomba de infusão foi acomodada subcutaneamente no dorso do animal (Figura 7C). Cada minibomba foi preenchida de forma que a taxa de liberação foi 20 ng/hora/dia, durante 14 dias e no décimo terceiro dia foi feita a implantação dos cateteres.



**Figura 7** – Implantação de minibombas osmóticas. A. incisão na região do escalpo; B. fixação da cânula; C. acomodação subcutânea da minibomba (GALVÃO, 2016).

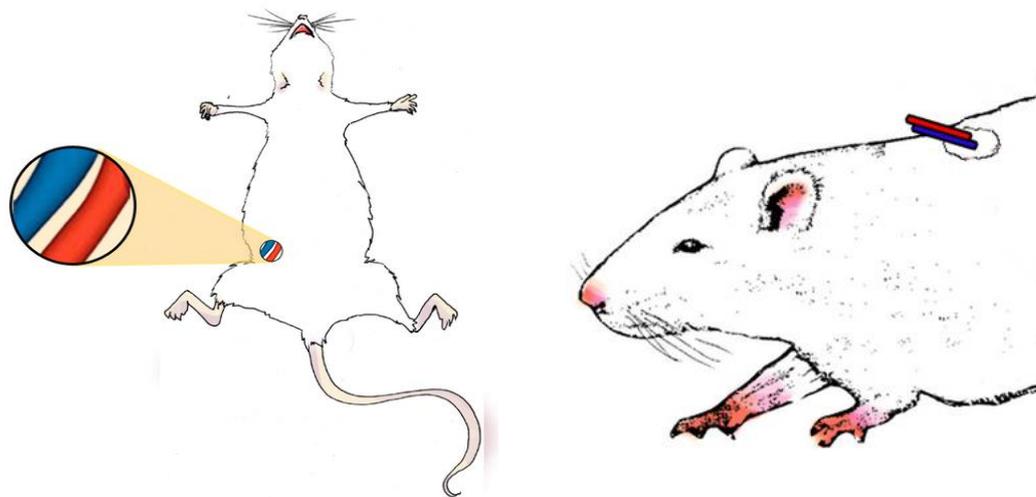
Após o procedimento cirúrgico, foi administrada a buprenorfina (0,5 mg/kg, sc) e o Pentabiótico Veterinário (0,1 ml/100 g, im) como profilaxia analgésica e antimicrobiana. Os animais foram acompanhados para a observação de qualquer sinal de dor ou estresse durante o período de tratamento e continuaram recebendo água e ração *ad libitum*.

#### **4.5. Implantação de Cateteres Vasculares e registro dos parâmetros cardiovasculares**

Na confecção dos cateteres foram utilizados tubos de polietileno PE-10 (diâmetro externo e interno de 0,61 e 0,28 mm, respectivamente) conectados a tubos PE-50 (diâmetro externo e interno de 0,96 e 0,58 mm, respectivamente).

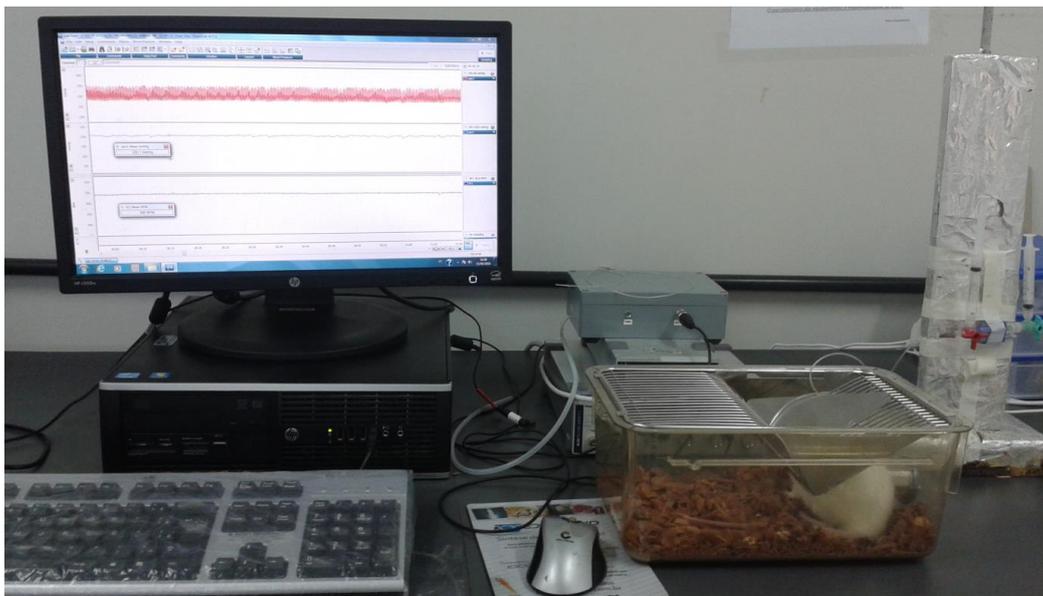
Para a implantação, no 13º dia de tratamento os animais foram novamente anestesiados com cetamina e xilazina (75 e 10 mg/kg, i.p.), em seguida, foram colocados em decúbito dorsal sobre uma prancha cirúrgica. Por meio de incisão na região femoral localizou-se o feixe vâsculo-nervoso femoral. Artéria e veia

femorais foram identificadas e dissecadas. As extremidades PE-10 dos cateteres foram introduzidas em direção à aorta abdominal, via artéria femoral, para registro dos parâmetros cardiovasculares e em direção à veia cava caudal, por meio da veia femoral, para administração das drogas, os cateteres foram fixados por linhas cirúrgicas e tunelizados subcutaneamente na região dorsal, onde foram exteriorizados (Figura 8). Os cateteres foram preenchidos com solução salina (NaCl 0,9%) heparinizada afim de evitar obstruções.



**Figura 8:** Ilustração do procedimento de implantação dos cateteres vasculares. A, identificação e dissecção da artéria e veia femoral, locais de inserção dos cateteres. B, exteriorização dos cateteres na região dorsal do animal.

Aferições da PA e FC foram realizadas 24 horas após a implantação dos cateteres em animais conscientes e com livre movimentação (Figura 8). O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (Modelo BRPL2, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, EUA) acoplado a um amplificador e conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, New South Wales, Austrália). Como software de aquisição e análise foi utilizado o LabChart 5.0, que permite obter os valores de pressão arterial sistólica e diastólica (PAS e PAD), dos quais derivaram os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), como demonstrado na Figura 9.



**Figura 9:** Equipamento utilizado para medida de PA e FC (CAVALCANTI, 2016).

#### 4.6. Avaliação do efeito do TRV120027 sobre a sensibilidade do barorreflexo

Diversos métodos são utilizados para avaliar experimentalmente o barorreflexo, dentre eles, o mais frequente trata-se do método de Oxford que consiste na ativação desse reflexo por drogas vasoativas, o que permite verificar as mudanças na FC em resposta a manipulações farmacológicas que aumentam ou diminuem a PA (BRAGA e cols., 2008).

Após 60 minutos de estabilização, variações na pressão arterial foram provocadas pela administração *in bolus* de fenilefrina (8 µg/Kg), agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, e nitroprussiato de sódio (25 µg/Kg), um doador de NO, os quais promoveram elevação ou redução da PA, respectivamente. A resposta reflexa na FC após a administração dessas drogas foi observada.

A sensibilidade do barorreflexo foi avaliada por meio da avaliação do ganho do sistema, isto é, da relação entre a variação de FC (bpm) e a variação de PAM (mmHg) (Ganho =  $\Delta FC / \Delta PAM$ ), sendo avaliado pela seguinte fórmula:

$$I_s = \frac{\Delta FC}{\Delta PAM}$$

- $I_s$  = Índice de sensibilidade;
- $\Delta FC$  = Variação da FC (bpm);
- $\Delta PAM$  = Variação da PAM (mmHg);

Todos os dados de cada grupo foram analisados por regressão linear usando o programa GraphPad Prism e o slope da regressão linear forneceu o ganho do barorreflexo de cada grupo.

Foi avaliada também a sensibilidade do barorreflexo espontâneo (SBRE), como previamente descrito (BRAGA e cols, 2008; FAZAN e cols, 2001). Uma sequência de barorreflexo foi definida como uma sequência de pelo menos quatro batidas do coração em que PAS e intervalo de pulso (IP) estavam aumentados (sequências altas, *high sequences*) ou diminuídos (sequências baixas, *low sequences*). O ganho da resposta barorreflexa foi calculada e expressa em intervalo de pulso por variações de pressão (ms/mmHg). Traçados foram analisados usando o software HeMoLab (gentilmente fornecido pelo Dr. Harald Stauss, Universidade de Iowa, versão 9.3).

#### **4.7. Avaliação do efeito do TRV120027 sobre o balanço autonômico**

A função autonômica foi avaliada utilizando as seguintes ferramentas farmacológicas: o propranolol (5mg/kg), bloqueador dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos; atropina (2 mg/kg), bloqueador dos receptores muscarínicos; e o hexametônio (30 mg/kg), bloqueador dos receptores nicotínicos ganglionares. foram calculados e expressos como  $\Delta FC$  (bpm). Cada administração foi separada por um período de recuperação de pelo menos 3 horas.

Mudanças na frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) ou pressão arterial média ( $\Delta PAM$ ) foram calculadas após a administração desses bloqueadores e comparadas entre os grupos avaliados.

#### **4.8. Avaliação do estresse oxidativo**

O estresse oxidativo foi avaliado medindo-se os níveis de malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica que reage com o ácido tiobarbitúrico para produzir um complexo de cor vermelha, este pode ser quantificado por espectrofotometria com pico de absorbância a 532 nm (GUTTERIDGE, 1981; RIOS e cols., 2010; MONTEIRO e cols., 2012).

Após eutanásia dos animais o sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante, centrifugado em 5000 rpm, 4°C, por 10 minutos para obtenção do

soro. Da mesma forma, foram retirados os rins e o fígado, os órgãos foram lavados com solução salina para minimizar a interferência da hemoglobina com radicais livres e para remover o sangue aderido aos tecidos. Em seguida, foram triturados, homogeneizados com a ajuda de um homogeneizador de tecido e tampão KCl 10%. Para cada 100 mg de tecido foi utilizado 1 ml de KCl.

A metodologia utilizada para quantificar o MDA foi a mesma para o soro e os órgãos: 250  $\mu$ L do homogenado dos órgãos ou 250  $\mu$ L do soro foram coletados e incubados a 37 °C por 1 hora em banho aquecido. Depois 400  $\mu$ L de ácido perclórico (35%) foi adicionado com função de solução extratora e lisante celular, a mistura foi centrifugada a 600 g (centrífuga Hermle Z326K) por 20 minutos a 4°C. Em seguida, 400  $\mu$ L do sobrenadante foi removido, misturado com 400  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico (0,6%) e incubado a 100°C por 1 hora em banho aquecido. Após arrefecer, a absorbância foi mensurada no equipamento de análise bioquímica Chem Well T (Figura 10) no comprimento de onda de 532 nm. Uma curva padrão de MDA foi construída com concentrações entre 0 e 100 nmol/ml antes da leitura das amostras. Os resultados foram expressos como nmol de MDA/mg de tecido para os órgãos ou nmol de MDA/ml de soro.



**Figura 10:** Equipamento de análise bioquímica Chem Well (CAVALCANTI, 2016).

#### **4.9. Análise Estatística**

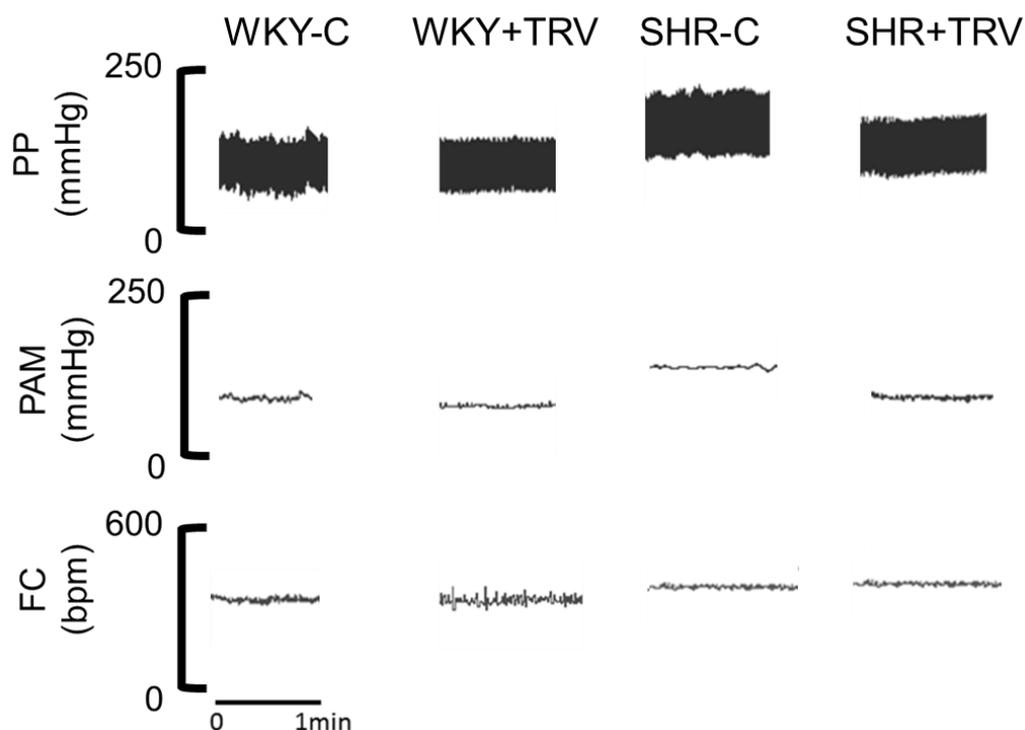
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foi realizado o ANOVA One Way, seguido do pós-teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 95%, sendo as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . O programa utilizado foi o GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

*Resultados*

## 5. RESULTADOS

### 5.1. A administração intracerebroventricular do TRV120027 (20 ng/hora/dia) reduz a pressão arterial em ratos SHR

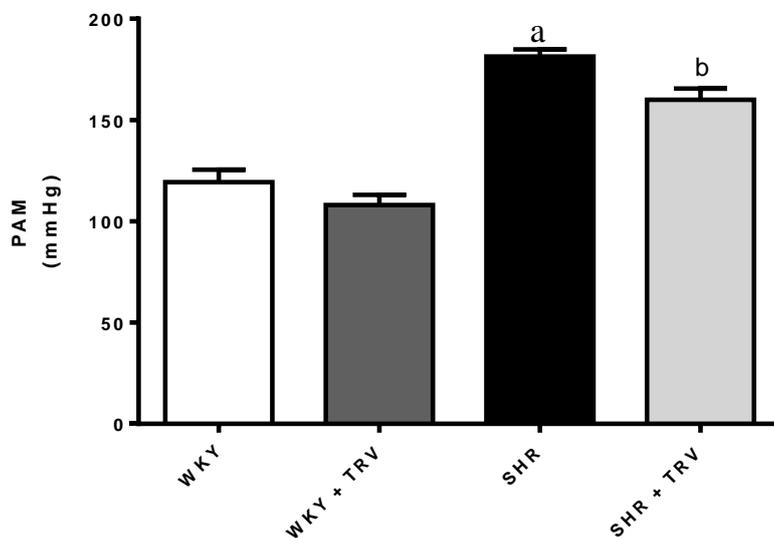
O Gráfico 1 mostra os traçados representativos da pressão arterial pulsátil (PP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basais de um animal de cada grupo estudado (WKY-C, WKY+TRV, SHR-C, SHR+TRV).



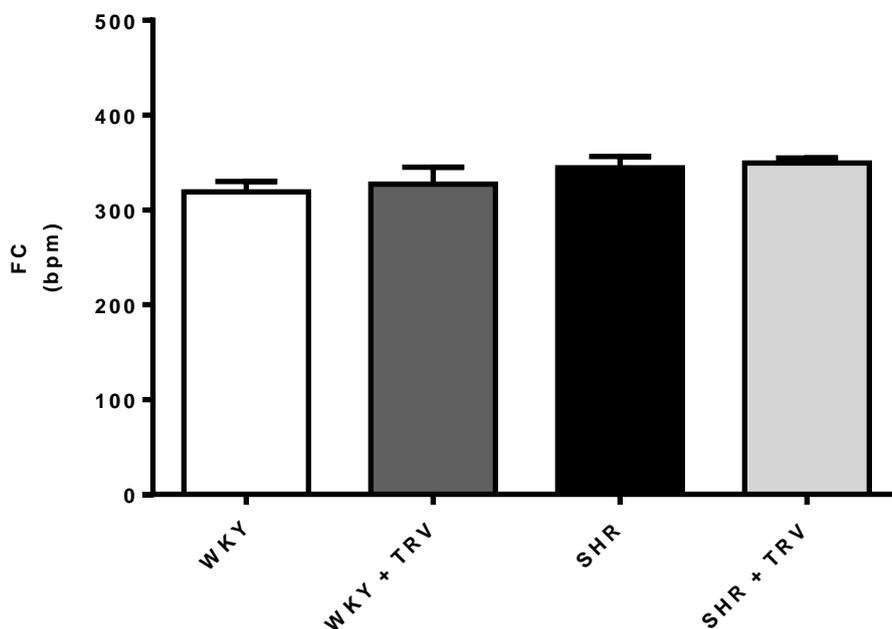
**Gráfico 1:** Traçados representativos de um animal de cada grupo mostrando a pressão arterial pulsátil (PP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

Após o período de estabilização, a pressão arterial e a frequência cardíaca basais foram analisadas em todos os grupos. Como já esperado, os ratos SHR-C apresentaram níveis elevados de PAM quando comparados aos ratos WKY-C ( $181 \pm 3$  vs.  $119 \pm 6$  mmHg,  $p < 0,05$ ). O tratamento ICV com o TRV120027 (20 ng/hora/dia) por 14 dias foi capaz de reduzir a PAM dos animais SHR+TRV em relação ao grupo SHR-C ( $160 \pm 5$  vs.  $181 \pm 3$  mmHg,  $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os níveis de pressão arterial do grupo WKY-C e WKY+TRV ( $108 \pm 5$ ) (Gráfico 2).

Como pode ser observado no Gráfico 3, a frequência cardíaca não foi alterada significativamente entre os grupos, WKY-C ( $319 \pm 10$  bpm), WKY+TRV ( $327 \pm 17$  bpm), SHR-C ( $344 \pm 5$  bpm) e SHR+TRV ( $349 \pm 5$  bpm).



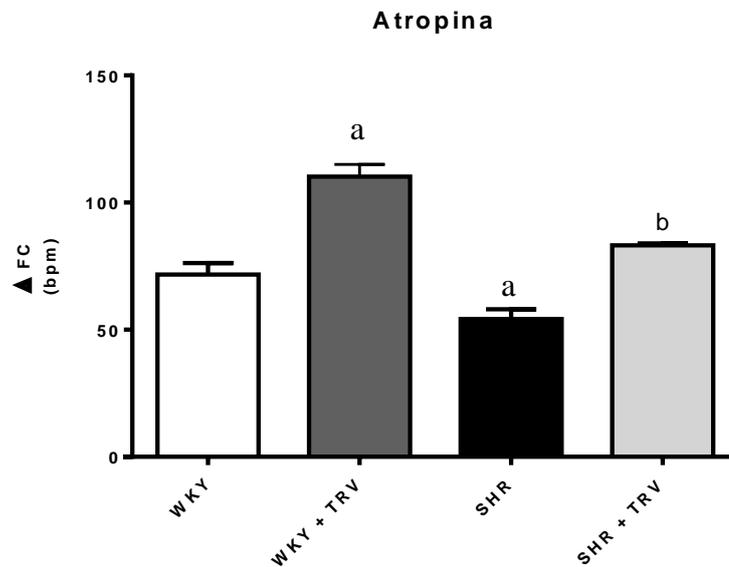
**Gráfico 2:** Pressão arterial média basal dos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9), SHR +TRV (n=6) que receberam infusão ICV do TRV120027 (20 ng/hora/dia) por 14 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. a,  $p < 0,05$  vs. WKY - C; b,  $p < 0,05$  vs. SHR-C.



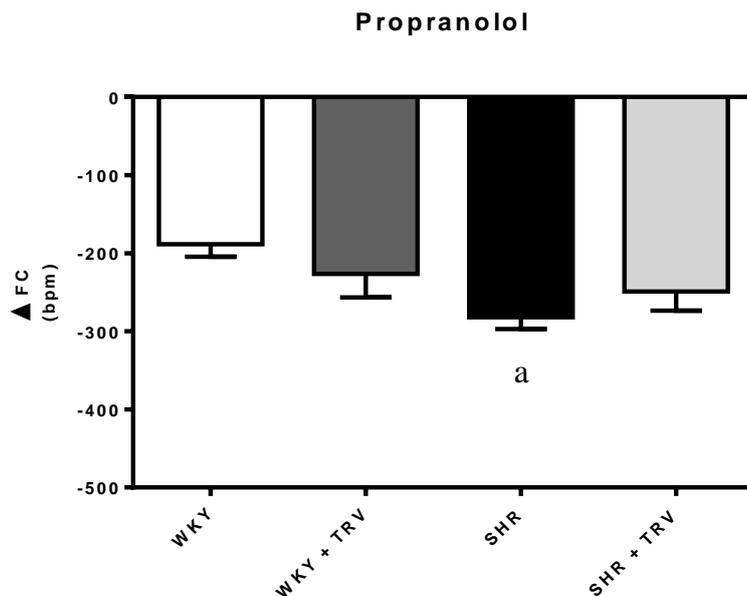
**Gráfico 3:** Frequência cardíaca basal dos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6) que foram tratados com TRV120027 (20 ng/h/dia) por 14 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m.

## 5.2. A administração intracerebroventricular de TRV120027 (20 ng/hora/dia) melhora a função autonômica em ratos SHR

Após a administração da atropina (2 mg/kg) observamos que o tônus vagal cardíaco estava reduzido nos animais SHR-C quando comparados aos animais WKY-C ( $\Delta FC$ :  $+54 \pm 3$  vs.  $+71 \pm 4$  bpm,  $p < 0,05$ ), ao passo que o tônus simpático cardíaco estava aumentado ( $\Delta FC$ :  $-282 \pm 15$  bpm vs.  $-188 \pm 16$  bpm, respectivamente,  $p < 0,05$ ). O tratamento com o TRV120027 durante 14 dias restaurou o tônus vagal nos animais SHR-C ( $+83 \pm 1$  vs.  $+54 \pm 3$  bpm,  $p < 0,05$ ), não houve diferença no tônus simpático cardíaco dos animais SHR tratados com o TRV120027 quando comparados ao grupo hipertenso controle ( $-249 \pm 24$  vs.  $-286 \pm 17$  bpm) (Gráficos 4 e 5).

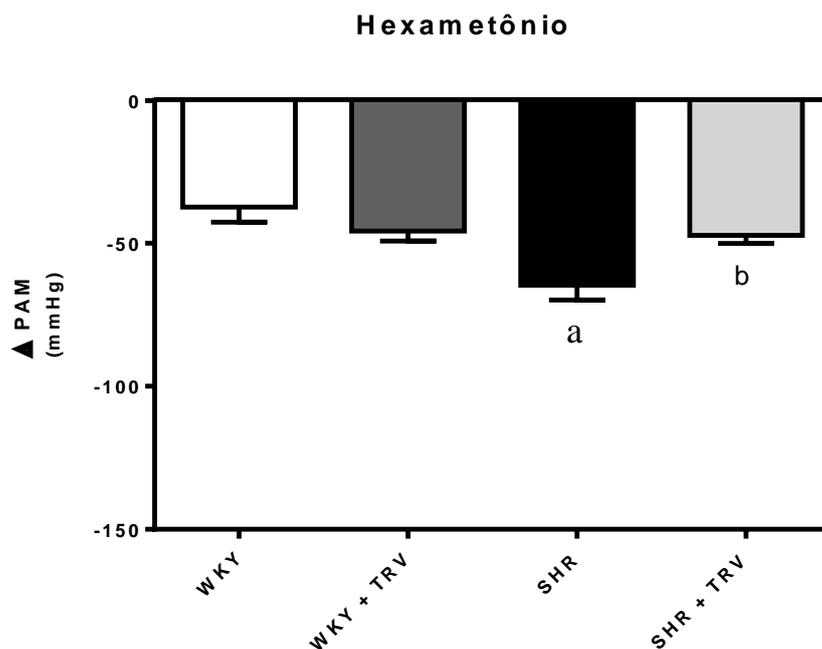


**Gráfico 4:** Variações na frequência cardíaca após administração intravenosa de atropina (2mg/kg) nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m.; a,  $p < 0,05$  vs. WKY-C; b,  $p < 0,05$  vs. SHR-C.



**Gráfico 5:** Variações na frequência cardíaca após administração intravenosa de propranolol (5mg/kg) nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6). Os resultados foram expressos como média ± e.p.m.; a,  $p < 0,05$  vs. WKY-C.

As variações na PAM promovidas pela administração do hexametônio (30 mg/kg) confirma o tônus vasomotor simpático aumentado nos animais SHR-C em relação aos ratos WKY-C ( $-64 \pm 5$  vs.  $-37 \pm 5$  mmHg,  $p < 0,05$ ). O tratamento com o TRV120027 foi capaz de reduzir o tônus vasomotor simpático aumentado na hipertensão SHR ( $-47 \pm 2$  mmHg), como pode ser visualizado no Gráfico 6.



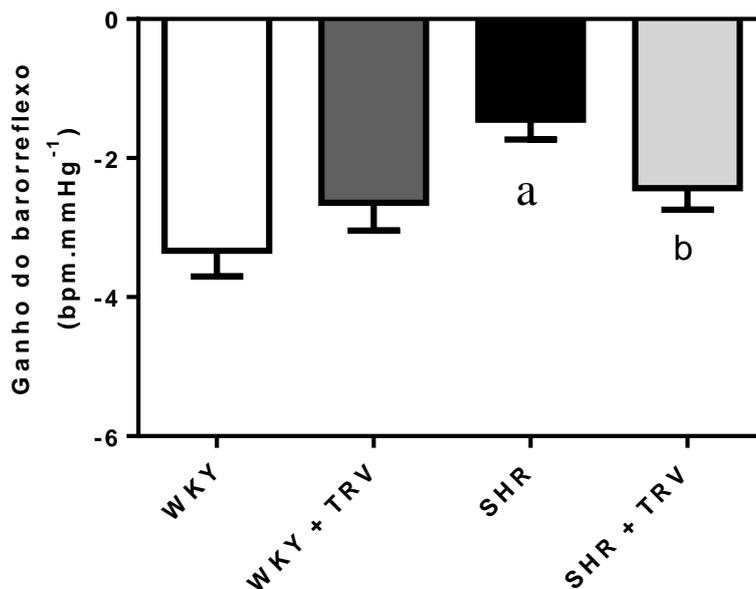
**Gráfico 6:** Variação da pressão arterial média ( $\Delta$  mmHg) após a administração intravenosa de hexametônio (30mg/kg) nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m.; a,  $p < 0,05$  vs. WKY-C; b,  $p < 0,05$  vs. SHR-C.

Não houve diferença no tônus simpático entre os animais WKY-C e WKY+TRV, ao contrário do tônus vagal cardíaco, o qual foi significativamente melhorado nos animais WKY tratados com o TRV120027 quando comparados ao grupo normotenso controle (WKY+TRV:  $+110 \pm 5$  vs. WKY-C:  $+71 \pm 4$  bpm,  $p < 0,05$ ), como pode ser visualizado no gráfico 4.

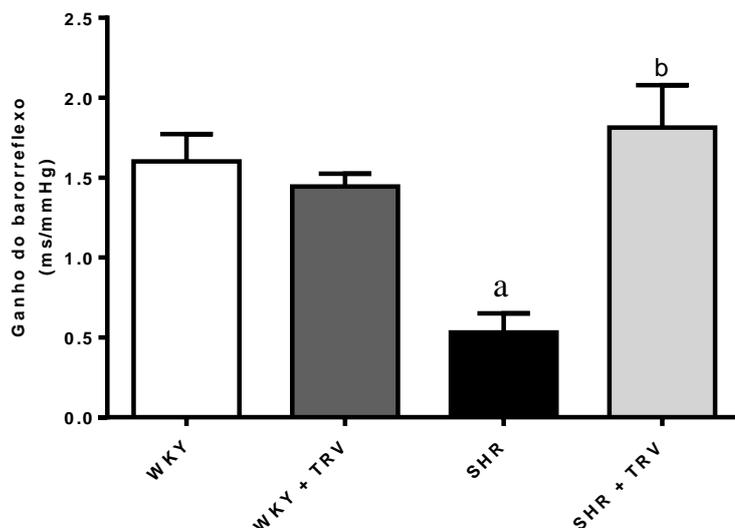
### **5.3. A administração intracerebroventricular do TRV120027 melhora o barorreflexo em ratos SHR**

Inicialmente, o barorreflexo dos animais foi avaliado pela injeção intravenosa de fenilefrina (FEN = 8 mg/kg) e nitroprussiato de sódio (NPS = 25 mg/kg). Os ratos SHR-C apresentaram diminuição na sensibilidade do barorreflexo de maneira significativa quando comparados aos ratos WKY-C ( $-1,4 \pm 0,2$  vs.  $-3,3 \pm 0,3$  bpm/mmHg, respectivamente,  $p < 0,05$ ). O grupo SHR+TRV ( $-2,4 \pm 0,3$  bpm/mmHg) também apresentou diferenças significativas na sensibilidade do barorreflexo quando comparados ao SHR-C, como mostrado no Gráfico 7.

Além disso, os animais SHR-C apresentaram redução na sensibilidade do barorreflexo espontâneo quando comparados ao grupo WKY-C ( $0,5 \pm 0,1$  vs.  $1,6 \pm 0,1$  ms/mmHg, respectivamente,  $p < 0,05$ ) e essa redução foi restaurada após o tratamento ICV com o TRV120027 ( $1,8 \pm 0,2$  ms/mmHg,  $p < 0,05$ ) (Gráfico 8).



**Gráfico 7:** Efeito do tratamento ICV com o TRV120027 (20 ng/h/dia) por 14 dias na sensibilidade do barorreflexo ativado farmacologicamente com injeção em *bolus* de FEN e NPS nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. a,  $p < 0,05$  vs. WKY-C.



**Gráfico 8:** Efeito do tratamento ICV com TRV120027 (20 ng/h/dia) por 14 dias na sensibilidade do barorreflexo espontâneo nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m.; a,  $p < 0,05$  vs. WKY-C; b,  $p < 0,05$  vs. SHR-C.

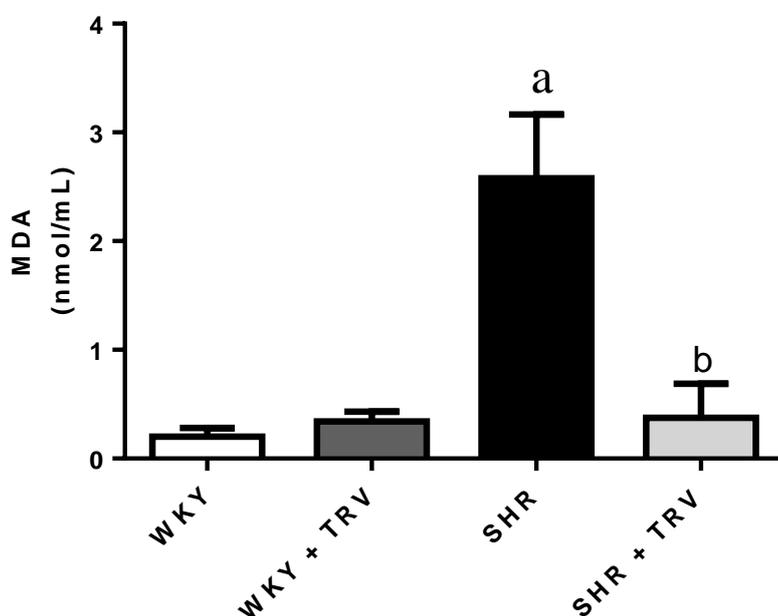
#### 5.4. A administração intracerebroventricular do TRV120027 reduz o estresse oxidativo em ratos SHR

A quantificação do MDA nos grupos de animais avaliados está demonstrada nas figuras abaixo. Como pode-se observar, houve um aumento na

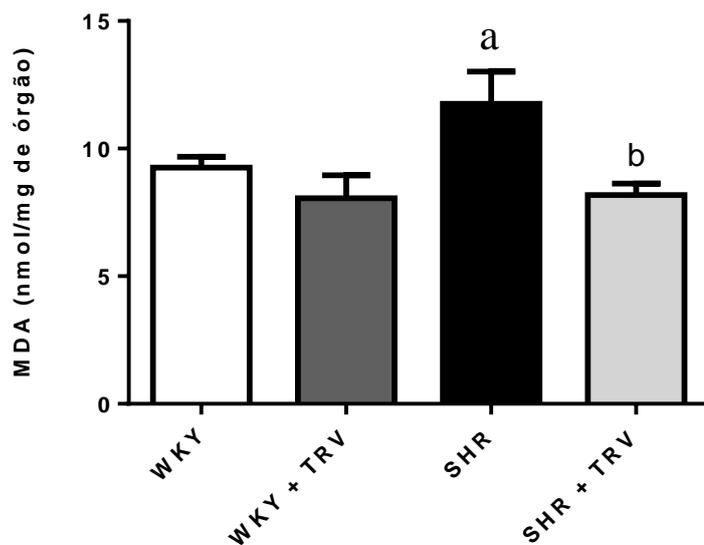
concentração de MDA em animais SHR-C em comparação com o grupo WKY-C, tanto no soro ( $2,58 \pm 0,58$  vs.  $0,20 \pm 0,08$  nmol/mL,  $p < 0,05$ ) (Gráfico 9) quanto nos rins ( $11,7 \pm 1,2$  vs.  $9,2 \pm 0,4$  nmol/mg,  $p < 0,05$ ) (Gráfico 10), o que confirma a elevação do estresse oxidativo na presença da hipertensão.

O tratamento ICV com o TRV120027 (20 ng/h/dia) durante 14 dias, reduziu significativamente os níveis séricos de MDA nos ratos SHR+TRV ( $0,37 \pm 0,31$  vs.  $2,58 \pm 0,58$  nmol/mL,  $p < 0,05$ ). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos WKY-C e WKY+TRV ( $0,02 \pm 0,08$  vs.  $0,34 \pm 0,08$  nmol/mL). Efeito semelhante foi observado para os níveis de MDA em tecido renal de animais SHR (SHR-C:  $11,7 \pm 0,05$  vs. SHR+TRV:  $8,18 \pm 0,45$  nmol/mg,  $p < 0,05$ ) e WKY (WKY-C:  $9,25 \pm 0,43$  vs. WKY+TRV:  $8,06 \pm 0,90$  nmol/mg)

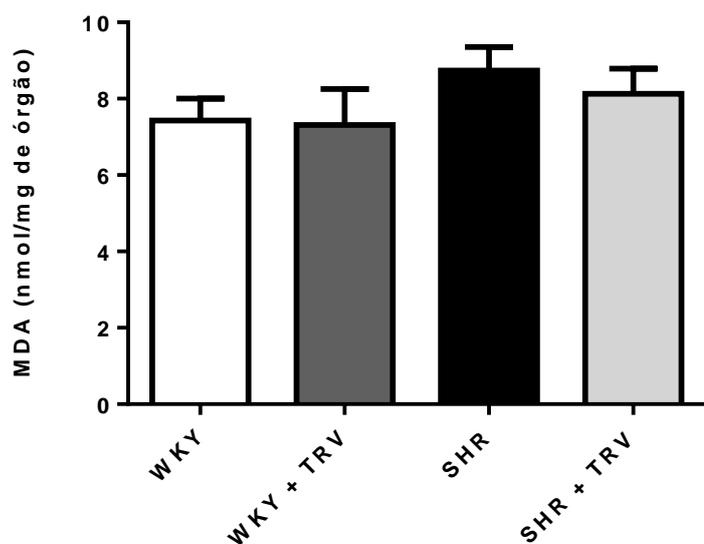
Não foram encontradas diferenças entre os níveis hepáticos de MDA no de ratos SHR-C e WKY-C ( $8,73 \pm 0,61$  vs.  $7,42 \pm 0,57$  nmol/mg, respectivamente). O tratamento com o TRV120027 também não promoveu alterações significativas nos níveis de MDA nos grupos SHR e WKY tratados ( $7,31 \pm 0,94$  e  $8,13 \pm 0,65$  nmol/mg, respectivamente), como pode ser visualizado no Gráfico 11.



**Gráfico 9:** Níveis séricos de MDA (nmol/mL de soro) nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m.; a,  $p < 0,05$  vs. WKY-C; b,  $p < 0,05$  vs. SHR-C.



**Gráfico 10:** Níveis renais de MDA (nmol/mg do órgão) nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m.; a,  $p < 0,05$  vs. WKY-C; b,  $p < 0,05$  vs. SHR-C.



**Gráfico 11:** Níveis hepáticos de MDA (nmol/mg do órgão) nos grupos WKY-C (n=9), WKY+TRV (n=9), SHR-C (n=9) e SHR+TRV (n=6). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m.

*Discussão*

## 6. DISCUSSÃO

Observamos nesse estudo que o tratamento ICV com TRV120027 (20 ng/hora/dia) durante 14 dias, foi capaz de reduzir a pressão arterial média, melhorar a função autonômica, melhorar a sensibilidade do barorreflexo e reduzir o estresse oxidativo sérico e renal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

O modelo de hipertensão utilizado foi desenvolvido por Okamoto e Aoki (1963) e apresenta características fenotípicas semelhantes às observadas na hipertensão primária humana (PINTO e cols., 1998). Nesse modelo, os níveis de pressão arterial começam a aumentar a partir da 5ª semana, apresentando níveis considerados de hipertensão espontânea entre a 7ª e a 15ª semana (YAMORI, 1984; MCGUIRE, TWEITMEYER, 1985). A elevação da atividade simpática precede a elevação da PA uma vez que a hipertensão pode ser prevenida por imunossimpatectomia (TRIPPODO; FROHLICH, 1981). Além da hiperatividade simpática (MCCARTY e cols., 1987; TUCKER; JOHNSON, 1984; YE e cols., 2013; LI e cols., 2015), ratos SHR também apresentam hiperativação do SRAA (PHILLIPS; KIMURA, 1988; NARUSE e cols., 1985; YONGUE e cols., 1991). Esses fatores embasaram a escolha desse modelo experimental para o nosso estudo.

Após a instalação da hipertensão, surgem outras complicações como disfunções cardíaca, renal e endotelial, acidentes vasculares, aterosclerose e outras. Por este motivo, utilizamos apenas animais com 12 semanas de idade, quando a hipertensão já estava presente, porém sem as complicações decorrentes do processo hipertensivo (PINTO e cols., 1998; FAZAN e cols., 2001; THOMAS, 1997).

Como esperado, os ratos SHR-C avaliados apresentaram níveis de PAM significativamente elevados quando comparados aos WKY-C. A frequência cardíaca por sua vez não foi diferente entre esses grupos, o que condiz com o estudo de Dickhout e Lee (1998), eles acompanharam as alterações de PA e FC em ratos SHR e WKY e observaram que nos animais SHR há uma taquicardia pré-hipertensiva e o aumento da FC é concomitante ao aumento da PA até a quarta semana de vida, a partir daí a PA continua aumentando ao passo que a FC começa a reduzir até se equiparar aos valores apresentados pelo grupo WKY. Corroborando com esses estudos, Smith (1979) já demonstrara que nos ratos

SHR, o débito cardíaco estava elevado na fase pré-hipertensiva voltando ao normal após o estabelecimento da hipertensão.

O nosso estudo foi o primeiro a avaliar o efeito do TRV120027 em ratos com hipertensão espontânea, o efeito anti-hipertensivo do composto foi restrito a este grupo, uma vez que não houve alterações nos níveis de PAM em ratos normotensos WKY. Nossos dados corroboram em parte com os de Violin e cols. (2010), os quais demonstraram que a administração intravenosa do TRV120027 reduziu a pressão arterial, porém em animais normotensos. Assim como os nossos dados, o TRV120027 também não alterou a FC desses animais. Convém relatar que além do modelo animal utilizado, a rota de administração empregada no nosso estudo foi diferente da empregada por Violin e cols. (2010), uma vez que administramos o composto no ventrículo lateral. Além disso, Violin e cols. (2010) usaram ratos Sprague-Dawley sob anestesia, essas diferenças entre linhagem e métodos empregados podem ser responsáveis pelas diferenças encontradas.

Violin e cols. (2010) compararam o TRV120027 com o telmisartana e losartana e viram que o primeiro composto, notavelmente específico para o AT<sub>1</sub>R, reduziu o local de ligação da Ang II ao passo que promoveu a ativação da  $\beta$ -arrestina e eNOS independente da ativação da proteína G acoplada a este GPCR. O ligante tendencioso estimulou a contratilidade dos cardiomiócitos e melhorou a performance cardíaca, o que não foi observado com os antagonistas do AT<sub>1</sub>R. A  $\beta$ -arrestina causa a dessensibilização e internalização dos receptores, e ativa vias de sinalização envolvendo MAPKs (MCDONALD, 2000). Por esse mecanismo os AT<sub>1</sub>Rs são sequestrados em endossomas e reciclados lentamente ou sofrem degradação (RANKOVIC e cols., 2016).

A dessensibilização de receptores depende classicamente de duas etapas sequenciais (BARKI-HARRINGTON, ROCKMAN, 2008; HEIZTLER e cols., 2012). A etapa inicial requer a fosforilação de resíduos de serina e treonina dos receptores pelas quinases de receptores acoplados a proteína G (G protein-coupled receptor kinases – GRKs), em especial pelas GRKs 2, 3, 5 e 6 que são amplamente expressas (ZHENG e cols., 2010). De maneira geral, a fosforilação pelas GRKs aumenta ainda mais a afinidade das  $\beta$ -arrestinas pelo receptor ativado, apesar de haver evidências advindas de receptores mutantes de que a fosforilação pelas GRKs pode ser desnecessária para o recrutamento das  $\beta$ -

arrestinas (HEITZLER e cols., 2012). Outro importante papel das  $\beta$ -arrestinas é a internalização ou endocitose dos GPCRs. As  $\beta$ -arrestinas funcionam como proteínas adaptadoras que associam os receptores à maquinaria de endocitose dependente de clatrina. As  $\beta$ -arrestinas se ligam à clatrina através da proteína adaptadora AP-2, que também está envolvida na iniciação da invaginação da membrana plasmática revestida de clatrina (BARKI-HARRINGTON, ROCKMAN, 2008; LUTTRELL, LEFKOWITZ, 2002). A endocitose da vesícula revestida de clatrina é dependente da dinamina que também se liga ao complexo da proteína adaptadora AP-2 (LUTTRELL, LEFKOWITZ, 2002). Uma vez internalizado, os GPCRs sofrem reciclagem para a membrana plasmática ou degradação.

As  $\beta$ -arrestinas também atuam como proteína de suporte (*scaffold protein*) para outras vias de sinalização funcionando como uma estrutura à qual outras proteínas de uma cascata de sinalização podem se ligar para aumentar a sua eficiência e/ou especificidade (HALL, LEFKOWITZ, 2002). Uma das sinalizações via  $\beta$ -arrestina mais estudada é a das MAPKs, ERK1/2. Entretanto, é importante observar que há uma diferença espaço-temporal entre as ERKs fosforiladas via  $\beta$ -arrestina e as ERKs fosforiladas por mecanismos dependentes de PKC (via proteína G), levando a ativação de fatores de transcrição de forma diferenciada. A fosforilação da ERK via proteína G é rápida e é translocada para o núcleo enquanto a fosforilação de ERK via  $\beta$ -arrestina é mais lenta e a kinase é retida no citosol (CERVANTES e cols., 2010). Recentemente foi proposto que as  $\beta$ -arrestinas além de impedir a formação de segundos mensageiros, podem atuar como proteína de suporte para fosfodiesterases e diacilglicerol kinases (DGKs) aumentando a eficiência da degradação de segundos mensageiros AMPc e diacilglicerol (DAG), respectivamente (BARKI-HARRINGTON, ROCKMAN, 2008; SHENOY, LEFKOWITZ, 2011). Esse leque de informações demonstra a potencialidade da  $\beta$ -arrestina em desencadear diversos efeitos intracelulares, o que inclui a melhoria no funcionamento do músculo cardíaco, como visto por Violin e cols. (2010).

Devido a isso e ao fato do TRV120027 ser capaz de ativar a  $\beta$ -arrestina ao se ligar no AT<sub>1</sub>R, pesquisadores vêm realizando estudos *in vivo* e *in vitro* sobre o TRV120027 na insuficiência cardíaca (IKEDA e cols., 2005; VIOLIN e cols., 2010; GREENBERG, 2016; BOERRIGTER e cols., 2011). Nós não avaliamos os efeitos do TRV120027 na contratilidade cardíaca uma vez que o nosso objetivo foi

entender o efeito central da ativação tendenciosa da  $\beta$ -arrestina na modulação autonômica da PA e FC, sensibilidade do barorreflexo e no estresse oxidativo periférico.

Após verificarmos o efeito do TRV120027 sobre a PA e FC, investigamos o efeito central deste composto na função autonômica dos animais. Observamos que nos animais SHR-C há um aumento no tônus simpático, tanto cardíaco como vascular, quando comparados aos animais WKY-C. Esses dados corroboram com a literatura, uma vez que é bem reconhecida a hiperatividade simpática nesse modelo de hipertensão (MCCARTY e cols., 1987; TUCKER; JOHNSON, 1984; YE e cols., 2013; LI e cols., 2015; LUNDIN; RICKSTEN; THORÉN, 1984). A elevação da atividade simpática foi associada à redução do tônus vagal nesses animais. O tratamento com o TRV120027 aumentou significativamente o tônus vagal enquanto reduziu modestamente o tônus vasomotor simpático, sugerindo que a ativação tendenciosa da  $\beta$ -arrestina acoplada a receptores  $AT_1$  centrais melhora a função autonômica na presença da hipertensão. Os dados sugerem ainda que o efeito anti-hipertensivo do TRV120027 está associado, pelo menos em parte, com o melhoramento da modulação autonômica cardiovascular.

Além da disfunção autonômica, vários estudos demonstraram um decréscimo na sensibilidade do barorreflexo em várias formas de hipertensão, inclusive no modelo SHR (HESSE e cols., 2007; XIE e cols., 2006; GUIMARÃES e cols., 2012; GRASSI e cols., 2006; 2014; KONRADY e cols., 2011). Vários estudos revelam que as ações induzidas pela Ang-II ao longo do eixo formado pelo órgão subfornical, núcleo paraventricular do hipotálamo e bulbo ventrolateral rostral (SFO-PVN-RVLM) são responsáveis pela hiperatividade simpática e redução na sensibilidade do barorreflexo em ratos SHR, e este efeito ocorre, pelo menos em parte, devido a geração de EROs dependente da ativação da proteína  $G_{q/11}$  acoplada ao  $AT_1R$ , como explicitado na secção 1.Introdução (Figura 2) (NISHIHARA e cols., 2012, XIE e cols., 2006; ITO e cols., 2002; ZIMMERMAN e cols., 2002; 2004; LASSÈGUE; GRIENGLING, 2004; BRAGA e cols., 2011).

A ativação da NAPH oxidase pela Ang-II, mediante ativação da Proteína  $G_{q/11}$  promove a conversão parcial do oxigênio molecular em EROs e essas espécies são importantes mensageiros secundários para o desenvolvimento de doenças de origem central como a hipertensão arterial, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (OLANOW, 1990; NUNOMURA e cols., 2001; ZIMMERMAN

e cols., 2002). Quando o equilíbrio entre moléculas oxidantes e anti-oxidantes é perdido, o estresse oxidativo, principalmente o  $O_2^-$  causa danos sérios no SNC, provenientes de mudanças nos canais iônicos de grande importância ( $Ca^{2+}$  e  $K^+$ ), que levam a alteração do perfil de disparo neuronal induzindo descontrolo nas funções neurais (HIROOKA, 2008; YAN; WANG; ZHU, 2013; HURR e YOUNG, 2015). Essas ações em áreas de modulação autonômica simpática como o PVN e o RVLM estão relacionadas ao aumento da descarga simpática e danos periféricos a nível de vasos sanguíneos e outros órgãos alvos da hipertensão como os rins (WU e cols., 2012).

Corroborando com os dados da literatura, observamos uma redução na sensibilidade do barorreflexo no grupo SHR-C quando comparados ao WKY-C, a infusão ICV do TRV120027 foi capaz de melhorá-la. Respostas similares foram encontradas em outros estudos após infusão ICV de antagonistas não tendenciosos do  $AT_1R$  (KAWANO e cols., 1994; KOHARA e cols., 1993). Apesar de não termos avaliado o estresse oxidativo central, nós podemos formular a hipótese de que o agonista tendencioso TRV120027, por antagonizar a via dependente da proteína G acoplada ao  $AT_1R$  (VIOLIN e cols., 2010) nos órgãos circunventriculares, próximos ao seu local de infusão, reduz o estresse oxidativo no eixo SFO-PVN-RVLM e restaura a sensibilidade do barorreflexo nesses animais.

Estudos do nosso e outros grupos de pesquisa revelaram um aumento no estresse oxidativo periférico em ratos SHR (MONTEIRO e cols., 2012; ALVES e cols., 2015; GUIMARÃES e cols., 2012; PINO-GARCIA e cols., 2017). Acredita-se que o próprio processo hipertensivo contribui para o aumento de EROs na periferia, sendo este causa e consequência da hipertensão (TOUYZ; BRIONES, 2011). Nesse sentido, fomos investigar o nível de peroxidação lipídica no soro, rins e fígado dos animais e o efeito do TRV120027 sobre este parâmetro.

Por meio do teste de peroxidação lipídica com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), observamos que o estresse oxidativo estava aumentado em animais SHR-C quando comparado aos animais WKY-C, tanto no soro como em tecido renal. Nossos dados corroboram com relatos anteriores, Guimarães e cols. (2012) demonstrou, utilizando a mesma técnica, que em animais SHR o estresse oxidativo no soro está aumentado, sendo reduzido após tratamento com antioxidantes administrados intravenosamente. Alves e cols. (2015) também

demonstraram uma diminuição de EROs no soro de animais SHR tratados com o óleo de coco via oral e exercícios físicos. Monteiro e cols. (2012) demonstraram que a quercetina via oral reduziu o estresse oxidativo nos rins de ratos SHR e melhorou a sensibilidade do barorreflexo nesses animais.

No presente estudo observamos que o tratamento com o TRV120027 foi capaz de diminuir os níveis de peroxidação lipídica no soro dos ratos SHR. Além disso, houve uma diminuição do estresse oxidativo em tecido renal nos animais SHR+TRV. Esses dados sugerem que o TRV120027 agindo centralmente contribui para a redução do estresse oxidativo periférico. Entretanto, se há algum vazamento do TRV120027 para a corrente sanguínea ou se esses efeitos são dependentes exclusivamente da ação central desse agonista tendencioso, ainda permanece por ser elucidado. Nós acreditamos que, devido à similaridade estrutural entre o TRV120027 e a Ang II como também ao pequeno volume infundido por tempo, o composto não atravessa a barreira hematoencefálica e seus efeitos são restritos às regiões próximas ao sítio de injeção. Boerrigter e cols. (2011) e Violin e cols. (2010) demonstraram que o TRV120027 tem uma meia-vida muito curta (menos de 2 minutos), o que fortalece ainda mais a nossa hipótese.

Não observamos diferenças significativas nos níveis hepáticos de MDA entre os grupos avaliados. A redução do estresse oxidativo no soro e rins dos animais SHR tratados com o TRV120027 provavelmente está relacionada à redução da pressão arterial observada nesse grupo de animais.

*Conclusão*

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o TRV120027, administrado centralmente, é capaz de reduzir os níveis de pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos e este efeito está relacionado à melhora na função autonômica e na sensibilidade do barorreflexo bem como à redução do estresse oxidativo periférico presente nesses animais.

Os dados confirmam a estreita relação entre as ações desempenhadas pelo AT<sub>1</sub>R em áreas centrais e a hipertensão arterial ao passo que ampliam nosso conhecimento sobre os efeitos benéficos que podem ser desencadeados pela ativação destes receptores de maneira “tendenciosa”.

*Referências*

## 8. REFERÊNCIAS

ACCORSI-MENDONÇA, D.; ALMADO, C. E. L.; FERNANDES, L. G.; MACHADO, B. H. Controle neural da circulação e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 12, n. 4, p. 235-41, 2005.

AHN, S; SHENOY, S. K.; WEI, H., and LEFKOWITZ, R. J. (2004) Differential kinetic and spatial patterns of  $\beta$ -arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. **J Biol Chem** 279:35518–35525, 2004.

AHN, S.; KIM, J., HARA, M. R., REN, X. R., LEFKOWITZ, R. J.  $\beta$ -Arrestin-2 mediates anti-apoptotic signaling through regulation of BAD phosphorylation. **J Biol Chem** 284:8855–8865; 2009.

ALVES, N. F. B. e cols. Coconut oil supplementation and physical exercise improves Baroreflex sensitivity and oxidative stress in hypertensive rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab**, v. 400, p.393–400, 2015.

AVERILL, D. B.; DIZ, D. I. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Res Bull*, v. 51(2), 119 - 128, 2000.

BARKI-HARRINGTON, L. and ROCKMAN, H.A. Beta-arrestins: multifunctional cellular mediators. **Physiology (Bethesda)** 23: 17-22, 2008.

BARNES, W. G.; REITER, E.; VIOLIN, J. D.; REN, X. R.; MILLIGAN, G., LEFKOWITZ, R. J.  $\beta$ -Arrestin 1 and G<sub>q</sub>/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. **J Biol Chem** 280:8041–8050; 2005.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8(13), p.328-338, 2001.

BOERRIGTER, G. e cols. 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. **Circ Heart Fail** 4: 770-8; 2011.

BOERRIGTER,G.; SOERGEL, D.G.; VIOLIN, J.D.; LARK, M.W.; BURNETT, J.C. 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. **Circ. Heart Fail.** 5: 627-634, 2012.

BRAGA, V. A. e cols. Cardiovascular responses to peripheral chemoreflex activation and comparison of different methods to evaluate baroreflex gain in conscious mice using telemetry. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, v. 295, p. R1168–R1174, 2008

BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A.; RIBEIRO, T. P.; FRANÇA-SILVA, M. S.; BOTELHO-ONO, M. S.; GUIMARÃES, D. D. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic

hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research on line**, v. 44, p. 871-876, 2011.

BRISTOW, J.D; HONOUR, A.J; PICKERING, G.W.; SLEIGHT, P.; SMYTH, H.S. Diminished Baroreflex Sensitivity in High Blood Pressure. **Circulation**, v. 39,p.48-54, 1969.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial; Cardiovascular reflexes and arterial hypertension. **Rev. bras. hipertens**, v. 8, n. 1, p. 30–40, mar. 2001.

CAMPOS, R.R. Oxidative stress in the brain and arterial hypertension. **Hypertension Research**, 32, p.1047-1048; 2009.

CAMPOS, R.R., OLIVEIRA-SALES, E. B., NISH, E.M., BOIM, M.A., DOLNIKOFF, M. S., BERGAMASCHI, C. S. The role of oxidative stress in renovascular hypertension special series: stress and hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 38, p.144–152; 2011.

CAVALCANTI, C.O. Avaliação Pré-Clínica do Efeito do Citrato de Sildenafil sobre o Controle Central da Pressão Arterial na Hipertensão. **Dissertação**. P. 1-86, 2016.

CERVANTES, D.; CROSBY, C. and XIANG, Y. Arrestin orchestrates crosstalk between G protein-coupled receptors to modulate the spatiotemporal activation of ERK MAPK. **Circ Res** 106(1): 79-88, 2010.

CHENG, W. H.; LU, P.J.; H.O., W.Y.; TUNG, C.S.; CHENG, P.W.; HSIAO, M.; TSENG, C.J.. Angiotensin II inhibits neuronal nitric oxide synthase activation through the ERK1/2-RSK signaling pathway to modulate central control of blood pressure. **Circ Res.**, v. 106(4), p. 788-95, 2010.

CHIUVE, S.E.; COOK, N.R.; SHAY, C.M.; REXRODE, K.M.; ALBERT, C.M., MANSON, J.E.; WILLET, W.C.; RIMM, E.B. **Lifestyle-based prediction model for the prevention of CVD: the Healthy Heart Score**. **J Am Heart Assoc**. 3(6); 2014.

COBLE, J. P.; GROBE, J. L.; JOHNSON, A. K.; SIGMUND, C. D. Mechanisms of brain renin angiotensin system-induced drinking and blood pressure: importance of the subfornical organ. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 308: R238–R249, 2015.

CORRÊA e cols. Alterações Autonômicas na Insuficiência Cardíaca: benefícios do exercício físico. **Rev. SOCERJ**.21(2):106-111, 2008.

COWLEY, A.W. The genetic dissection of essential hypertension. **Nature Reviews Genetics**. Seven (11):829-840, 2006.

DAMPNEY, R.A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological reviews**, 74(2), p.323-364; 1994.

DAMPNEY, R.A.L., COLEMAN, M.J., FONTES, M.A., HIROOKA, Y.; HORIUCHI, J, LI, Y.W., POLSON, J.W., POTTS, P.D., TAGAWA, T. Central mechanisms underlying short- and longterm regulation of the cardiovascular system. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 29, p. 261-268, 2002.

DEWIRE, S.M., KIM, J., WHALEN, E.J., AHN, S., CHEN, M., LEFKOWITZ, R.J.  $\beta$ -Arrestin mediated signaling regulates protein synthesis. **J Biol Chem** 83:10611–10620; 2008.

DEWIRE, S.M.; VIOLIN, J.D. Biased Ligands for Better Cardiovascular Drugs Dissecting G-Protein-Coupled Receptor Pharmacology. **Circ Res.** 109:205-216, 2011.

DICKHOUT, J. G.; LEE, R.M. K. W. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.** v. 274 n. 3, H794-H800; 1998.

ERDOS, B., BROXSON, C.S., KING, M.A., SCARPACE, P.J., TÜMER, N. Acute pressor effect of central angiotensin II is mediated by NAD(P)H-oxidase-dependent production of superoxide in the hypothalamic cardiovascular regulatory nuclei. **J Hypertens.** 24(1):109-16, 2006.

FAZAN, Jr. R., SILVA, V.J.D., SALGADO H.C. Modelos de hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens** v 8(1);2001.

GALVÃO, A.C. A inibição do TNF- $\alpha$  reduz a pressão arterial via inibição do tônus simpático em ratos com hipertensão renovascular. Dissertação. **UFPB.** p.91,2016.

GESTY-PALMER, D., CHEN, M., REITER, E., AHN, S., NELSON, C.D., WANG, S., ECHARDT, A.E., COWAN, C.L., SPURNEY, R.F., LUTTRELL, L.M., e cols. Distinct  $\beta$ -arrestin- and G protein dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. **J Biol Chem** 281:10856–10864;2006.

GOODFRIEND, T.L., ELLIOT, M.E., CATT, K.J. Angiotensin receptors and their antagonists. **N Engl J Med.** 334:1649-54; 1996.

GRASSI, G. e cols. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. **Hypertension**, v. 31, p. 68–72, 1998.

GRASSI, G.; TREVANO, F. Q.; SERAVALLE, G.; SCOPELLITI, F.; MANCIA, G. Baroreflex Function in Hypertension: Consequences for Antihypertensive Therapy Progress in Cardiovascular Diseases. v. 48, n. 6, p. 407-41, 2006.

GRASSI, G.; SERAVALLE, G., BRAMBILLA, G.; PINI, C.; ALIMENTO, M.; FACCHETTI, R., SPAZIANI, D.; CUSPIDI, C.; MANCIA, G. Marked sympathetic activation and baroreflex dysfunction in true resistant hypertension. **Int J Cardiol.** 177(3):1020-5, 2014.

GREENBERG, B., BUTLER, J., FELKER, G.M., PONIKOWSKI, P., VOORS, A.A., DESAI, A.S., e cols. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): A randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. **Lancet**; 387: 1178 – 1186; 2016.

GREENBERG, B. Novel Therapies for Heart Failure – Where Do They Stand?- Official Journal of the Japanese Circulation Society.80: 1882-1891, 2016.

GRIENDLING, K.K., MINIERI, C.A., OLLERENSHAW, J.D., ALEXANDER, R.W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res.**, 1994.

GUIMARÃES, D. D; CARVALHO, C. C; BRAGA, V. A. Scavenging of NADPH oxidase-derived superoxide anions improves depressed baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.39, p. 373–378, 2012.

GUTTERIDGE, J. M. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. **FEBS letters**, v. 128, n. 2, p. 343–346, 15 jun. 1981.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci** 2006; 7: 335-346.

GUYTON, A. C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 11ª ed. Rio de Janeiro, **Elsevier Ed.**, 2006.

GUYTON, A.C., COLEMAN, T.G., COWLEY, A.V., SCHEEL, K.W., MANNING, R.D., NORMAN R.A. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. **Am J Med.** 52(5):584-94, 1972.

HALL, R. A. and LEFKOWITZ, R. J. Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. **Circ Res** 91(8): 672-680, 2002.

HEITZLER, D.; DURAND, G.; GALLAY, N.; RIZK, A.; AHN, S.; KIM, J.; VIOLIN, J. D.; DUPUY, L.; GAUTHIER, C.; PIKETTY, V.; CREPIEUX, P.; POUPON, A.; CLEMENT, F.; FAGES, F.; LEFKOWITZ, R. J. and REITER, E. Competing G protein-coupled receptor kinases balance G protein and beta-arrestin signaling. **Molecular systems biology** 8: 590, 2012.

HESSE, C.; CHARKOUDIAN, N.; LIU, Z.; JOYNER, M. J., EISENACH, J. H. Baroreflex sensitivity inversely correlates with ambulatory blood pressure in healthy normotensive humans. **Hypertension.** 50:41, 2007.

HIROOKA, Y. Role of reactive oxygen species in brainstem in neural mechanisms of hypertension. **Autonomic Neuroscience**, 142 (1-2), p. 20-24, 2008.

HOLLOWAY, E. T.; BOHR, D. F. Reactivity of Vascular Smooth Muscle in Hypertensive Rats. **Circulation Research**, Vol. XXXIII, December 1973

HUYNH, Q. L. e cols. Prediction of Cardiovascular and All-Cause Mortality at 10 Years in the Hypertensive Aged Population. **American journal of hypertension**, v. 14, 2014.

IKEDA e cols. Biased Agonism of the Angiotensin II Type I Receptor. A Potential Strategy for the Treatment of Acute Heart Failure. **Int Heart J**. 56: 485-488, 2015.

IRIGOYEN, M. C. e cols. Controle cardiovascular: regulação reflexa do sistema nervoso simpático. **Rev Brás Hipertens**, v. 8, p. 55-62, 2001.

ITO, S.; KOMATSU, K.; TSUKAMOTO, K.; KANMATSUSE, K.; SVED, A. F. Ventrolateral medulla AT1 receptors support blood pressure in hypertensive rats. **Hypertension** 40: 552-559, 2002.

KAWAI, T.; FORRESTER, S. J.; O'BRIEN, S.; BAGGETT, A.; RIZZO, V.; EGUCHI, S. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system **Pharmacological Research** 4–13, 2017.

KAWANO, Y.; YOSHIDA, K.; MATSUOKA, H.; OMAE, T. Chronic effects of central and systemic administration of losartan on blood pressure and baroreceptor reflex in spontaneously hypertensive rats, **Am. J.. Hypertens.** 536–542, 1994.

KEARNEY, P. M.e cols. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, n. 9455, p. 217–223, 2005.

KENAKIN, T.P. 7TM receptor allostery: putting numbers to shapeshifting proteins. **Trends Pharmacol Sci** 30:460–469; 2009.

KIM, K; ABRAHAM, D.; WILLIAMS, B.; VIOLIN, J.D.; MAO,L.; ROCKMAN, H.A.  $\beta$ -arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury. **Am. J. Physiol Heart Circ.** Physiol 303: H1001-H1010, 2012.

KOBORI, H.; NANGAKU, M. N. L. G.; NISHIYAMA, A. The intra-renal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacol Rev**, v. 59, n. 3, p. 251-87, 2007.

KOHARA, K.; MIKAMI, H.; OKUDA, N.; OGIHARA, T. Peripheral vs. Central blockade of the renin–angiotensin system in spontaneously hypertensive rats: comparison of novel AT receptor antagonist TCV-1161 with angiotensin converting enzyme inhibitor delapril, **Hypertens. Res.** 239–246, 1993.

KONRADY, A.; BAGROV, A.; SHLYAKHTO, E.; EMELYANO, I. Baroreflex sensitivity in patients with resistant hypertension: Spironolactone. **Abstracts / Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical** 163, 1–133. p.013, 2011.

KRIEGER, E.M. Neurogenic hypertension in the rat. **Circulation Research**, v.15, p. 511-521, 1964.

LASSÈGUE, B.; GRIENGLING, K. K. Reactive oxygen species in hypertension: An update. **Am J Hypertens.** 17: 852–860, 2004.

LASSÈGUE, B.; SAN MARTIN, A., GRIENGLING, K.K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circ Res.**, 110(10):1364-90, 2012.

LESSA, I. Os programas nacionais de educação e controle para DCNT, pp. 241-250. In I Lessa (org.). Adulto brasileiro e as doenças da modernidade. Epidemiologia das doenças crônicas não-transmissíveis no Brasil. **Hucitec - Abrasco**, São Paulo – Rio de Janeiro.p.29-42, 1998.

LI, P.; GONG, J. X.; SUN, W.; ZHOU, B.; KONG, X. Q. Hexamethonium attenuates sympathetic activity and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Molecular Medicine Reports** 17(11): 7116-7122, 2015.

LIND, R.W., VAN HOESEN, G.W., JOHNSON, A.K., AN, H.R.P. study of the connections of the subfornical organ of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 210, p.265-277; 1982.

LUNDIN, S.; RICKSTEN, S.E.; THORÉN P. Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. **Acta Physiol Scand** 120: 265- 272, 1984.

LUTTRELL, L. M. and LEFKOWITZ, R. J. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. **Journal of cell Science** 115(Pt 3): 455-465, 2002.

MACHADO, R. D.; SANTOS, R. A.; ANDRADE, S. P. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. **Life Sci.** 66(1):67-76, 2000.

MAILMAN, R.B. GPCR functional selectivity has therapeutic impact. **Trends Pharmacol Sci** 28:390–396; 2007.

MANCIA, G. e cols. ES/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **J Hypertens.** v. 31, p. 1281-357, 2013.

MAUDSLEY, S. e cols. Functional signaling biases in G protein-coupled receptors: Game Theory and receptor dynamics. Mini reviews in medicinal chemistry 12(9): 831-40, 2012.

MAUDSLEY, S. e cols. The Origins of Diversity and Specificity in G Protein-Coupled Receptor Signaling. 314(2): 485- 494, 2005.

McARDLE, W.D., KATCH, F.I., KATCH, V.L. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano.** 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003.

MCCARTY, R.; KIRBY, R. F., CIERPIAL, M. A., JENAL, T. J. Accelerated development of cardiac sympathetic responses in spontaneously hypertensive (SHR) rats. **Behav Neural Biol** 48, 321–333, 1987.

MCDONALD, P. H. Beta – arrestin 2: A receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. **Science** 290(5496): 1574-1577, 2000.

McGUIRE, P. G., TWEITMEYER, T. A. Aortic endothelial functions in developing hypertension. **Hypertension**. 7: 483-490; 1985.

MEHTA, P.K., GRIENGLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **Am J Physiol Cell Physiol**. 292(1):C82-97, 2007.

MENDES-JUNIOR, L. G. e cols Oral supplementation with the rutin improves cardiovascular baroreflex sensitivity and vascular reactivity in hypertensive rats. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**. v.38, n.11, p.1099-106, 2013

MONASKY, M.M.; TAGLIERI, D.M; HENZE,M; WARREN, C.M. UTTER, M.S.; SOERGEL, D.G., VIOLIN, J.D., SOLARO, R.J. The  $\beta$ -arrestin-biased ligand TRV120023 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy while preserving enhanced myofilament response to calcium. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 305: H856–H866, 2013.

MONTEIRO, M. M. e cols. Quercetin improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Molecules**. v.17, n.11, p.12997-3008, 2012.

NAKASHIMA, H.; SUZUKI, H.; OHTSU, H.; CHAO, J. Y.; UTSUNOMIYA, H.; FRANK, G. D. and EGUCHI, S. Angiotensin II Regulates Vascular and Endothelial Dysfunction: Recent Topics of Angiotensin II Type-1 Receptor Signaling in the Vasculature. **Current Vascular Pharmacology**, 4, 67-78, 2006.

NARUSE, M.; NARUSE, K.; MCKENZIE, J. C.; SCHELLING, P.; INAGAMI, T. Regional distribution of renin and angiotensinogen in the brain of normotensive (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats. **Brain Res**. 333, 147-150, 1985.

NISHIHARA, M. e cols. Different role of oxidative stress in paraventricular nucleus and rostral ventrolateral medulla in cardiovascular regulation in awake spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v.30, p.1758–1765, 2012.

NOOR, N.; PATEL, C. B.; ROCKMAN, H. A. Beta-arrestin: A signaling molecule and potential therapeutic target for heart failure. **J Mol Cell Cardiol**. 51(4):534-41, 2010.

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**, 12(4), p.440-445; 2011.

NUNOMURA, A.; PERRY, G.; ALIEV, G.; HIRAI, K.; TAKEDA, A.; BALRAJ, E. K.; CHIBA, S. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, 60(8), 759-767, 2001.

OATES, J.A. Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. In: HARDMAN, J.G.; GILMAN, A.G.; LIMBRIND, L.E., GOODMAN & GILMAN'S. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9ed. USA: McGraw-Hill, v.33, p. 781, 1996.

OKAMOTO, K, AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jap Circ J** 27: 282-93, 1963.

OLANOW, C. W. Oxidation reactions in Parkinson's disease. **Neurology**, 40(10 Suppl 3), suppl-32, 1990.

OPARIL, S., DYKE, S., HARRIS, F., e cols. The efficacy an safety of valsartan compared with placebo in the treatment of patients with essential hypertension. **Clin Ther**. 18(5):797-810; 1996.

OPARIL, S; SILFANI, T.N.; WALKER, J.F. Role of Angiotensin Receptor Blockers as Monotherapy in Reaching Blood Pressure Goals. **AJH**, v. 18, p. 287–294, 2005.

PAXINOS, G., WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed. **Academic Press**, San Diego; 1996.

PINO-GARCIA, R.; RIVERO-PÉREZ, M. D.; GONZÁLEZ- SAN JOSÉ, M, L.; CROFT, K. D.; MUNIZ, P. Antihypertensive and antioxidant effects of supplementation with red wine pomace in spontaneously hypertensive rats. **Food Funct**. 19;8(7):2444-2454, 2017.

PINTO, Y. M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovascular Research**, v.39, n.1, p. 77-88, jul.1998.

PHILLIPS, M. I. and KIMURA, B.; Brain angiotensin in the developing spontaneously hypertensive rat, **J. Hypertension**, 6(8) 607-612, 1988.

PHILLIPS, M.I.; SUMMERS, C. Angiotensin II in Central Nervous System Physiology. **Regul Pept** 78: 1-11, 1998.

QUEIROZ, T.M.; XIA, H.; FILIPEANU, C. N.M ;BRAGA, V.A.; LAZARTIGUES, E.  $\alpha$ -LIPOIC ACID REDUCES NEUROGENIC HYPERTENSION BY BLUNTING OXIDATIVE STRESS-MEDIATED INCREASE IN ADAM17. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 309; 2015.

RABINOVITCH, A. e cols. The Baroreflex Mechanism Revisited. **Bull Math Biol.**, v. 22, 2015.

RANKOVIC, Z.; BRUST, T. F.; BOHN, L. M. Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 26, 241-250, 2016.

REITER, E, LEFKOWITZ, R.J. GRKs and  $\beta$ -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. **Trends Endocrinol Metab** 17:159–165; 2006.

ROMERO, C. A. e cols. Novel RAAS agonists and antagonists: clinical Applications and controversies **Nat. Rev. Endocrinol.** 11, 242–252; 2015.

SAAVEDRA, J. M., Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 25, p.485-512; 2005.

SADJATI, J., PUTTAPARTHI. K., WELBORN, M. B., ROGERS, T. E., MOE, O., CLAGETT, G. P., Upregulation of autocrine/paracrine renin-angiotensin systems in chronic renovascular hypertension. **Journal of Vascular Surgery**, 36, p.386–392; 2002.

SAKAI, K., AGASSANDIAN, K., MORIMOTO, S., SINNAYAH, P., CASSELL, M.D., DAVISSON, R.L., Local production of angiotensin II in the subfornical organ causes elevated drinking. **Journal of Clinical Investigation**, 117, p.1088-1095; 2007.

SALGADO, M. C. e cols. Role of nitric oxide and prostanoids in attenuation of rapid baroreceptor resetting. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.290, p.1059–1063, 2009.

SANTOS, R. A. S. e cols. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. **J.Endocrinol.** v.216, R1–R17, 2013

SANTOS, G.A.; DUARTE, D.A. e cols. Comparative Analyses of downstream signal transduction targets modulated after activation of the AT1 receptor by two  $\beta$ -arrestin-biased agonists. **Frontiers in Pharmacology**.v.6.131-140, 2015.

SARGANAS, G.; NEUHAUSER, H. K. The persisting gender gap in hypertension management and control in Germany: 1998 and 2008-2011. **Hypertens Res.**, v. 28, 2016.

SAXENA, P. R. Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 19(Suppl 6), S80 - S88, 1992.

SCHMID, C. L.; BOHN, L. M. Physiological and pharmacological implications of  $\beta$ -arrestin regulation. **Pharmacol Ther** 121:285–293; 2009.

SHENOY S. K. and LEFKOWITZ, R. J. Beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. **Trends Pharmacol Sci** 32(9): 521-533, 2011.

SILVA, J. L. L. Considerações sobre a classificação da pressão arterial: implicações nas ações de enfermagem. **Informe-se em promoção da saúde**, n.4.p.01-03.jul-dez. 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq Bras. Cardiol.**, v.107,n.3,supl.3, p.1-83, 2016.

SOERGEL, D. G., SUBACH, R. A., COWAN, C. L., VIOLIN, J. D., LARK, M.W. First clinical experience with TRV120027: Pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. **J Clin Pharmacol.** 53: 892 – 899; 2013.

SOWERS, J. R. Insulin resistance and hypertension. **Am J Physiol.** 286: H1597-H602, 2004.

SMITH, T. L. Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat. **Hypertension.** 1:508-517; 1979.

STRACHAN e cols. Divergent Transducer-specific Molecular Efficacies Generate Biased Agonism at a G Protein-coupled receptor (GPCR). **The Journal of Biological Chemistry** v. 289, n. 20, p. 14211–14224, May 16, 2014.

THOMAS, C.J.; RANKIN, A.J.; HEAD, G.A.; WOODS, R.L. ANP enhances bradycardic reflexes in normotensive but not spontaneously hypertensive rats. **Hypertension** 5: 1126-32, 1997.

TILLEY, D. G. G protein-dependent and –independent signaling pathways and their impact on cardiac function. **Circ Res.** 109(2): 217–230, 2011.

TIMMERMANS, P.B.; CARINI, D.J., CHIU, A.T.; DUNCIA, J.V., PRICE, W.A. Jr, WELLS, G.J., WONG, P.C., JOHNSON, A.L., WEXLER, R.R. The discovery of a new class of highly specific nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. **American Journal of Hypertension** 4:275S-281S; 1991.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertens Res.** 34(1):5-14, 2011.

TRIPPODO, N.C., FROHLICH, E.D. Similarities of Genetic (Spontaneous) Hypertension. **Circ Res** 48: 309-19, 1981.

TUCKER, D. C., JOHNSON, A. K. Development of autonomic control of heart rate in genetically hypertensive and normotensive rats. **Am. J. Physiol.** 246, R570–R577, 1984.

VAZIRI, N.D. Causal link between oxidative stress, inflammation and hypertension. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v.2, n.1, p.1-10, jan. 2008.

VENKATAKRISHNAN, A.J. e cols. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. **Nature** 494(7436): 185-94, 2013.

VIOLIN, J.D., DEWIRE, S.M., BARNES, W.G., LEFKOWITZ, R.J. G protein-coupled receptor kinase and  $\beta$ -arrestin-mediated desensitization of the angiotensin II type 1A receptor elucidated by diacylglycerol dynamics. **J Biol Chem** 281:36411–36419; 2006.

VIOLIN, J.D.; LEFKOWITZ, R.J.  $\beta$ -Arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. **Trends Pharmacol. Sci.** 28: 416–422; 2007.

VIOLIN, J.D. e cols. Selectively Engaging  $\beta$ -Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.**, v.335. n.3; 2010.

VIOLIN, J.D. e cols. GPCR biased ligands as novel heart failure therapeutics. **Trends Cardiovasc. Med.** 23: 242–249; 2013.

VIOLIN, J.D., CROMBIE, A.L., SOERGEL, D.G., LARK, M.W. Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. **Trends Pharmacol.Sci.** 35,308–316; 2014.

VIOLIN, J.D.; SOERGEL, D.G.; LARK, M.W. Beta-arrestin-biased ligands at the AT1R: a novel approach to the treatment of acute heart failure. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, p.6 2014.

WANG, H. D. e cols. Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. **Circ Res.**, v. 88, n. 9, p. 947-53, 2001.

WANG, T.; LI, G.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; LI, Q. Overactivation of cannabinoid receptor type 1 in rostral ventrolateral medulla promotes cardiovascular responses in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension:** v. 35 - Issue 3 - p 538–545, 2017.

WEBB e cols. Cell Migration. **Curr Biol.** v.113(19): R756-9; 2003.

WEI, H., AHN, S., SHENOY, S.K., KARNIK, S.S., HUNYADY, L., LUTTRELL, L.M., LEFKOWITZ, R.J. Independent  $\beta$ -arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. **Proc Natl Acad Sci USA** 100:10782–10787; 2003.

WHALEN, E. J.; RAJAGOPAL, S.; LEFKOWITZ, R. J.. Therapeutic potential of  $\beta$ -arrestin- and G protein-biased agonists. **Trends Mol Med.** 17(3): 126–139, 2011.

World Health Organization. **A global brief on Hypertension. Silent Killer, global public health crisis.** World Health Day, 2013.

WU, K. L.; CHAN, S. H.; CHAN, J. Y. Neuroinflammation and oxidative stress in rostral ventrolateral medulla contribute to neurogenic hypertension induced by systemic inflammation. **Journal of neuroinflammation**, 9(1), 1, 2012.

XIE, H. H.; SHEN, F. M.; ZHANG, X. F.; JIANG, Y. Y.; Su, D. F. Blood pressure variability, baroreflex sensitivity and organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with various antihypertensive drugs. **European Journal of Pharmacology** 77 – 82, 2006.

YAMORI, Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. **Experimental and Genetic Models of Hypertension**.v.4, 1984.

YAN, C.; KIM, D.; AIZAWA, T.; BERK, B. C. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 23: 26-36, 2003.

YAN, M. H.; WANG, X.; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 90-101, 2013.

YE, Z. Y.; LI, D. P. and PAN, H. L. Regulation of Hypothalamic Presympathetic Neurons and Sympathetic Outflow by Group II Metabotropic Glutamate Receptors in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension** 62: 255- 262, 2013.

YONGUE, B. G., ANGULO, J. A., MCEWEN, B. S. and MYERS, M. M. Brain and liver angiotensinogen messenger RNA in genetic hypertensive and normotensive rats, **Hypertension**. 17, 485-491, 1991.

YOUNG, C. N., MORGAN, D. A., BUTLER, S. D., RAHMOUNI, K., GURLEY, S. B., COFFMAN, T. M., ... & DAVISSON, R. L. Angiotensin type 1a receptors in the forebrain subfornical organ facilitate leptin-induced weight loss through brown adipose tissue thermogenesis. **Molecular metabolism**, 4(4), 337- 343, 2015.

ZHENG, H., LOH, H. H. and LAW, P. Y. Agonist-selective signaling of G proteincoupled receptor: mechanisms and implications. **IUBMB life** 62(2): 112-119, 2010.

ZIDAR, D.A., VIOLIN, J.D., WHALEN, E.J., LEFKOWITZ, R.J. Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. **Proc Natl Acad Sci USA** 106:9649–9654; 2009.

ZIMMERMAN, M.C., LAZARTIGUES, E., SHARMA, R.V., DAVISSON, R.L. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. **Circ Res** 2004; 95: 210-216.

ZIMMERMAN, M.C., LAZARTIGUES, E., LANG, J.A., SINNAYAH, P., AHMAD, I.M., SPITZ, D.R., e cols. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. **Circ Res** 91: 1038-1045, 2002.

*Anexos*

## ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Papel da Angiotensina II no balanço entre a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2) e a desintegrina e metaloproteinase 17 (ADAM 17) durante a hipertensão espontânea", protocolo nº 090/2016 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Maria do Socorro de França Falcão – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 22/03/2017.

|                     |  |
|---------------------|--|
| Vigência do Projeto | 2016 a 2019                                  |
| Espécie/linhagem    | Ratos SHR e WKY ( <i>Rattus norvegicus</i> ) |
| Número de animais   | SHR – 40 animais; WKY – 40 animais           |
| Idade/peso          | 12 semanas (220 a 300 g)                     |
| Sexo                | Machos                                       |
| Origem              | Biotério Prof. Thomas George                 |

Profa. Dra. Islânia Gisélia Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da CEUA-UFPB