



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AMANDA DE SÁ MARTINS DE BESSA

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM COMPOSTO 21 DURANTE A
GESTAÇÃO DE RATAS HIPERTENSAS NO SISTEMA
CARDIOVASCULAR DA PROLE**

GOIÂNIA
2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Amanda de Sá Martins de Bessa

3. Título do trabalho

Efeitos do tratamento com Composto 21 durante a gestação de ratas hipertensas no sistema cardiovascular da prole

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por Carlos Henrique De Castro, Professor do Magistério Superior, em 13/06/2025, às 10:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Amanda De Sá Martins De Bessa, Usuário Externo, em 13/06/2025, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 5436208 e o código CRC D48EABEE.

AMANDA DE SÁ MARTINS DE BESSA

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM COMPOSTO 21 DURANTE A
GESTAÇÃO DE RATAS HIPERTENSAS NO SISTEMA CARDIOVASCULAR
DA PROLE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), como pré-requisito para a obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca.

GOIÂNIA

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Bessa, Amanda de Sá Martins de

Efeitos do tratamento com Composto 21 durante a gestação de ratas hipertensas no sistema cardiovascular da prole [manuscrito] / Amanda de Sá Martins de Bessa. - 2025.

XCII, 92 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro; co-orientadora Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Goiânia, 2025.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Programação fetal. 2. Sistema Renina-Angiotensina. 3. Hipertensão. 4. Remodelamento cardíaco. I. Castro, Carlos Henrique de, orient. II. Título.

CDU 612.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 125 da sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas que confere a **Amanda de Sá Martins de Bessa** o título de Doutora em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia,

Aos doze dias do mês de junho de 2024, a partir das 13:30, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “Efeitos do tratamento com Composto 21 durante a gestação de ratas hipertensas no sistema cardiovascular da prole”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Carlos Henrique de Castro (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Silvia Carolina Guatimosim Fonseca (UFMG), coorientadora; Professora Doutora Maria Luiza de Moraes Barreto de Chaves (USP), membro titular externo; Professor Doutor Marco Fabrício Dias Peixoto (UFVJM), membro titular externo; Professor Doutor Robson Augusto Souza dos Santos (UFMG), membro titular externo; Professora Doutora Fernanda Cristina Alcântara dos Santos (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Carlos Henrique de Castro, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos doze dias do mês de junho de 2024.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Cristina Alcantara Dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 12/06/2024, às 17:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique De Castro, Professor do Magistério Superior**, em 12/06/2024, às 17:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Manoel Francisco Biancardi, Coordenador**, em 21/06/2024, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4601181** e o código CRC **83E5501A**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Gleydes e Isartino pelo amor incondicional e todo apoio necessário para que eu pudesse chegar até aqui. Expresso aqui a minha sincera gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo Big Bang, pelo dom da vida e por me dar saúde para que eu pudesse percorrer esse caminho.

À minha família, principalmente aos meus pais, Gleydes e Isartino, pelo amor, apoio e pelo incentivo de sempre aos meus estudos. Vocês são as pessoas mais incríveis do mundo. Obrigada por tudo, sem vocês eu não seria nada!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro, pela orientação não apenas deste trabalho, mas desde a iniciação científica. Obrigada por todos os ensinamentos, paciência, confiança e oportunidades por todos esses anos. Sou imensamente grata por todo aprendizado. Você é um grande orientador e um exemplo de ética e profissional.

À minha coorientadora Profa. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, pela orientação e por ter aberto as portas do seu laboratório para mim. Obrigada por todo conhecimento compartilhado. O seu amor e entusiasmo pela ciência são inspiradores.

Aos professores do Laboratório Integrado de Fisiopatologia Cardiovascular e Neurológica (LIFCaN), Profa. Dra. Elizabeth Pereira Mendes, Profa. Dra. Aline Priscila Pansani e Prof. Dr. Diego Basile Colugnati por contribuírem significativamente para o meu aprendizado, pela dedicação e por não medirem esforços para o desenvolvimento da ciência.

À todos os meus amigos do LIFCaN, Jaqueline M. da Costa, João Batista R. Dutra, Monique M. L. T. Bombardeli, Cláudio Q. de Lima Júnior, Helen Cristian M. Thomaz e Carla Carolina R. da Silveira (agregada do LIFCaN) pela amizade, por todo apoio e pela diversão. Vocês são pessoas maravilhosas que me ensinaram muito. É incrível fazer ciência ao lado de vocês. Não existem palavras suficientes para expressar a minha gratidão pela amizade de vocês.

À todos os integrantes do Laboratório de Sinalização Cardíaca, pelo conhecimento compartilhado e pela amizade. Sou muito grata por ter sido tão bem recebida por esse grupo. Eu admiro muito vocês!

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas da Universidade Federal de Goiás e a todos os seus professores, por contribuírem imensamente ao meu crescimento profissional. Sinto-me honrada por fazer parte dessa história.

À Universidade Federal de Goiás e à Universidade Federal de Minas Gerais, onde realizei os experimentos da minha pesquisa. Sinto-me orgulhosa por ter tido a oportunidade de aprender e desenvolver minha pesquisa nessas duas universidades que são referências.

Às agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e principalmente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por ter concedido a minha bolsa, permitindo que eu me dedicasse à realização desta pesquisa.

À Alexandra Elbakyan por possibilitar acesso igualitário à informação científica por meio da criação do Sci-Hub, plataforma que me possibilitou acesso a maior parte de artigos científicos utilizados para este estudo. O Sci-Hub é sem dúvidas uma ferramenta importante de acesso ao conhecimento.

IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA A SOCIEDADE

As doenças do coração são as que mais matam no Brasil e no mundo. Dentre elas, a hipertensão é a mais prevalente e está relacionada ao alto consumo de sal, falta de atividade física, dieta desbalanceada rica em açúcares e gorduras, e principalmente o fator genético.

Durante a gravidez, a hipertensão representa um risco ainda maior, tanto para a mãe quanto para o bebê. Além disso, a maioria dos remédios mais utilizados para o controle da doença (ex: Captopril, Enalapril, Losartan, Valsartan, etc) não podem ser utilizados pelas grávidas, pois pode promover diversos problemas ao feto e até mesmo a morte.

Desta forma, pensamos em maneiras de tratar a doença da mãe sem prejudicar o desenvolvimento dos filhos. Sendo assim, utilizamos uma substância chamada Composto 21 (C21), que aumenta a expressão de um receptor chamado AT2 envolvido em efeitos benéficos no sistema cardiovascular. O tratamento foi feito durante toda gestação de ratas hipertensas e foi avaliada as alterações cardiovasculares dos seus filhos na idade adulta.

Identificamos que o tratamento durante a gestação com C21 reduziu a pressão arterial das mães e dos filhos na idade adulta. Além disso, um dos mecanismos que participa da regulação da pressão arterial, denominado barorreflexo estava melhor. As coronárias, vasos sanguíneos do coração, apresentaram maior relaxamento contribuindo para que o sangue chegue em todo coração de forma melhor. Os corações que foram submetidos a isquemia, um processo em que uma região do coração deixa de receber suprimento adequado para sua função, apresentaram menor tempo de arritmia.

A pressão alta quando não tratada promove alterações na estrutura do coração, como o aumento das células denominada hipertrofia e acúmulo de colágenos, chamado de fibrose. Essas alterações estão associadas a prejuízos na função do coração. Os filhos das mães tratadas com C21 apresentaram redução tanto da hipertrofia quando da fibrose.

Desta forma, concluímos que o tratamento das grávidas hipertensas com o C21 foi benéfico aos filhos. Esta descoberta pode contribuir para o desenvolvimento de novos remédios para o tratamento da pressão alta durante a gravidez.

"Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas."

Marie Curie

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Doenças cardiovasculares.....	22
1.2. Sistema renina-angiotensina	23
1.3. Hipertrofias cardíacas patológicas e fisiológicas e o papel do SRA	25
1.4. Hipertensão gestacional, programação fetal e doenças cardiovasculares	29
1.5. Composto 21 e seus efeitos no sistema cardiovascular	32
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. Geral.....	34
2.2. Específicos:	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Animais.....	35
3.2. Acasalamento e tratamento com C21.....	35
3.3. Avaliação da pressão arterial sistólica.....	36
3.4. Ecocardiografia.....	37
3.5. Avaliação da atividade barorreflexa e quimiorreflexa	37
3.6. Coração Isolado.....	38
3.6.1. Preparação de coração isolado com pressão constante	39
3.6.2. Preparação de coração isolado com fluxo constante	40
3.7. Reatividade vascular aórtica.....	41
3.8. Análise morfológica do coração.....	43
3.8.1. Avaliação da fibrose cardíaca	43
3.8.2. Avaliação da morfometria do VE	44
3.9. Western Blotting	45
3.10. Zimografia	47
3.11. Análise estatística.....	48
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Efeito do tratamento com C21 na pressão arterial das ratas gestantes	49
4.2. Peso corporal dos genitores e da prole ao nascer e ao longo da vida	50
4.3. Efeitos do tratamento materno com C21 na pressão arterial da prole.....	51
4.4. Efeitos do tratamento materno com C21 na resposta barorreflexa e quimiorreflexa	53
4.5. Efeitos do tratamento materno com C21 na função cardíaca	54

4.6. Efeitos do tratamento materno com C21 na recuperação pós-isquêmica e reatividade vascular coronariana em corações isolados.....	55
4.7. Efeitos do tratamento materno com C21 na reatividade vascular aórtica	61
4.8. Efeitos do tratamento materno com C21 na hipertrofia e fibrose cardíaca	62
4.9. Efeitos do tratamento materno com C21 na marcação de NFAT	64
4.10. Efeitos do tratamento materno com C21 na expressão de proteínas no tecido cardíaco.....	64
4.11. Efeitos do tratamento materno com C21 na expressão de proteínas da MMP-2 e atividade de MMPs no tecido cardíaco	67
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES.....	78
7. REFERÊNCIAS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach, Acetilcolina.

AKT, Proteína quinase B.

Ala, Alanina.

Ang, Angiotensina.

Asp, Aspartato.

AT1, Receptor de angiotensina II do tipo 1.

AT2, Receptor de angiotensina II do tipo 2.

BRA, Bloqueadores dos receptores de angiotensina II.

BSA, Albumina.

Ca²⁺, Íons de cálcio.

C21, Composto 21.

DAG, Diacilglicerol.

DAPI, 4',6'-diamino-2-fenil-indol.

DCVs, Doenças cardiovasculares.

Delta D, Fração de encurtamento.

DIZE, Aceturato de Diminazeno.

DIVEd, Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole.

DIVEs, Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole.

DOHaD, Origem desenvolvimentistas da saúde e da doença.

ECA, Enzima conversora de angiotensina.

EDTA, Ácido etilenodiamino tetra-acético.

ERK1/2, Quinase regulada por sinal extracelular.

EROs, Espécies reativas de oxigênio.

FC, Frequência cardíaca.

FE, Fração de ejeção.

GMPc, Monofosfato cíclico de guanosina.

HAS, Hipertensão arterial sistêmica.

HC, Hipertrofia cardíaca.

IECA, Inibidores da enzima conversora de angiotensina.

IGF1, Fator de crescimento semelhante à insulina.

IL, Interleucina.

I.P, Intraperitonal.

IP3, Inositol trifosfato.

JNK, Quinase c-Jun N-terminal.

MAPK, Quinase ativada por mitôgeno.

MMPs, Metaloproteinases.

MrgD, *Mas relates G protein-coupled*.

NFAT, Fator nuclear das células T ativadas.

NFκB, Fator nuclear pró-inflamatório.

NO, Óxido nítrico.

NPS, Nitroprussiato de sódio.

NTS, Núcleo do trato solitário.

OMS, Organização mundial da saúde.

OCT, *Optimal Cutting Temperature*.

PA, Pressão arterial.

PAD, Pressão arterial diastólica.

PAM, Pressão arterial média.

PAS, Pressão arterial sistólica.

PBS, *Phosphate buffered saline*.

PE, Polietileno.

PFA, Paraformaldeído.

pH, potencial hidrogeniônico.

PI3K,

PIP2, Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.

PIVS, Pressão intraventricular sistólica.

PIVD, Pressão intraventricular diastólica.

PLC, Fosfolipase C.

PMSF, fenilmetilsulfonil.

PPVEd, Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole.

PPVEs, Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole.

S.C, Subcutânea.

SHR, *Spontaneously Hypertensive rats*.

SIVEd, Espessura do septo intraventricular em diástole.

SIVEs, Espessura do septo intraventricular em sístole.

SRA, Sistema renina-angiotensina.

TGF- β , Fator de crescimento transformador beta.

TNF- α , Fator de necrose tumoral.

VDF, Volume diastólico final.

VE, Ventrículo esquerdo.

VS, Volume sistólico.

VSF, Volume sistólico final.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática simplificada do sistema renina-angiotensina e suas ações.....	24
Figura 2. Representação esquemática da hipertrofia cardíaca.	26
Figura 3. Exposição materna a fatores adversos e riscos para a prole.....	31
Figura 4. Representação do delineamento experimental.	36
Figura 5. Representação do sistema de pletismografia de cauda.	37
Figura 6. Representação da preparação de coração isolado por pressão constante pelo sistema de Langendorff.	40
Figura 7. Representação da preparação de coração isolado por fluxo constante pelo sistema de Langendorff..	41
Figura 8. Ilustração esquemática da preparação de aorta isolada no banho de órgãos.	42
Figura 9. Ilustração esquemática da técnica de western blot..	46
Figura 10. Ilustração esquemática da técnica de zimografia.....	48
Figura 11. Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca dos animais utilizados para reprodução..	50
Figura 12. Valores do peso corporal das fêmeas e machos utilizados para reprodução.....	50
Figura 13. Valores do peso corporal da prole ao nascer e ao longo da vida.....	51
Figura 14. Valores da pressão arterial sistólica (A) e frequência cardíaca (B) da prole SHR e SHR C21..	52
Figura 15. Resposta barorreflexa.	53
Figura 16. Resposta quimiorreflexa.....	54
Figura 17. Variações na pressão intraventricular sistólica (A) e diastólica (B) avaliadas por meio do coração isolado.....	57
Figura 18. Variações na dP/dt max (A) e dP/dt min (B).....	58
Figura 19. Variações na frequência cardíaca avaliada por meio do coração isolado.	59
Figura 20. Variações no fluxo coronariano	59
Figura 21. Tempo de fibrilação	60
Figura 22. Pressão de perfusão basal (A) e variação da pressão de perfusão (B)	61
Figura 23. Reatividade vascular aórtica.....	62
Figura 24. Remodelamento cardíaco..	63
Figura 25. Marcação do NFAT no ventrículo esquerdo.	64

Figura 26. Expressão de proteínas dos receptores AT1 e AT2.....	65
Figura 27. Expressão de proteínas da AKT fosforilada e AKT total.....	65
Figura 28. Expressão de proteínas da SERCA2.	66
Figura 29. Expressão de proteínas da ERK 1-2 fosforilada e ERK total.....	66
Figura 30. Expressão de proteínas da catalase.	67
Figura 31. Expressão de proteínas da MMP2.	68
Figura 32. Atividade de MMPs no tecido cardíaco.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução de Krebs-Ringer.	39
Tabela 2. Composição da solução de Krebs-Henseleit.	42
Tabela 3. Etapas realizadas para o processo de desidratação e diafanização do tecido até o emblocamento.	43
Tabela 4. Lista de anticorpos utilizados para o western blot.	46
Tabela 5. Parâmetros avaliados pela ecocardiografia da prole de ratas hipertensas tratadas com C21.	55
Tabela 6. Parâmetros basais da função ventricular esquerda em corações isolados da prole de ratas hipertensas tratadas com C21.	56

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de outras patologias, incluindo a hipertrofia cardíaca. Estudos anteriores mostraram que a ativação do receptor AT2 da angiotensina II pelo Composto 21 (C21), um agonista do receptor AT2, promove efeitos benéficos ao sistema cardiovascular. Além disso, exposição materna a fatores considerados benéficos como o exercício físico e substâncias cardioprotetoras se mostrou importante para atenuar ou prevenir o desenvolvimento de doenças nos filhos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se o tratamento com o C21 durante a gestação de ratas hipertensas poderia atenuar a hipertensão arterial na prole e promover efeitos cardioprotetores. Ratas espontaneamente hipertensas (SHR) foram tratadas com C21 (0.3 mg/kg/dia, minibomba osmótica) durante todo o período gestacional e as fêmeas do grupo controle passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, mas não receberam tratamento. A pressão arterial sistólica foi aferida semanalmente por pletismografia de cauda durante a gestação das mães e na prole entre a 6ª e 16ª semanas de vida. No final deste período, foi feita a avaliação da função cardíaca da prole por ecocardiografia e as atividades barorreflexa e quimiorreflexa. Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia para avaliação da função ventricular esquerda pós isquemia, reatividade coronariana por meio do coração isolado (técnica de Langendorff) e reatividade vascular aórtica no sistema de banho de órgãos. Amostras de ventrículo esquerdo foram coletadas para avaliação morfológica e molecular. A pressão arterial sistólica das mães e da prole SHR C21 foi menor que seus respectivos controles, sem alteração na frequência cardíaca. O grupo experimental apresentou maior sensibilidade na resposta barorreflexa (SHR $-0,3530 \pm 0,06$ vs. SHR C21 $-0,6594 \pm 0,10$ Δ bpm/ Δ mmHg, $P < 0,05$). Os parâmetros ecocardiográficos não foram diferentes entre os grupos. O tempo de fibrilação pós-isquêmica nos corações isolados foi significativamente reduzido no grupo experimental (SHR, $87,60 \pm 34,13$ vs. SHR C21, $5,66 \pm 4,91$ segundos, $P < 0,05$). A vasodilatação coronariana em resposta à bradicinina foi maior no grupo tratado (SHR, $-2,87 \pm 1,25$ vs. SHR C21, $-12,96 \pm 3,28$ %, $P < 0,05$). No entanto, a reatividade vascular aórtica não foi diferente entre os grupos. O tratamento materno com C21 reduziu a área dos cardiomiócitos (SHR, $396,9 \pm 6,33$ vs. SHR C21, $320,5 \pm 6,44$ μm^2 , $P < 0,05$) e as fibras intersticiais (SHR, $15,93 \pm 0,85$ vs. SHR C21, $8,92 \pm 0,49$ %, $P < 0,05$) e perivasculares (SHR, $1,93 \pm 0,14$ vs. SHR C21, $1,18 \pm 0,13$ μm^2 , $P < 0,05$) no ventrículo esquerdo da prole. A marcação com o fator nuclear de células T

ativadas (NFAT) total (SHR, $41,65 \pm 3,49$ vs. SHR C21, $27,01 \pm 2,72$ u.a., $P < 0,05$) e nuclear (SHR, $3,09 \pm 0,23$ vs. SHR C21, $1,01 \pm 0,13$ u.a., $P < 0,05$) foi menor no grupo tratado. A expressão de algumas proteínas envolvidas em vias relacionadas ao remodelamento cardíaco patológico não foi diferente entre os grupos. A expressão de proteínas dos receptores AT1 e AT2 no coração também não foi alterada pelo tratamento materno. Esses resultados demonstraram que o tratamento materno de ratas espontaneamente hipertensas durante a gestação com C21 é capaz de atenuar o desenvolvimento da hipertensão arterial e promover efeitos cardioprotetores na prole. Esses dados sugerem que a ativação do receptor AT2 durante a gestação pode ser uma potencial estratégia terapêutica para a prevenção de disfunções cardiovasculares nos filhos.

Palavras-chave: Programação fetal; Sistema Renina-Angiotensina; Hipertensão; Remodelamento cardíaco.

ABSTRACT

Hypertension is the main risk factor for developing other pathologies such as cardiac hypertrophy. Previous studies have shown that the AT2 receptor activation by Compound 21 (C21), an AT2 receptor agonist, promotes beneficial effects on the cardiovascular system. In addition, maternal exposure to beneficial factors proved important in mitigating or preventing the development of diseases in the offspring. Therefore, this study aimed to evaluate whether treatment with C21 during pregnancy in hypertensive rats could attenuate the development of hypertension and promote cardioprotective effects in the offspring. Spontaneously hypertensive rats (SHR) were treated with C21 (0.3 mg/kg/day, osmotic minipump) throughout the gestational period and females in the control group underwent the same surgical procedure but did not receive treatment. The systolic blood pressure was measured weekly by tail plethysmography between the 6th and 16th weeks of age. Cardiac function of the offspring was evaluated by echocardiography and the baroreflex and chemoreflex sensibility were assessed at 16 weeks old. Then, the animals were euthanized for evaluation of left ventricular function after ischemia and coronary reactivity by isolated heart preparation (Langendorff technique) and aortic vascular reactivity in the organ bath system. Samples of the left ventricle were collected for morphological and molecular analyses. Systolic blood pressure of the SHR C21 was lower than the control group from the 6th to the 16th week, without changes in heart rate. The experimental group showed greater baroreflex sensitivity (SHR -0.3530 ± 0.06 vs. SHR C21 -0.6594 ± 0.10 Δ bpm/ Δ mmHg, $P < 0.05$). Echocardiographic parameters were not different between groups. The time of ischemia-reperfusion arrhythmia in isolated hearts was significantly reduced in the experimental group (SHR, 87.60 ± 34.13 vs. SHR C21, 5.66 ± 4.91 seconds, $P < 0.05$). Coronary vasodilation in response to bradykinin was improved in the treated group (SHR, -2.87 ± 1.25 vs. SHR C21, -12.96 ± 3.28 %, $P < 0.05$). However, aortic vascular reactivity was not different between groups. Maternal treatment with C21 reduced cardiomyocyte area (SHR, 396.9 ± 6.33 vs. SHR C21, 320.5 ± 6.44 μ m², $P < 0.05$), and interstitial (SHR, 15.93 ± 0.85 vs. SHR C21, 8.92 ± 0.49 %, $P < 0.05$) and perivascular fibrosis (SHR, 1.93 ± 0.14 vs. SHR C21, 1.18 ± 0.13 μ m², $P < 0.05$) in left ventricles of offspring. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) total (SHR, $41,65 \pm 3,49$ vs. SHR C21, $27,01 \pm 2,72$ a.u., $P < 0,05$) and nuclear (SHR, $3,09 \pm 0,23$ vs. SHR C21, $1,01 \pm 0,13$ a.u., $P < 0,05$) expression was lower in the treated group. The expression of proteins involved in pathways related to pathological cardiac remodeling was

not different between the groups. The expression of AT1 and AT2 receptor proteins in the heart was also not altered by maternal treatment. These results demonstrate that maternal treatment of spontaneously hypertensive rats during pregnancy with C21 can attenuate the development of hypertension and promote cardioprotective effects in the offspring. These data suggest that AT2 receptor activation during pregnancy may be a potential therapeutic strategy for the prevention of cardiovascular disorders in offspring.

Keywords: Fetal programming; Renin-Angiotensin System; Hypertension; Cardiac remodeling.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCVs) apresentam a maior taxa de mortalidade no mundo, correspondendo aproximadamente 17 milhões de óbitos por ano (WHO, 2014). No Brasil, as DCVs afetam cerca de 32% da população em idade adulta e são as principais causas de internações (DATASUS, 2020). A incidência elevada das DCVs gera um importante problema econômico, uma vez que são responsáveis por altas taxas de mortalidade e/ou invalidez na população economicamente ativa. Além disso, estudos epidemiológicos de várias décadas demonstraram claramente a participação da Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) como fator determinante de morbi-mortalidade cardiovascular (Rapsomaniki et al., 2014).

A HAS é uma doença crônica, multifatorial caracterizada pela elevação sustentada da pressão arterial. A pressão arterial é considerada elevada quando os valores da pressão arterial sistólica (PAS) encontra-se igual ou maior a 140 mmHg e a pressão arterial diastólica (PAD) igual ou maior a 90 mmHg (Barroso et al., 2020). Dados da OMS apontam que essa doença afeta aproximadamente 1,13 bilhão de pessoas em todo o mundo (WHO, 2014). No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2016), cerca de 36 milhões de pessoas são hipertensas. Além disso, a HAS é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de outras patologias como, hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, diabetes, insuficiência renal e acidente vascular encefálico (Bernardo et al., 2010; Johnson et al., 2018; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2016).

Alguns hábitos inadequados representam um grande risco para a patogênese da HAS, como a dislipidemia, alto consumo de açúcares, sódio e álcool, sedentarismo e estresse. Desta forma, o controle desses hábitos pode contribuir para evitar o desenvolvimento da doença ou auxiliar no controle da patologia, quando já existente. Além disso, o processo de envelhecimento, sexo e etnia também influenciam na prevalência da hipertensão, mas o fator genético representa o principal preditor para o seu desenvolvimento (Poulter et al., 2015).

A HAS pode ser classificada como primária ou secundária. É considerada primária quando não é possível determinar ao certo a sua causa e o fator genético é o principal

preditor da doença (Evangelou et al., 2018). No entanto, há casos em que o desenvolvimento da HAS ocorre devido a uma doença adjacente como doença renal crônica, hiperaldosteronismo familiar, hiperplasia adrenal congênita, a síndrome de Liddle, entre outras, então classifica-se a doença como hipertensão secundária (Raina et al., 2019).

O tratamento da HAS consiste em associação de terapias farmacológicas e não farmacológicas. As terapias não farmacológicas envolvem a prática regular de exercícios físicos, dieta balanceada e controle do estresse são alguns hábitos saudáveis que podem colaborar para o controle da pressão arterial (PA). As terapias farmacológicas para o tratamento da HAS englobam diferentes classes de medicamentos como os diuréticos, bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), bloqueadores dos receptores de angiotensina II (BRA) e betabloqueadores (Whelton et al., 2018). Ressalta-se que a associação de mais de uma classe de fármacos é uma estratégia terapêutica para um efeito anti-hipertensivo por mecanismos diferentes e conseqüentemente melhor controle da doença (Mancia et al., 2019).

A PA é controlada essencialmente por mecanismos neurais e humorais. Dentre estes mecanismos destacam-se o sistema nervoso autônomo e o sistema renina-angiotensina (SRA). Além disso, diversos estudos mostraram que alterações na atividade do SRA estão diretamente relacionadas com a gênese e o desenvolvimento da HAS e disfunções cardíacas, que serão abordadas a seguir (Povlsen et al., 2020).

1.2. Sistema renina-angiotensina

O SRA é um importante sistema responsável pelo controle da pressão arterial e do equilíbrio hidroeletrólítico. Sua ativação ocorre por redução da pressão de perfusão renal, redução das concentrações de sódio e aumento da atividade simpática renal. Estes estímulos levam à liberação de pró-renina pelas células justaglomerulares, sendo posteriormente convertida em renina. A ação da renina sobre o angiotensinogênio gera a angiotensina (Ang) I (Ocaranza et al., 2019). Esta por sua vez, é convertida em Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (Figura 1).

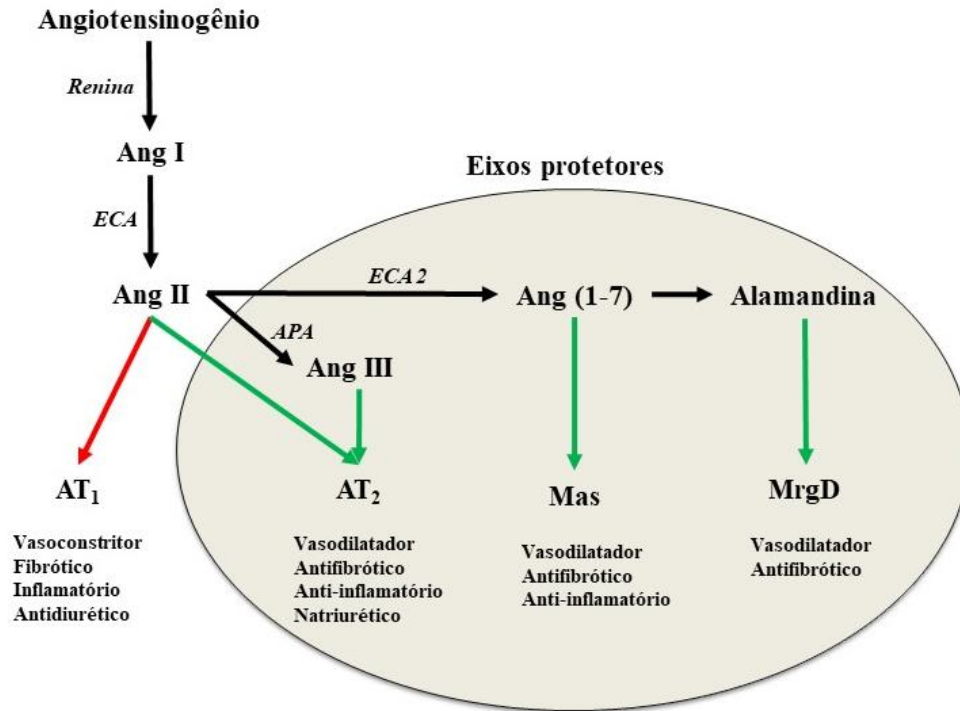


Figura 1. Representação esquemática simplificada do sistema renina-angiotensina e suas ações. Ang, angiotensina; ECA, enzima conversora de Angiotensina; APA, aminopeptidase A; APN, aminopeptidase N; AT₁, subtipo 1 do receptor de angiotensina; AT₂, subtipo 2 do receptor de angiotensina; Mas, receptor Mas; MrgD, *Mas-related G protein-coupled receptor*. Adaptado de Carey (Carey, 2017a).

A Ang II exerce seus efeitos fisiológicos ligando-se principalmente ao receptor AT₁. A ativação deste receptor pode promover, vasoconstrição, liberação de catecolaminas e aldosterona, reabsorção de sódio e água e aumento da excreção de potássio e H⁺ (Forrester et al., 2018). No entanto, o aumento sustentado dos níveis de Ang II e consequentemente, hiperativação do receptor AT₁ contribuem para o desenvolvimento de disfunções cardiovasculares, como HAS, hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca e arritmias (Ferrario and Strawn, 2006; Sakairi et al., 2008; Touyz and Berry, 2002).

Todavia, a Ang II também ativa o receptor AT₂, exercendo efeitos contrários aos promovidos via AT₁, como vasodilatação, natriurese, liberação de óxido nítrico, efeitos antifibróticos, anti-inflamatórios e anti-hipertrófico (Carey, 2017b; Qi et al., 2012), além de promover redução da pressão arterial (Carey, 2017c). É importante ressaltar que o receptor AT₂ é altamente expresso durante o desenvolvimento embrionário, mas sua expressão é reduzida após o nascimento (Grady et al., 1991). No entanto, algumas condições patológicas podem aumentar a expressão deste receptor (Carey and Padia, 2013).

Um outro importante peptídeo do SRA, a Ang-(1-7), é formada pela atividade catalítica da ECA 2 sobre a Ang II ou pela clivagem da Ang I formando Ang-(1-9) que posteriormente é convertida em Ang-(1-7) pela ECA (Donoghue et al., 2000; Vickers et al., 2002). A Ang-(1-7) exerce seus efeitos principalmente por sua ligação no receptor Mas (Santos et al., 2003). Na maioria das vezes, seus efeitos são opostos ou contra-regulatórios aos efeitos produzidos pela Ang II via receptor AT1 (Santos et al., 2018). Sendo assim, a ECA2 é considerada um importante modulador do SRA, uma vez que promove o balanço da síntese e degradação dos dois peptídeos [Ang II e Ang-(1-7)] com atividades biológicas contra-regulatórias (Crackower et al., 2002).

Recentemente, foi descrito um novo componente do SRA, a Alamandina ou Ala¹-Ang-(1-7). Este peptídeo é formado pela descarboxilação do aspartato na região N-terminal da Ang II para formar Ala¹-Ang II (Ang A), a qual é posteriormente convertida em Alamandina pela ECA2. A Alamandina também pode ser formada diretamente pela descarboxilação do aspartato da Ang-(1-7). A Alamandina se liga principalmente no receptor MrgD, promovendo ações cardioprotetoras semelhantes às da Ang-(1-7) (Etelvino et al., 2014; Lautner et al., 2013).

Diante destes dados, pode-se observar que o SRA é formado por eixos (figura 1) com atividades distintas, sendo o eixo ECA-Ang II-AT1 responsável por promover efeitos pressores. E os eixos contra-regulatórios ECA2-Ang-(1-7)-Mas, alamandina-MrgD (*Mas*-related G protein-coupled D) e Ang II-AT2 com efeitos primariamente anti-hipertensivos, sendo este último o principal alvo deste estudo.

1.3. Hipertrofias cardíacas patológicas e fisiológicas e o papel do SRA

A hipertrofia cardíaca (HC) é um processo adaptativo que envolve aumento do tamanho de cardiomiócitos em resposta à sobrecarga de pressão ou volume. Esse processo envolve uma série de mecanismos celulares e moleculares complexos com o intuito de aumentar a força contrátil e conseqüentemente bombear o sangue de forma eficiente (Nakamura and Sadoshima, 2018). O crescimento cardíaco pode acontecer tanto por mecanismos fisiológicos quanto patológicos. De acordo com a alteração geométrica ocorrida no coração, as hipertrofias podem ser classificadas como excêntrica ou concêntrica, como indicado na figura 2.

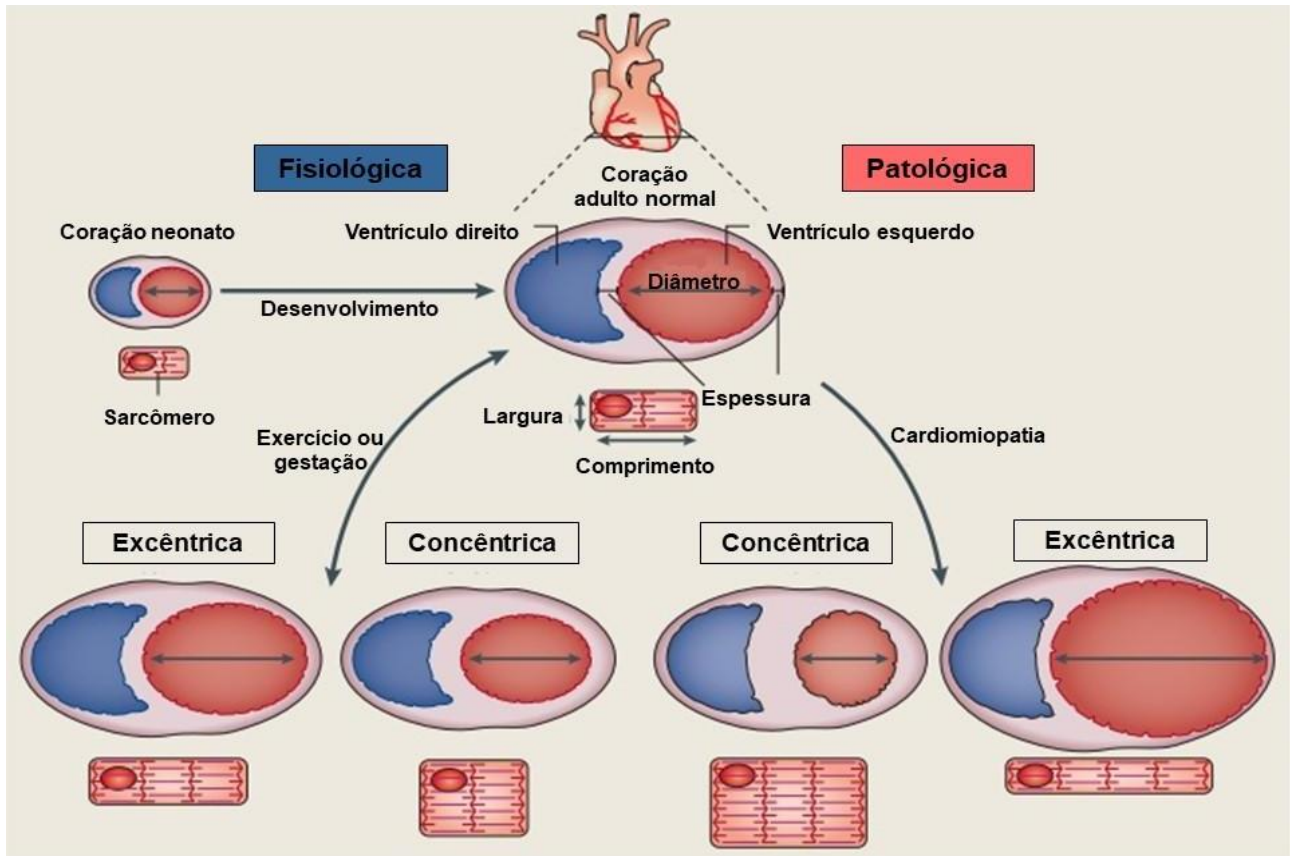


Figura 2. Representação esquemática da hipertrofia cardíaca e suas classificações. Adaptado de Mailliet e colaboradores (Mailliet et al., 2013).

O crescimento cardíaco fisiológico é um processo adaptativo normal que ocorre em resposta a um estresse fisiológico o qual promove aumento da demanda metabólica e hemodinâmica do músculo cardíaco. Esta hipertrofia tem como característica a manutenção ou aumento da função cardíaca. Para isso, o tecido apresenta angiogênese aumentada e proporcional ao crescimento celular, produção energética eficiente e sobrevivência celular (Bernardo et al., 2010). A hipertrofia cardíaca fisiológica ocorre em resposta a três principais tipos de estímulos. O primeiro exemplo é o crescimento cardíaco pós-natal, sendo induzido principalmente pelo crescimento do organismo com aumento dos níveis de hormônio do crescimento e do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) (Porrello et al., 2008). Segundo, a hipertrofia induzida pela gestação ocorre em resposta ao aumento do volume sanguíneo e consequentemente do débito cardíaco, devido ao crescimento do feto, principalmente durante o terceiro trimestre de gestação (Eghbali et al., 2006). A hipertrofia cardíaca gestacional se desenvolve de forma excêntrica. Terceiro, o exercício físico também pode ser responsável por promover hipertrofia ventricular esquerda fisiológica associada a melhora do fluxo sanguíneo coronariano e assim como na gestação essa alteração pode ser

reversível. O exercício físico pode promover uma hipertrofia excêntrica quando estimulada por treinamento aeróbio ou concêntrica em indivíduos que realizam treino resistido (Maillet et al., 2013).

Interessantemente, alguns estudos têm sugerido o envolvimento do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas no desenvolvimento da hipertrofia fisiológica. Recentemente, foi observado que a natação aumentou a expressão proteica e atividade da ECA2, os níveis de Ang (1-7) no tecido cardíaco de ratos normotensos (Fernandes et al., 2011) e aumentou a concentração de Ang-(1-7) e expressão do receptor Mas no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos (Gomes-Filho et al., 2008).

Durante a gestação, o coração também desenvolve hipertrofia caracterizada por aumento proporcional na câmara e espessura da parede ventricular com relação comprimento-largura do cardiomiócito preservado (Bassien-Capsa et al., 2006). Esta alteração na gestação está associada com a sobrecarga permanente de volume decorrente do aumento na volemia (Longo, 1983). As alterações cardíacas morfológicas e funcionais durante o período gestacional são, geralmente, revertidas após a gestação. Recentemente, nosso grupo demonstrou que o receptor Mas também participa do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca gestacional, pois o tratamento com A-779 ou a deleção genética deste receptor atenuou a hipertrofia fisiológica dos cardiomiócitos e aumentou a deposição de colágeno nos ventrículos esquerdos de ratas e camundongos gestantes (Carmos-Silva et al., 2016). Sendo assim, sabe-se que os efeitos da Ang-(1-7) via receptor Mas são semelhantes aos da Ang II mediados pelo receptor AT₂, apresentando vasodilatação, redução do remodelamento cardíaco patológico e redução de inflamação, o receptor AT₂ pode ser benéfico ao coração durante a gestação (Castoldi et al., 2021a; Santos et al., 2018).

Em contrapartida, hipertrofia cardíaca patológica é um crescimento mal adaptativo em que ocorre aumento anormal no tamanho das células cardíacas e alterações na síntese proteica (Frey et al., 2004). Está associada à perda de cardiomiócitos, rearranjo fibrótico, disfunção mitocondrial e angiogênese prejudicada (Nakamura and Sadoshima, 2018). Esse conjunto de alterações promove prejuízo da função cardíaca (Samak et al., 2016). A hipertrofia cardíaca patológica ocorre em resposta à sobrecarga crônica de volume ou pressão, como acontece devido ao infarto do miocárdio, estenose aórtica e hipertensão arterial (concêntrica), na qual a falta de tratamento adequado pode promover evolução para insuficiência cardíaca (excêntrica) e morte súbita (Tomek and Bub, 2017). Essas alterações

no tecido cardíaco envolvem diversas vias de sinalização diferentes, de acordo com o tipo de estímulo gerado que serão abordadas a seguir.

As hipertrofias cardíacas tanto fisiológica quanto patológica podem se desenvolver de forma concêntrica e excêntrica. A forma excêntrica fisiológica (exercício aeróbio, gestação) da HC se caracteriza pelo aumento da cavidade do VE, cujo crescimento dos cardiomiócitos ocorre de forma organizada em comprimento e largura, enquanto que em situações patológicas há uma dilatação da parede ventricular (insuficiência cardíaca). No entanto, quando há o crescimento da parede ou septo do VE, caracteriza-se como hipertrofia concêntrica, em que os cardiomiócitos apresentam aumento em sua espessura, com manutenção ou aumento da função devido a estímulos fisiológicos (exercício anaeróbio). Em sua forma patológica, ocorre o espessamento da parede do ventrículo esquerdo e pode estar associada a redução do volume cavitário, como por exemplo, na hipertensão (Maillet et al., 2013).

Tem sido demonstrado que a hipertrofia cardíaca fisiológica ou patológica, podem estar associadas a diferentes vias de sinalização celular. O crescimento cardíaco fisiológico pode envolver, por exemplo, a ação de hormônio tireoidiano e IGF1, ativando vias intracelulares que sinalizam para transcrição gênica e síntese proteica (Nakamura and Sadoshima, 2018). Além disso, a participação de algumas proteínas como ERK1/2 (quinase regulada por sinal extracelular), AKT, PI3K e mTOR1 podem estar envolvidas, estimulando a síntese proteica, proliferação e sobrevivência celular, além de melhorar o metabolismo energético (Maillet et al., 2013). O NO é também um importante mediador, podendo ser estimulado pelo exercício físico, contribuindo para a melhora da circulação coronariana e função contrátil do coração, além de inibir a hipertrofia patológica (Calvert et al., 2011).

As alterações deletérias decorrentes da HAS que podem ocorrer no coração, tais como fibrose miocárdica, apoptose e disfunção cardíaca, sendo a hiperativação do receptor AT1 uma possível causa destes processos fisiopatológicos (Sakairi et al., 2008). Já é amplamente conhecido o papel da Ang II via receptor AT1 no desenvolvimento das hipertrofias patológicas (Nicholls et al., 1998). Esse heptapéptido ativa várias quinases, como a quinase ativada por mitógeno (MAPK), incluindo a ERK1/2, JNK (quinase c-Jun N-terminal) e p38. Essas quinases ativadas sinalizam para o núcleo celular, estimulando alterações na expressão gênica relacionada a hipertrofia (Bhullar and Dhalla, 2022). A angiotensina II, ao se ligar ao receptor AT1, estimula a fosfolipase C (PLC), clivando o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3),

promovendo liberação intracelular de Ca^{2+} . Esse aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} ativa a calcineurina que quando ativada promove a desfosforilação do fator nuclear das células T ativadas (NFAT) e sua translocação para o núcleo interagindo com fatores transcricionais como o GATA4, estimulando a transcrição de genes relacionados à hipertrofia patológica (Wilkins et al., 2004). Além disso, a Ang II estimula a liberação de TGF- β (fator de crescimento transformador beta), um fator de crescimento envolvido na regulação do desenvolvimento celular e remodelamento tecidual, que contribui para hipertrofia, proliferação de fibroblastos e deposição de matriz extracelular (Rosenkranz, 2004). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) também é estimulada pela Ang II e desempenha um papel importante no desenvolvimento da hipertrofia (Maejima et al., 2011).

Em contrapartida, o papel do receptor AT2 na hipertrofia cardíaca ainda é controverso, mas tem sido associado a efeitos contrários aos mediados via receptor AT1. A superexpressão do receptor AT2 no VE preveniu a hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica (Metcalf et al., 2004), em condições pós infarto (Xu et al., 2014) ou por infusão de Ang II (Falcón et al., 2004). No entanto, a deleção genética do AT2 também preveniu a hipertrofia cardíaca induzida por infusão de Ang II (Ichihara et al., 2001) e em um modelo de sobrecarga pressórica por constrição da aorta (Senbonmatsu et al., 2000). Castoldi e colaboradores (2021) identificaram que a ativação do AT2 com C21 em animais com infusão de Ang II apresentaram redução da hipertrofia mediada pela redução de infiltrado inflamatório e atividade simpática (Castoldi et al., 2021a). A ativação do AT2 pode desencadear efeito inibitório na proliferação celular. No entanto, há a necessidade de estudos que busquem ampliar os conhecimentos sobre o papel deste receptor no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica.

1.4. Hipertensão gestacional, programação fetal e doenças cardiovasculares

A gestação promove alterações vasculares importantes, com o objetivo de viabilizar o desenvolvimento fetal. A invasão de trofoblastos promove um remodelamento vascular na artéria espiralada, ocasionando redução da resistência e aumento do fluxo na artéria uterina. Essa adaptação vascular é importante para o suprimento de sangue, oxigênio e nutrientes para a placenta, e conseqüentemente para o desenvolvimento fetal (Clark and Khalil, 2024). Em contrapartida, na hipertensão gestacional, ocorre uma invasão de trofoblastos prejudicada e um remodelamento vascular inadequado. Isso faz com que a resistência em

vasos uteroplacentários continue alto, de baixo fluxo, contribuindo para a isquemia, hipóxia e prejuízo no desenvolvimento fetal (Clark and Khalil, 2024). Além disso, algumas outras alterações malélicas podem ser ocasionadas, como produção de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (EROs), disfunção endotelial e alterações renais (Boeldt and Bird, 2017). A gestação normotensa está associada ainda a redução da PA, com menor resposta contrátil e aumento do relaxamento vascular e da função endotelial, e na presença da hipertensão a PA é maior e esses parâmetros são prejudicados (Khalil et al., 1998; Khalil and Granger, 2002)

Além de alterações vasculares que ocorrem na gestação, diversos trabalhos têm mostrado que a programação fetal em resposta a fatores adversos na fase uterina, podem contribuir para o desenvolvimento da HAS e outras disfunções cardiovasculares nos filhos (Millis, 2011). Essa abordagem está inserida no contexto das origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD), que abrange uma janela de programação importante para exposições ambientais, desde o período perinatal, nascimento e fases iniciais da vida que podem impactar até mesmo em fases tardias da vida (Barker, 2007, 1990). Esses estudos foram iniciados pelo médico epidemiologista David Barker, representando uma plasticidade fenotípica, com alterações fisiológicas importantes em decorrência de determinadas exposições, que podem se manifestar como doenças na idade adulta (Barker, 2002). Estudos prévios identificaram que a prole de gestantes submetidas à restrição proteica (Bogdarina et al., 2007), hipóxia (Itani et al., 2018), tabagismo (Nguyen et al., 2018), alta ingestão de sacarose (Wu et al., 2016), dieta rica em gordura (Ciccarone et al., 2019) desenvolveram disfunções cardiovasculares na fase adulta.

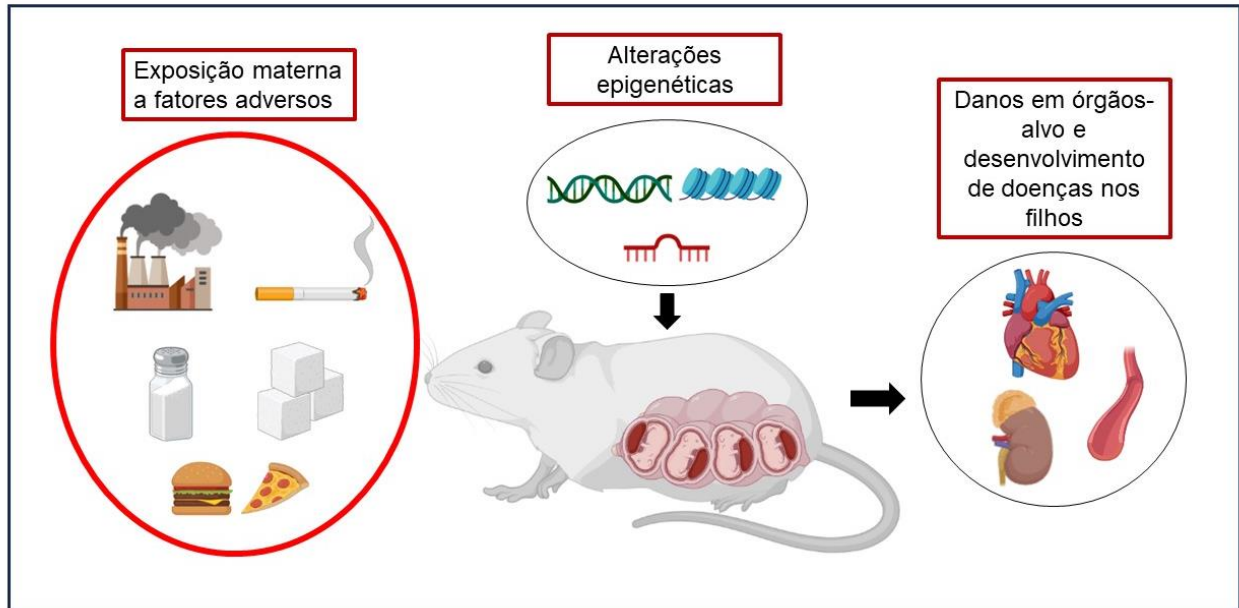


Figura 3. Exposição materna a fatores adversos e riscos para a prole. A exposição materna a fatores considerados adversos: poluentes, tabagismo, alto consumo de sódio e açúcares, dieta desbalanceada, entre outros fatores durante o período gestacional pode promover alterações epigenéticas e contribuir para o desenvolvimento de patologias nos filhos em algum período da vida (ilustração criada no BioRender).

Além disso, foi observado que o SRA pode ter um papel fundamental neste processo. Inclusive, alguns trabalhos têm demonstrado uma relação entre alterações epigenéticas associadas a genes de componentes do SRA com desenvolvimento da HAS (Bogdarina et al., 2007; Handy et al., 2011). A prole de ratas submetidas à exposição à nicotina e hipóxia apresentou maior resposta vascular contrátil à Ang II (Xiao et al., 2008) e alterou a metilação do DNA na região promotora do gene para o receptor AT1, resultando também em reatividade vascular aumentada na prole adulta (Xiao et al., 2014). Recentemente, foi demonstrado que os filhotes de ratas submetidas à dieta rica em sacarose durante a gestação desenvolveram HAS e resposta vasoconstritora aumentada mediada pelo receptor AT1 (Wu et al., 2016). A restrição proteica materna durante a gestação causou significativo aumento da pressão arterial da prole, sendo revertido com inibidor da ECA ou antagonista do receptor AT1, indicando o envolvimento do SRA na patogênese da HAS programada por dieta hipoproteica (MohanKumar et al., 2007). A prole de ratas submetidas à dieta hipoproteica durante a gestação apresentaram aumento da expressão do receptor AT1 associado à hipometilação da região promotora do seu gene (Bogdarina et al., 2007). Posteriormente, foi observado que os fetos de gestantes expostas à esta dieta também apresentaram hipometilação da região promotora do gene da ECA causando predisposição

à HAS na prole (Goyal et al., 2010). Estes dados mostram claramente o envolvimento do eixo ECA/Ang II/AT1 no desenvolvimento da HAS na prole induzida por estímulos adversos durante a gestação.

Por outro lado, alguns estímulos durante a gestação podem ser benéficos para os filhos na fase adulta (Brito et al., 2016; Carter et al., 2013; Marques et al., 2015). O exercício físico durante a gestação em ratas diminuiu a cardiotoxicidade induzida por doxorubicina nos corações dos neonatos (Brito et al., 2016) e melhorou a sensibilidade à insulina e homeostasia da glicose na prole adulta (Carter et al., 2013). A suplementação com Resveratrol durante a gestação de animais SHR atenuou o desenvolvimento da HAS e promoveu alterações benéficas na resposta vascular da prole (Care et al., 2016). Estes dados sugerem que alguns estímulos durante a gestação em condições patológicas podem contribuir benéficamente para a prole.

Recentemente, avaliamos o efeito do tratamento com aceturato de diminazeno (DIZE), um possível ativador da ECA2 ou Ang-(1-7) durante a gestação de ratas hipertensas sobre as alterações cardiovasculares na prole adulta (Bessa et al., 2019). Observamos que os dois tratamentos atenuaram o desenvolvimento da HAS, com melhora da reatividade vascular coronariana e redução da hipertrofia e da fibrose cardíaca. Além disso, também foi observado redução de deposição de colágenos nos rins.

Interessantemente, a deleção genética do receptor AT2 exacerbou o desenvolvimento de hipertrofia e fibrose cardíaca e aumentou a produção de fatores pró-inflamatórios na prole de ratas submetidas à restrição proteica durante a gestação (Yamauchi et al., 2018). Esses dados mostram o papel importante do receptor AT2 durante a fase fetal na proteção para o desenvolvimento de disfunções cardiovasculares na fase adulta.

1.5. Composto 21 e seus efeitos no sistema cardiovascular

Diante dos efeitos benéficos da ativação do receptor AT2, diversos pesquisadores têm direcionado seus estudos para o desenvolvimento de agonistas para este receptor. Neste contexto, foi desenvolvido um agonista seletivo não peptídico do receptor AT2 denominado Composto 21 (C21) (Bosnyak et al., 2011; Wan et al., 2004)

O tratamento com este composto atenuou o aumento da PA induzida por sódio (Dopona et al., 2018), promoveu efeito antifibrótico em corações de ratos hipertensos (Rehman et al., 2012) e após o infarto (Kaschina et al., 2008), em rins de animais com

nefropatia diabética (Castoldi et al., 2014; Koulis et al., 2015). O C21 também reduziu a hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga de sódio (Dozona et al., 2018) ou por nefropatia diabética (Castoldi et al., 2019).

A infusão intracerebroventricular de C21 promoveu redução da pressão arterial em animais normotensos e hipertensos, e das concentrações de noradrenalina, com melhora a sensibilidade barorreflexa (Brouwers et al., 2016; Gao et al., 2014). Este composto também apresentou ação anti-inflamatória inibindo o fator nuclear pró-inflamatório- κ B (NF κ B) com redução de Interleucina (IL) 6 (Rompe et al., 2010). Animais com hipertensão induzida por Ang II tratados com C21 ou Ang (1-7) apresentaram redução da hipertrofia e fibrose cardíaca, associadas a redução de infiltrados inflamatórios de forma independente da pressão arterial (Castoldi et al., 2021a).

Assim, considerando os efeitos fisiológicos do receptor AT₂ e os efeitos cardioprotetores observados pelo agonista seletivo para este receptor, o C21 desponta como uma possível ferramenta farmacológica para o tratamento de doenças cardiovasculares.

Mesmo com a grande diversidade de medicamentos atualmente disponíveis, a prevalência mundial de DCVs ainda é expressiva. Isso enfatiza a importância de estudos com o objetivo de desenvolver novas estratégias terapêuticas para estas doenças. Neste sentido, o aumento da ativação do receptor AT₂ tem sido proposto como uma possibilidade para o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos. Um aumento relativo na sinalização induzida por AT₂ tem sido observado no tratamento com inibidores da ECA ou bloqueador de AT₁. No entanto, a administração de um agente de bloqueio do SRA é contraindicada durante a gestação devido a fetotoxicidade (Shimada et al., 2015).

Como descrito acima, sabe-se que o SRA está envolvido no desenvolvimento de disfunções cardiovasculares na prole induzidas pela exposição materna a alguns fatores adversos. Por outro lado, a exposição a fatores considerados benéficos durante a gestação também se mostrou capaz de atenuar o desenvolvimento de patologias na prole adulta. Considerando nossos achados recentes, nos quais observamos que a prole de mães hipertensas tratadas com ativador da ECA₂ ou Ang-(1-7) apresentaram efeitos benéficos na atenuação da HAS e do remodelamento cardíaco, os efeitos cardioprotetores do receptor AT₂ e sua expressão elevada na fase fetal, a hipótese deste projeto é que o tratamento de ratas hipertensas com C21 durante a gestação possa atenuar o desenvolvimento das disfunções cardiovasculares na prole através de mecanismos relacionados a alterações epigenéticas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com o Composto 21 durante a gestação de ratas hipertensas sobre o sistema cardiovascular da prole.

2.2. Específicos:

Avaliar a influência do tratamento materno de ratas hipertensas com o C21 sobre os seguintes parâmetros da prole:

- Pressão arterial;
- Sensibilidade barorreflexa e quimiorreflexa;
- Função cardíaca;
- Reatividade vascular aórtica;
- Função endotelial de vasos de condutância (aorta) e resistência (circulação coronariana);
- Remodelamento do ventrículo esquerdo (hipertrofia e fibrose);
- Expressão de proteínas envolvidas nas vias de sinalização pró-hipertrofia e pró-fibróticas no tecido cardíaco;
- Atividade de metaloproteinases.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR, *spontaneously hypertensive rats*), fêmeas e machos, com 12 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG, Goiânia). Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas a uma temperatura de ± 23 °C, ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Estes animais foram utilizados em conformidade com as normas e procedimentos relativos ao uso de animais de laboratório e aprovados pela Comissão de Ética de uso animal da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG: 039/2017).

O ciclo estral das fêmeas foi acompanhado por lavado vaginal e foram utilizadas as ratas que apresentaram ciclo regular.

3.2. Acasalamento e tratamento com C21

O tratamento com C21 (gentilmente cedido por Vicore Pharma) foi realizado por mini bombas osmóticas (Alzet®, 28 dias), na dose de 0.3 mg/kg/dia. Esta dose foi estabelecida baseando-se em estudos prévios (Castoldi et al., 2014; Lauer et al., 2014; Paulis et al., 2012) e um teste realizado anteriormente no nosso laboratório. Para o implante das minibombas, as ratas foram anestesiadas com tribromoetanol (Sigma®) (0.25 g/Kg, i.p.), tricotomia da pelagem e incisão de 2 cm na região posterior entre as escápulas. As bombas osmóticas foram colocadas no primeiro dia do diestro II, período não fértil que dura aproximadamente 48-55 h. O grupo controle passou pelo mesmo procedimento cirúrgico realizado no grupo experimental, porém não receberam implantação das bombas osmóticas. As fêmeas ficaram dois dias de recuperação pós cirurgia, para então estarem em proestro (período fértil) e serem colocadas com os machos para o cruzamento.

O cruzamento foi confirmado pela presença de espermatozóides por meio do lavado vaginal, indicando o início da gestação. As fêmeas que não estavam com o ciclo estral regular ou não cruzaram foram excluídas do estudo. Após o nascimento dos filhos, foram mantidos 8 animais por ninhada, preferencialmente machos, até o desmame (21 dias).

Os animais machos foram divididos em dois grupos experimentais:

- SHR (filhos de mães não tratadas)
- SHR C21 (filhos de mães tratadas com C21)

Ao completarem 16 semanas de vida, foram realizadas as análises *in vivo* e posteriormente submetidos à eutanásia para análises *ex vivo* e coletas de tecidos. O delineamento experimental está representado na figura 4.

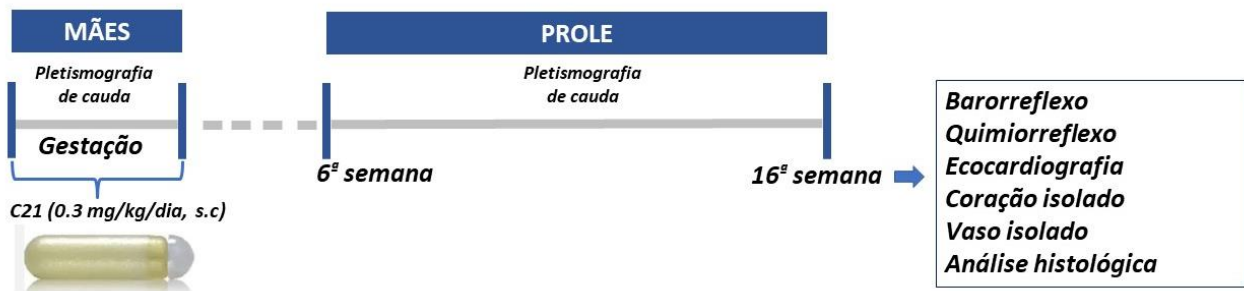


Figura 4. Representação do delineamento experimental.

3.3. Avaliação da pressão arterial sistólica

A avaliação da pressão arterial sistólica das ratas gestantes e da prole foi realizada semanalmente por pletismografia de cauda. As avaliações iniciaram na semana anterior ao acasalamento e prosseguiu por todo o período gestacional. As aferições da prole foram realizadas no período entre a 6^a. e 16^a. semana de idade.

Para isso, os animais foram colocados em uma caixa com luz infravermelha por 10 minutos para serem aquecidos e possibilitar a detecção de sinal, como indicado na figura 5. Após esse período foi colocado um *cuff* e um sensor de pulso na cauda do animal para o registro da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca. Foram obtidos três valores por dia e duas vezes por semana para a obtenção da média aritmética semanal por animal.

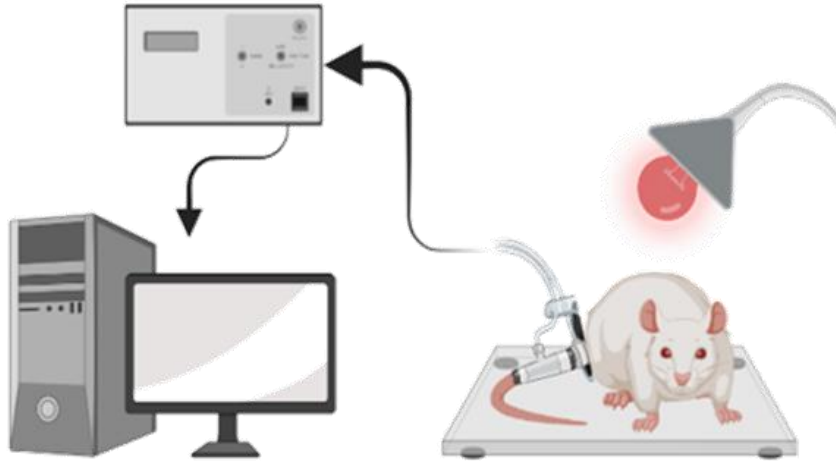


Figura 5. Representação do sistema de pletismografia de cauda.

3.4. Ecocardiografia

A avaliação da função cardíaca foi feita por ecocardiografia realizada na 16ª semana de idade da prole. Para este procedimento, os animais foram anestesiados com Xilazina (0,07 ml/100 g - Syntec®) e Cetamina (0,1 ml/100 g - Syntec®). A região do tórax e abdome dos animais foi tricotomizada e as imagens foram obtidas pela janela paraesternal direita através do modo bidimensional (B) e modo M (motion) do ventrículo esquerdo em um corte transversal.

Os seguintes parâmetros avaliados em modo M a nível dos músculos papilares foram: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole (DIVEs) e diástole (DIVEd); espessura do septo interventricular em sístole (SIVs) e diástole (SIVd); espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole (PPVEs) e diástole (PPVEd). Os parâmetros da função cardíaca avaliados foram: fração de ejeção (FE), fração de encurtamento (Delta D), volume sistólico (VS), volume sistólico final (VSF), Volume diastólico final (VDF). Todas as medidas e cálculos foram realizados de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

3.5. Avaliação da atividade barorreflexa e quimiorreflexa

As avaliações das atividades barorreflexa e quimiorreflexa foram realizadas em ratos acordados. O procedimento cirúrgico para canulação de veia e artéria femoral foi realizado no dia anterior ao registro da PA e FC. Para implante das cânulas na veia e artéria femoral,

os animais foram anestesiados com Xilazina (0,07 ml/100 g - Syntec®) e Cetamina (0,1 ml/100 g - Syntec®). Foi realizada uma incisão na região inguinal de uma das patas para implantação de cânulas de polietileno (PE) formadas pela fixação da PE-50 (14 cm) com PE-10 (3 cm para a veia e 4 cm para a artéria) e preenchidas de heparina (400 U.I./mL). Com a utilização de um trocáter as cânulas foram passadas pela região dorsal do animal e abertura na região entre as duas escápulas para saída e fixação das cânulas.

Após 24 horas da cirurgia de canulação foram realizados os registros dos animais acordados. A cânula inserida na artéria femoral foi acoplada ao sistema de aquisição de dados (Dataq Instruments) para o registro da PA e FC. A cânula inserida na veia femoral foi utilizada para administração das drogas. Após a estabilização e 30 min de período basal foi realizada a administração em bólus de fenilefrina (10; 15 e 20 µg/ml) e nitroprussiato de sódio (100; 150 e 200 µg/ml) com intervalos de 5 minutos. Para a análise da sensibilidade barorreflexa foi calculada a média das razões entre a variação da FC e variação da pressão arterial.

Após 15 minutos do registro da resposta barorreflexa foi realizado o teste da atividade quimiorreflexa com administração em bólus (0,1 ml) de cianeto de potássio (KCN – 40 µg/ml). A análise foi feita identificando a variação da FC e variação da PA em resposta ao KCN.

3.6. Coração Isolado

A função ventricular esquerda após isquemia e resposta vasodilatadora coronariana foram avaliadas em corações isolados pela técnica de Langendorff. Para a avaliação da função ventricular pós-isquêmica foi utilizado a preparação de pressão constante (figura 6). A resposta vasodilatadora foi avaliada no sistema de fluxo constante (figura 7). Esses experimentos *ex vivo* foram realizados quando os animais completaram 16 semanas de idade. Para isso, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (Sigma®) (0.25 g/Kg, i.p.), o tórax foi aberto na região do esterno, o coração foi retirado e inserido no sistema por meio da aorta ascendente. Para manutenção da atividade do órgão, o coração foi perfundido com solução nutritora de Krebs-Ringer (Tabela 1), pH de 7,4 a uma temperatura de 37° C e oxigenada de forma contínua por uma mistura carbogênica contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂.

Tabela 1. Composição da solução de Krebs-Ringer.

Solução de Krebs-Ringer	
Material	Quantidade (mM)
NaCl	118,41
KCl	4,96
KH ₂ PO ₄	1,17
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,17
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25
C ₆ H ₁₂ O ₆	11,65
NaHCO ₃	26,24

3.6.1. Preparação de coração isolado com pressão constante

Para análise da função ventricular esquerda após isquemia, os corações foram perfundidos sob uma pressão constante de 65 mmHg. Após um período de estabilização de aproximadamente 30 minutos e 10 minutos para o registro dos parâmetros basais, foi realizada a oclusão da coronária descendente anterior esquerda para indução da isquemia por 15 minutos. Após este período, a oclusão foi liberada e aguardado e um período de reperfusão de 20 minutos.

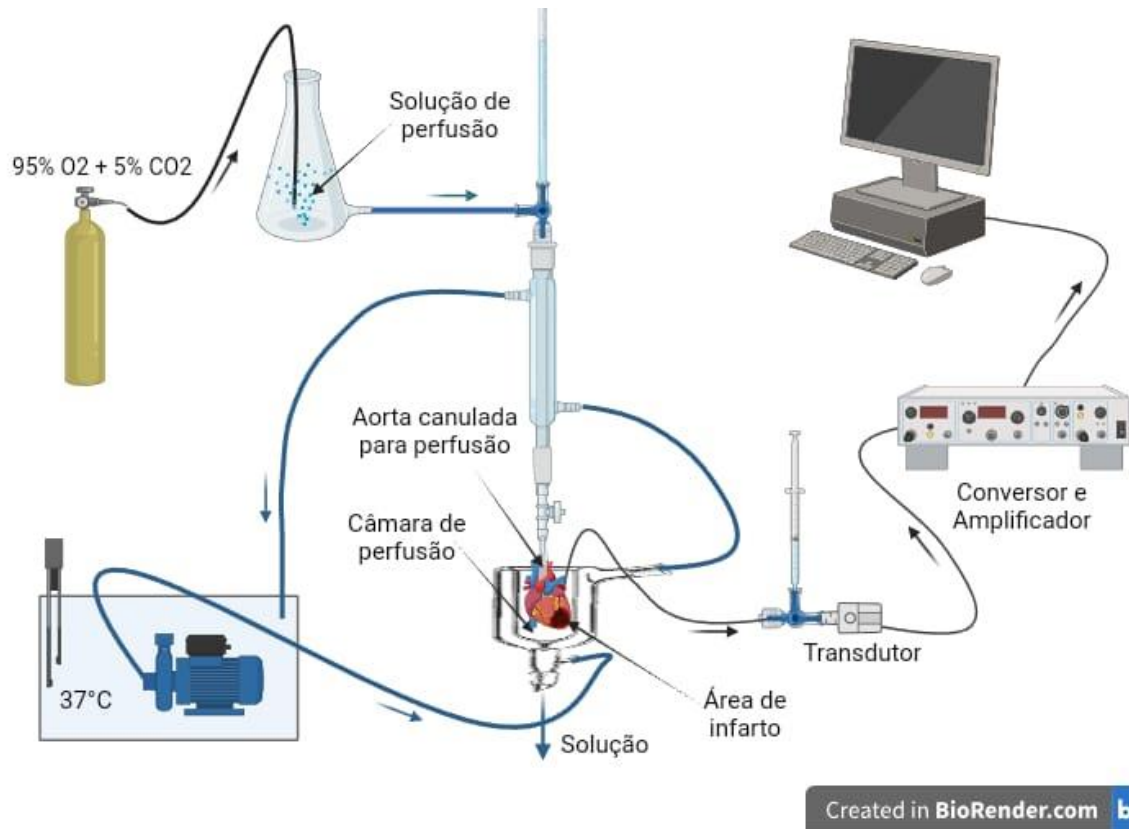


Figura 6. Representação da preparação de coração isolado por pressão constante pelo sistema de Langendorff.

3.6.2. Preparação de coração isolado com fluxo constante

O segundo protocolo utilizado foi realizado para avaliar a reatividade coronariana no sistema de perfusão com fluxo constante. Este protocolo consistiu em um período de 30 minutos de estabilização, 10 minutos para aquisição dos parâmetros basais e subsequente administração de bradicinina na concentração de 10^{-5} mol/L. A bradicinina foi administrada por uma bomba de infusão sob um fluxo de 1% do fluxo basal de 12 a 14 ml/min. A avaliação da vasomotricidade coronariana consistiu da análise das alterações na pressão de perfusão, sendo a vasodilatação observada pela redução desta pressão e a vasoconstrição pelo seu aumento.

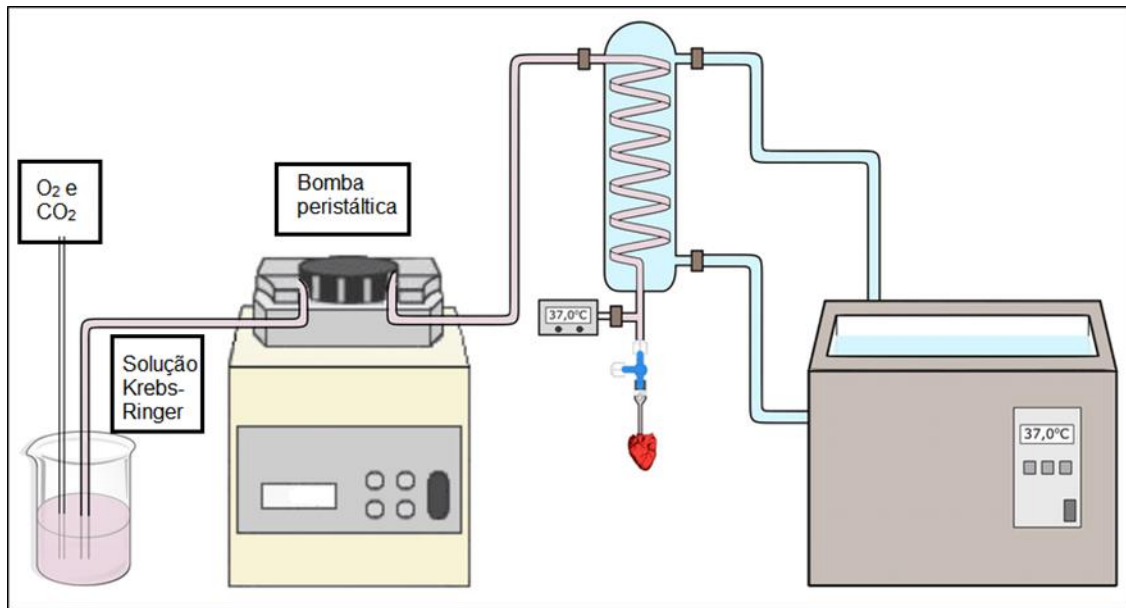


Figura 7. Representação da preparação de coração isolado por fluxo constante pelo sistema de Langendorff. Adaptado de Marchini e colaboradores (Marchini et al., 2017).

3.7. Reatividade vascular aórtica

Após a retirada da aorta torácica o tecido adiposo e conectivo adjacentes foram dissecados, a aorta foi dividida em quatro anéis de 4 mm. Para a avaliação da reatividade dependente e independente de endotélio, o endotélio vascular foi preservado em dois anéis e retirado em outros dois por meio da fricção com a haste metálica. Os anéis foram montados no sistema de banho de órgãos, como ilustrado na figura 8.

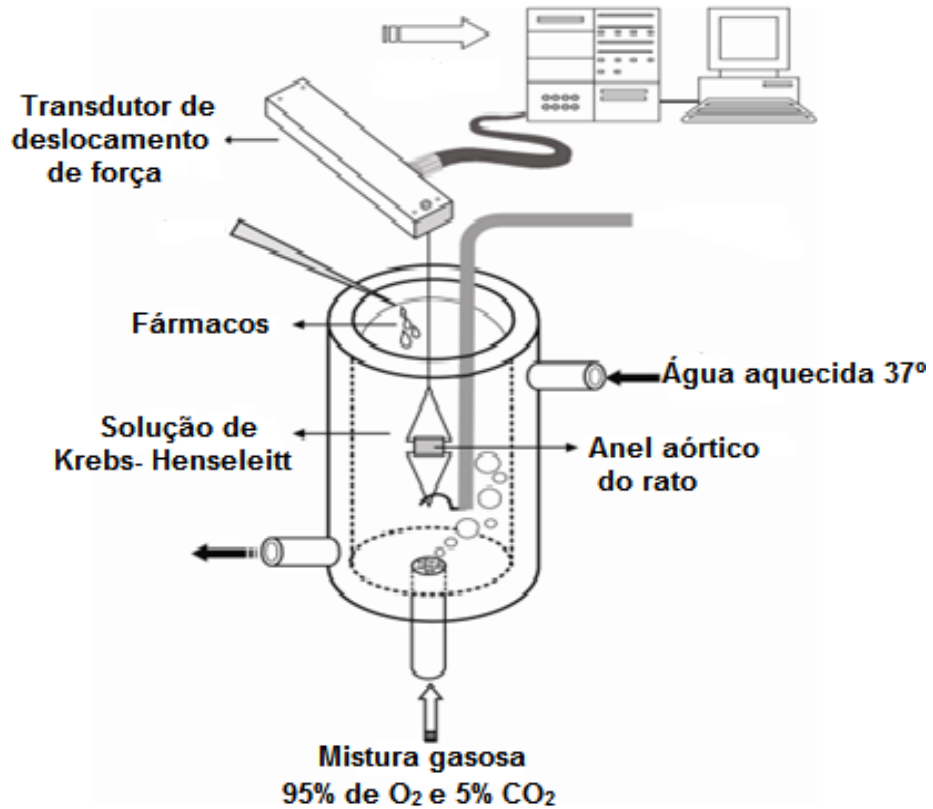


Figura 8. Ilustração esquemática da preparação de aorta isolada no banho de órgãos (Yildiz et al., 2013).

Os vasos foram mantidos em solução de Krebs-Henseleit (Tabela 2) oxigenada (95% de O₂ e 5% de CO₂) a uma temperatura de 37° C. O protocolo consistiu em um período de estabilização inicial de 60 minutos, mantendo uma tensão basal de 1,5 gramas, com trocas de solução a cada 15 minutos. Para avaliar o relaxamento dependente de endotélio, foi realizada uma curva dose resposta cumulativa com acetilcolina (ACH, 10⁻⁹ a 10⁻⁵ mol/L) em anéis pré-contraídos com fenilefrina (10⁻⁷ mol/L). O relaxamento independente de endotélio foi avaliado em anéis de aorta sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina e subsequente administração de concentrações crescentes e cumulativas de nitroprussiato de sódio (NPS 10⁻¹¹ a 10⁻⁵ mol/L). Além disso, foi realizada curva dose-resposta de fenilefrina (10⁻⁹ a 10⁻⁵ mol/L) em anéis com e sem endotélio para avaliação da resposta contrátil.

Tabela 2. Composição da solução de Krebs-Henseleit.

Solução de Krebs- Henseleit	
Material	Quantidade (mM)
NaCl	118,06
KCl	4,6

KH ₂ PO ₄	0,9
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,4
C ₆ H ₁₂ O ₆	11,1
NaHCO ₃	24,9
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,3

3.8. Análise morfológica do coração

Para avaliar alterações morfológicas, os corações coletados foram imersos em solução de KCL (4 mM) para parada em diástole. Os corações foram dissecados e o ventrículo esquerdo foi pesado para a obtenção do índice de massa ventricular (IMV), calculado pela razão do peso do ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia (osso longo que acompanha o crescimento corporal).

3.8.1. Avaliação da fibrose cardíaca

O ventrículo esquerdo foi seccionado em três partes no sentido transversal. O ápice e a base foram congelados em nitrogênio líquido para análises moleculares. A parte medial foi fixada em formalina (10%) por 24 horas. Após este período, as amostras passaram pela desidratação (concentrações crescentes de álcool), diafanização (Xilol) e emblocadas em paraplast. O detalhamento destes processos está descrito na (tabela 3).

Tabela 3. Etapas realizadas para o processo de desidratação e diafanização do tecido até o emblocamento.

Desidratação	
Reagente	Período
Álcool 70%	1 hora
Álcool 80%	1 hora
Álcool 95%	1 hora
Álcool Absoluto I	1 hora
Álcool Absoluto II	1 hora
Álcool Absoluto III	1 hora
Diafanização	
Reagente	Período

Xilol I	1 hora
Xilol II	1 hora
Parafina I	1 hora
Parafina II	1 hora
Paraplast	Emblocamento

As amostras foram cortadas com espessura de 5 μm em micrótomo e posteriormente coradas com tricrômico de Masson para avaliação de deposição de colágenos.

As imagens histológicas foram obtidas utilizando o microscópio Zeiss Apotome 2 e o software Zen Lite 2012. Foram realizadas microfotografias (com objetiva de 20x) para análise de colágeno intersticial e perivascular. A análise das imagens capturadas ocorreu com a utilização do software Image Pro-Plus v 6.0. Para avaliação de colágenos intersticiais foi utilizada uma grade com 130 pontos para contabilizar as regiões com marcação em azul (Masson). A fibrose perivascular foi avaliada por meio da razão da área do colágeno dividida pela área do lúmen vascular.

3.8.2. Avaliação da morfometria do VE

Os corações coletados foram seccionados na altura do músculo papilar e fixados em paraformaldeído (PFA) 4%, sendo mantidos nesta solução por 24 horas. Após esse período as amostras foram lavadas em PBS e mantidas em solução de sacarose 30% (diluída em PBS) por 24 horas para evitar cristais de gelo no processo de congelamento. Em seguida, o material foi colocado em OCT (*Optimal Cutting Temperature*) e congelado em freezer a -80°C .

As amostras foram cortadas no criostato a uma espessura de 12 μm e os cortes foram fixados em PFA 4% por 15 minutos, lavados em solução de BSA (albumina, 1%), incubados com o marcador de membrana celular WGA (1:200) por 15 minutos e, posteriormente, com BSA 3% (solução de bloqueio) por 30 minutos. O anticorpo primário para marcação do NFAT (1:200 em BSA 3%) foi incubado e deixado a 4°C *overnight*. No dia seguinte o anticorpo primário foi lavado com solução de BSA a 1% e foi administrado o anticorpo secundário (Alexa Fluor 488, anti-mouse, 1:200) por um período de 2 horas. Novamente as amostras foram lavadas com solução de BSA 1% e foi administrado o DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol

- marcador nuclear, 1:500) por 5 minutos. Por fim, foi adicionado glicerol 60% para montagem das lâminas.

As imagens foram obtidas no microscópio confocal Zeiss LSM 880 no Centro de Aquisição de Processamento de Imagens (Instituto de Ciências Biológicas – UFMG) e analisadas no software Zen Lite 2012 pela realização da medida da área dos cardiomiócitos e marcação do NFAT.

3.9. Western Blotting

Para análise da expressão proteica (figura 9), fragmentos dos ventrículos esquerdos foram retirados da região do ápice e da base e homogeneizados em tampão de digestão contendo PBS (NaCl 100 mM, Tris-base 50 mM, EDTA 2 H₂O mM, Na₄P₂O₇ 10 H₂O 50 mM, e MgCl₂ 1 mM, pH 8.0) com 0.3% Triton X-100, 1% Nonidet P40, 0.5% deoxicolato de sódio, e NaF 20 mM). Também foi adicionado ao tampão, inibidores de protease e fosfatase (aprotinina, benzamidina, ortovanadato de sódio, PMSF).

As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976), para separação em gel de SDS-PAGE. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF, incubadas com solução de bloqueio (leite desnatado, 5%) e detergente para evitar ligações inespecíficas. As membranas foram incubadas na presença do anticorpo primário contra as proteínas selecionadas e, posteriormente, com anticorpo secundário. A reação foi revelada por quimioluminescência utilizando o kit ECL (Bio-Rad®). Em todos os experimentos os níveis de proteína foram normalizados pelos níveis de expressão da HSP90 ou GAPDH e analisados pelo software Image Quant TL Toolbox v 8.1.

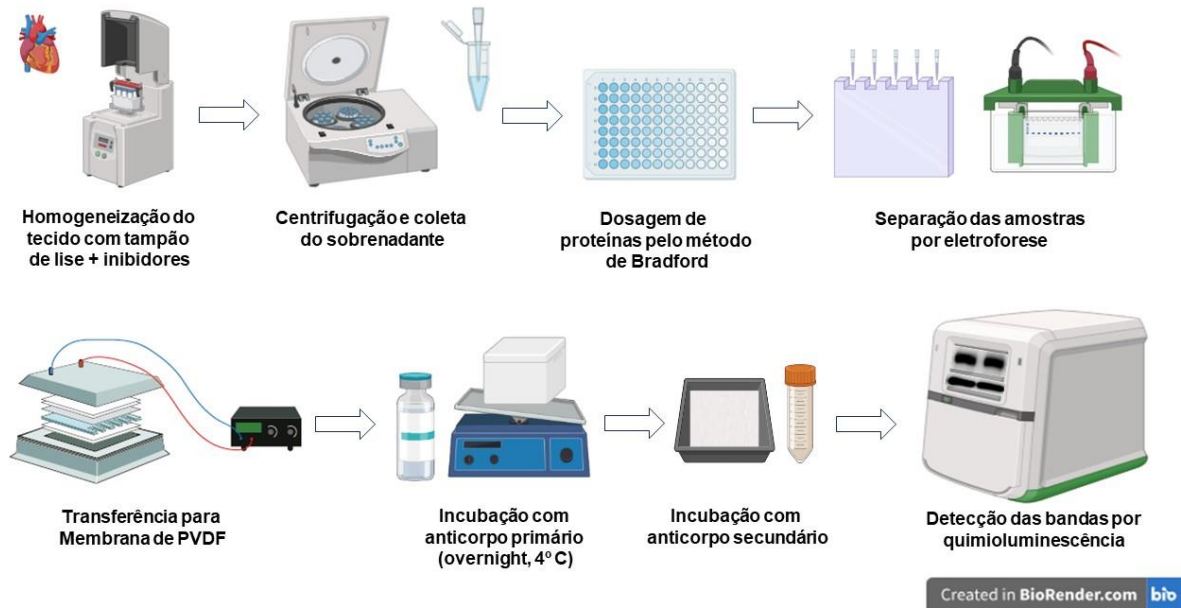


Figura 9. Ilustração esquemática da técnica de western blot. Criado no BioRender.

Tabela 4. Lista de anticorpos utilizados para o western blot.

Anticorpo primário	No. catálogo	Diluição	Secundário	Diluição
Serca2	376235 (Santa Cruz)	1:1000	Anti-mouse	1:15000
pAKT (Ser 473)	9271S (Cell Signaling)	1:2000	Anti-rabbit	1:15000
AKT total	8805 (Abcam)	1:1000	Anti-rabbit	1:15000
pERK1/2 (Thr202/Tyr204)	4370 (Cell Signaling)	1:1000	Anti-rabbit	1:15000
ERK1/2	9102L (Cell Signaling)	1:1000	Anti-rabbit	1:15000
AT1	PA5-20812 (Invitrogen)	1:2000	Anti-rabbit	1:15000
AT2	MA5-38084 (Invitrogen)	1:2000	Anti-rabbit	1:15000
MMP2	92536 (Abcam)	1:3000	Anti-rabbit	1:5000
Catalase	PA5-29650	1:500	Anti-rabbit	1:500

	(Invitrogen)			
HSP90	13119 (Santa Cruz)	1:5000	Conjugado	1:15000
GAPDH	32233 (Santa Cruz)	1:3000	Anti-mouse	1:15000

3.10. Zimografia

As amostras de ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em tampão de Lise (NaCl 100 mM, Tris-base 50 mM, EDTA 2 H₂O mM, Na₄P₂O₇ 10 H₂O 50 mM, e MgCl₂ 1 mM, pH 8.0) com 0,3% Triton X-100, 1% Nonidet P40, 0,5% deoxicolato de sódio, e NaF 20 mM), contendo inibidores de protease e fosfatase (benzamidina, ortovanadato de sódio, PMSF).

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) para a realização da zimografia (figura 10) e as amostras foram separadas em gel de 8% de bis-acrilamida, SDS, Tris-HCl pH 8,8 e gelatina. O gel de empacotamento foi feito a 4% de bis-acrilamida, SDS, Tris-HCl pH 6,8. Para retirada do SDS após a eletroforese, os géis foram agitados em solução de Triton (2,5% Triton X-100; 50 mM Tris, pH 7,4; 5 mM CaCl₂) e para ativação de MMPs foram incubados em solução composta por Tris (pH 7,4), CaCl₂ e NaCl a 37 °C por 20 horas. Após esse período foi realizada a coloração (0,5% Coomassie Brilliant Blue, 30% metanol e 10% ácido acético e descorados (35% de metanol e 10% ácido acético).

Os géis foram fotografados e a atividade das MMPs foi determinada pela intensidade de bandas claras (por degradação da gelatina) identificadas de acordo com os pesos moleculares específicos (Pró MMP 130 kD, MMP-9 84 kD e MMP-2 62 kD) e analisadas pelo programa Image J.

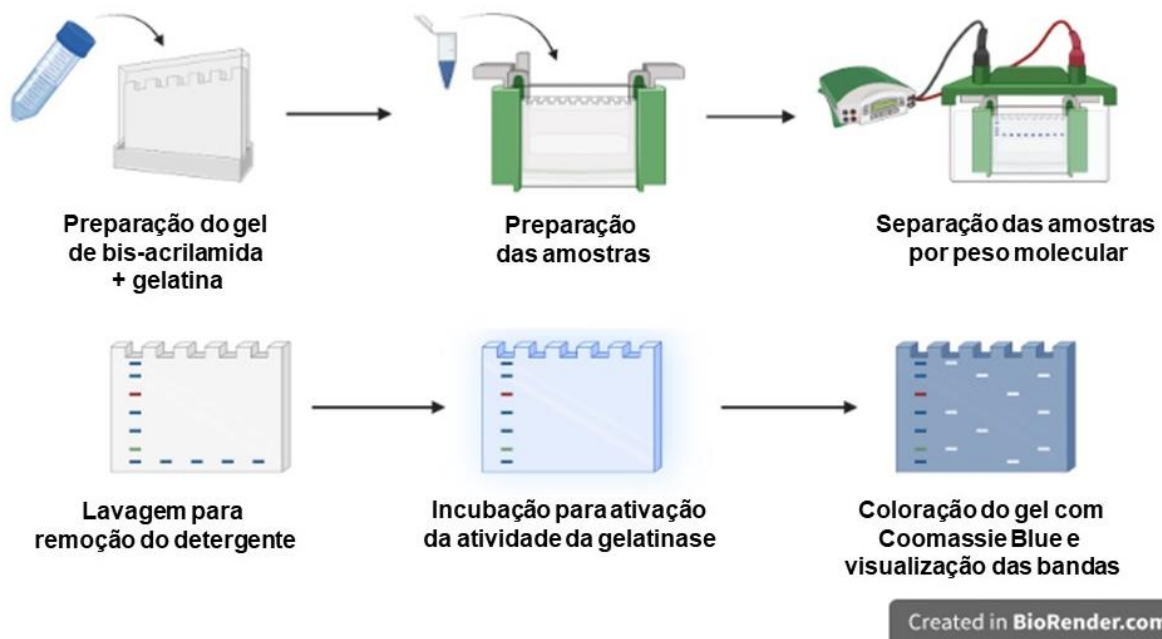


Figura 10. Ilustração esquemática da técnica de zimografia. Criado no BioRender.

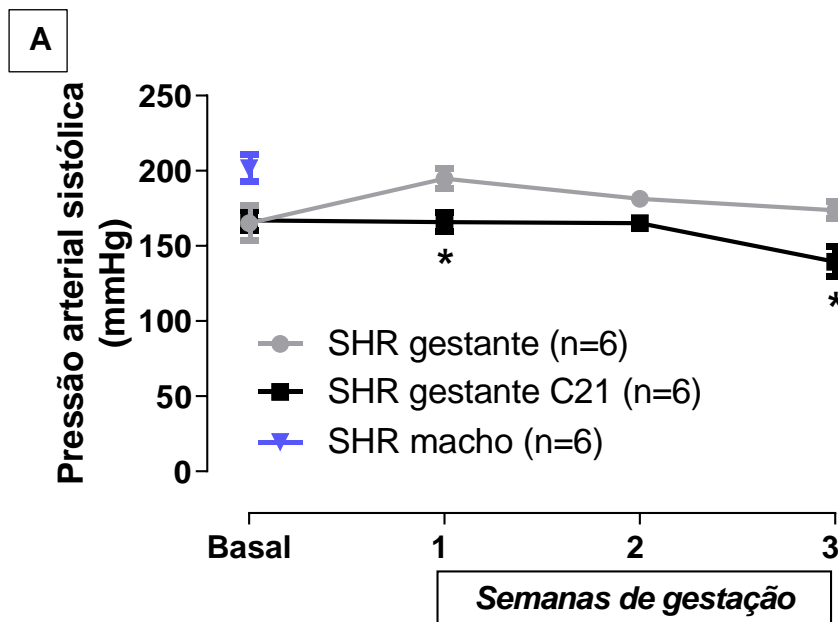
3.11. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A pressão arterial sistólica, frequência cardíaca, acompanhamento de peso corporal, isquemia e reperfusão e reatividade vascular aórtica foram analisados usando *two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Sidak. Para análise de parâmetros: peso ao nascer, atividade barorreflexa e quimiorreflexa, ecocardiográficos, reatividade coronariana, tempo de fibrilação, morfológicos do coração, expressão de proteínas no VE e zimografia foi utilizado teste t de *student* não pareado. Para as análises estatísticas e a construção dos gráficos foi utilizado o software Graph Pad Prism 9.0.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do tratamento com C21 na pressão arterial das ratas gestantes

Os animais utilizados para a reprodução tiveram a PAS e a FC aferidas antes (machos e fêmeas) e durante o período da gestação e tratamento. Como observado na figura 11A, todos os animais utilizados para a reprodução apresentaram valores elevados de PAS sem diferença estatística entre as fêmeas no período pré gestacional. A partir da primeira semana de gestação, o tratamento não promoveu redução da PA das SHR gestantes tratadas com C21, mas preveniu o aumento da PAS se comparado às ratas do grupo controle. Essa diferença entre os grupos permaneceu na 1ª e 3ª semanas de gestação. A FC não foi diferente entre os grupos (figura 11B).



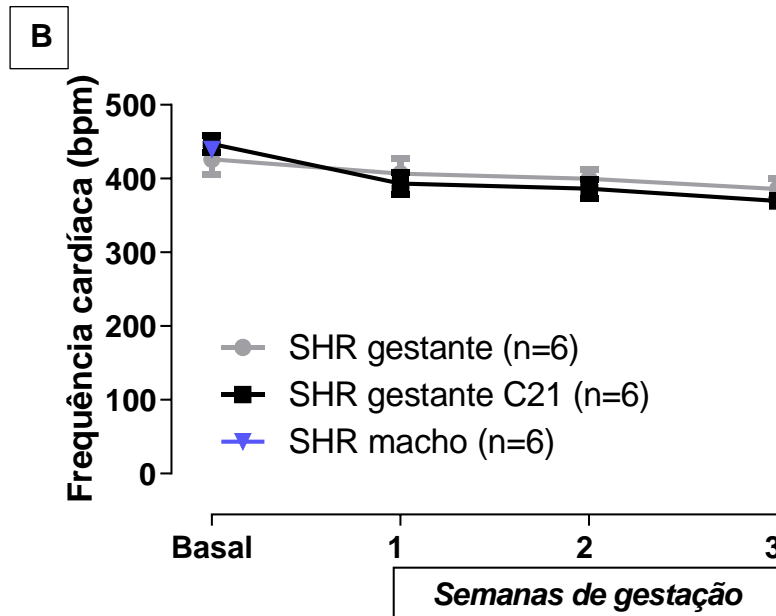


Figura 11. Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca dos animais utilizados para reprodução. Os valores foram obtidos semanalmente por pletismografia de cauda. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por *Two Way ANOVA* seguido pelo pós teste de Sidak de múltiplas comparações. * $P < 0,05$ vs. SHR gestante.

4.2. Peso corporal dos genitores e da prole ao nascer e ao longo da vida

A figura 12 mostra o peso corporal dos animais genitores. O tratamento não promoveu alterações no peso das gestantes ao longo da gestação.

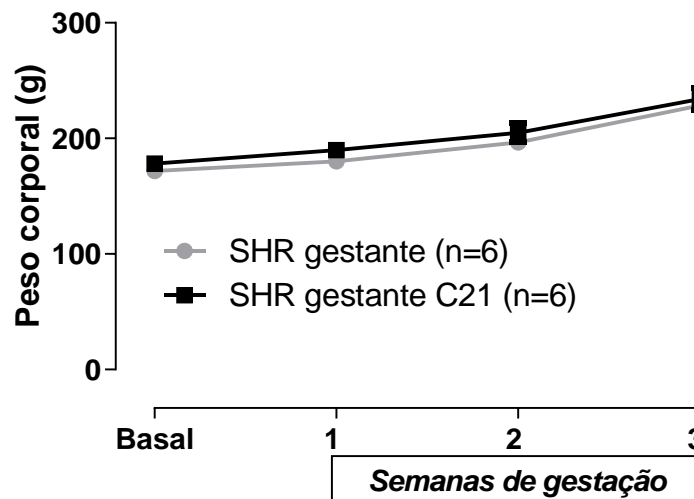


Figura 12. Valores do peso corporal das fêmeas e machos utilizados para reprodução. Os valores foram obtidos semanalmente. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por *Two Way ANOVA* seguido pelo pós teste de Sidak de múltiplas comparações.

O peso dos animais ao nascer do grupo SHR C21 foi maior em comparação ao grupo controle (figura 13A). No entanto, os animais não apresentaram diferença no peso corporal a partir da primeira semana de vida (figura 13B). O tratamento não afetou o número de filhotes por ninhada (SHR $9,2 \pm 0,58$ vs. SHR C21 $10,2 \pm 0,58$).

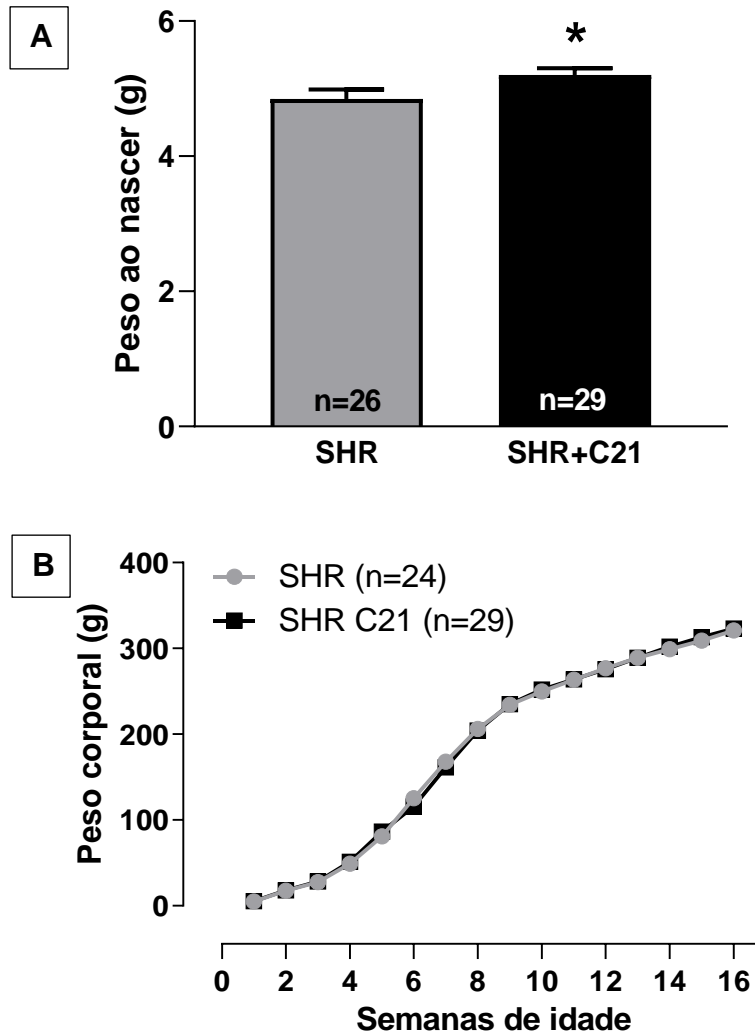


Figura 13. Valores do peso corporal da prole ao nascer e ao longo da vida. Peso dos animais no primeiro dia de vida (A) e semanalmente até as 16 semanas de idade (B). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste T de *student* não pareado (A) e *Two Way ANOVA* seguido pelo pós teste de Sidak de múltiplas comparações (B). * $P < 0,05$ vs. SHR.

4.3. Efeitos do tratamento materno com C21 na pressão arterial da prole

A pressão arterial sistólica e frequência cardíaca da prole foi aferida semanalmente a partir da sexta semana de idade até a décima sexta semana. A PAS foi

significativamente menor no grupo SHR C21 já na primeira semana avaliada, diferença que se manteve por todo o período experimental, até os animais completarem as 16 semanas (figura 14A).

Entretanto, a frequência cardíaca dos animais não foi diferente em resposta ao tratamento materno, como mostrado na figura 14B.

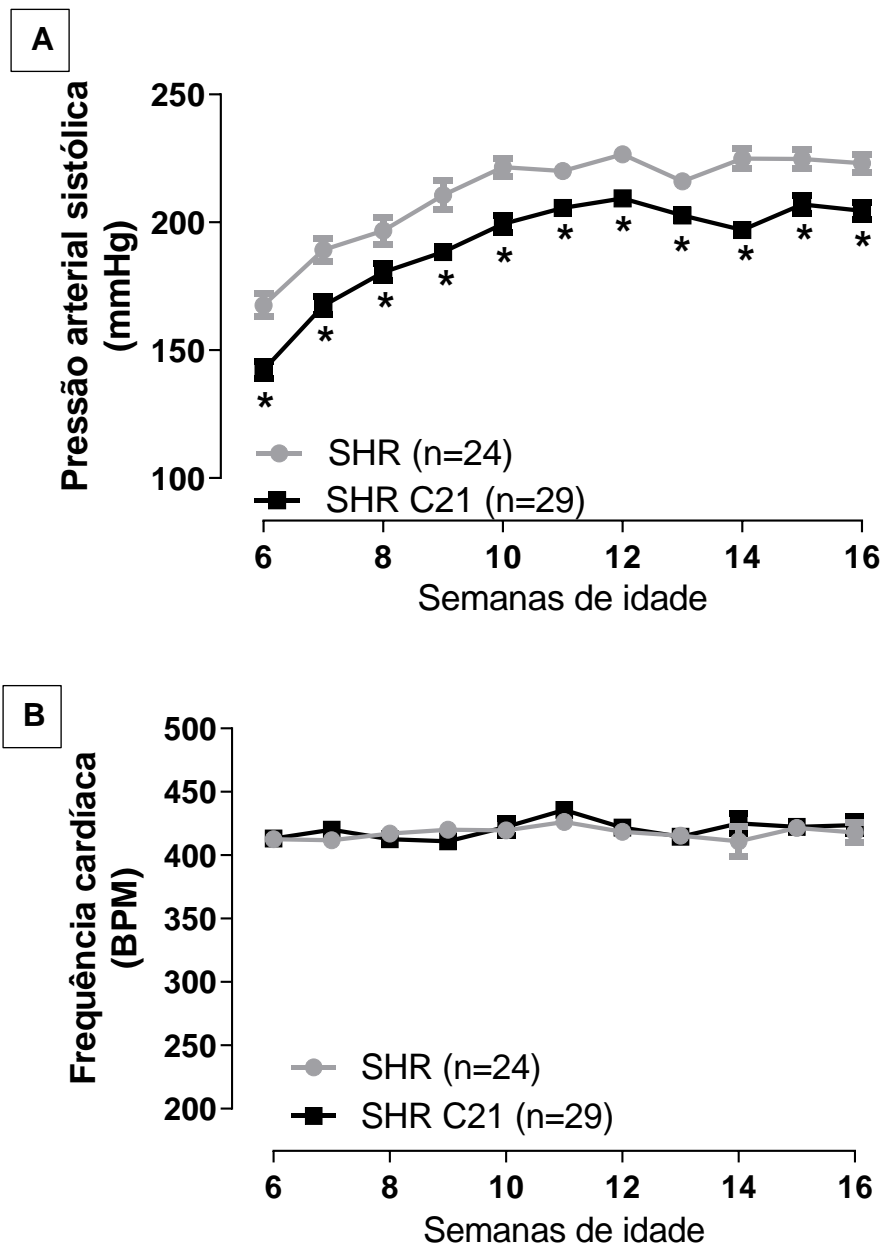


Figura 14. Valores da pressão arterial sistólica (A) e frequência cardíaca (B) da prole SHR e SHR C21. Os valores foram obtidos semanalmente por pletismografia de cauda. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por *Two Way ANOVA* seguido pelo pós teste de Sidak de múltiplas comparações. * $P < 0,05$ vs. SHR.

4.4. Efeitos do tratamento materno com C21 na resposta barorreflexa e quimiorreflexa

Para avaliar a resposta barorreflexa e quimiorreflexa, os animais foram submetidos à canulação de veia e artéria femoral e no dia seguinte foi feito o registro da atividade barorreflexa e quimiorreflexa. Os animais SHR C21 apresentaram maior sensibilidade barorreflexa (avaliada pela razão da variação da FC em resposta à alterações da pressão arterial) induzida por fenilefrina, em comparação ao grupo controle (figura 15A). No entanto, não houve diferença entre os grupos em resposta ao nitroprussiato de sódio (figura 15B).

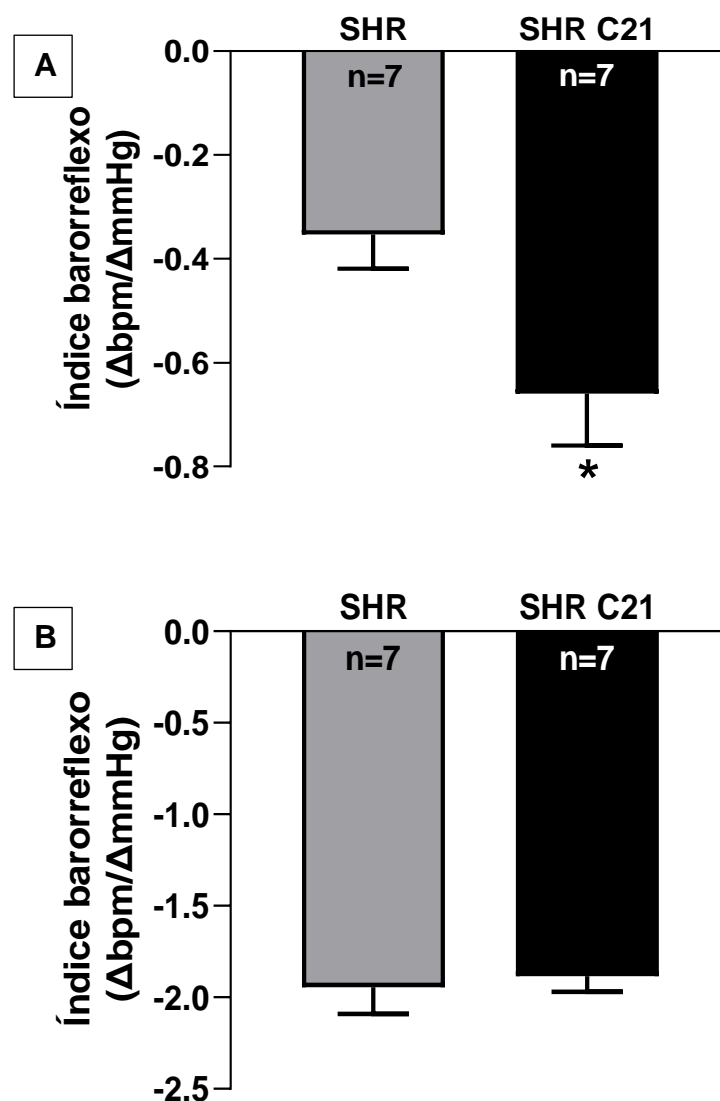


Figura 15. Resposta barorreflexa. Valores do índice barorreflexo induzido por fenilefrina (A) e nitroprussiato de sódio (B) da prole SHR e SHR C21 com 16 semanas de idade. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste T de *student* não pareado. *P<0,05 vs. SHR.

Além disso, avaliou-se também a sensibilidade quimiorreflexa pela variação da MAP (figura 16A) e da FC (figura 16B) induzida por cianeto de potássio. O tratamento materno com C21 não promoveu nenhuma diferença entre os grupos nesse parâmetro (figura 16).

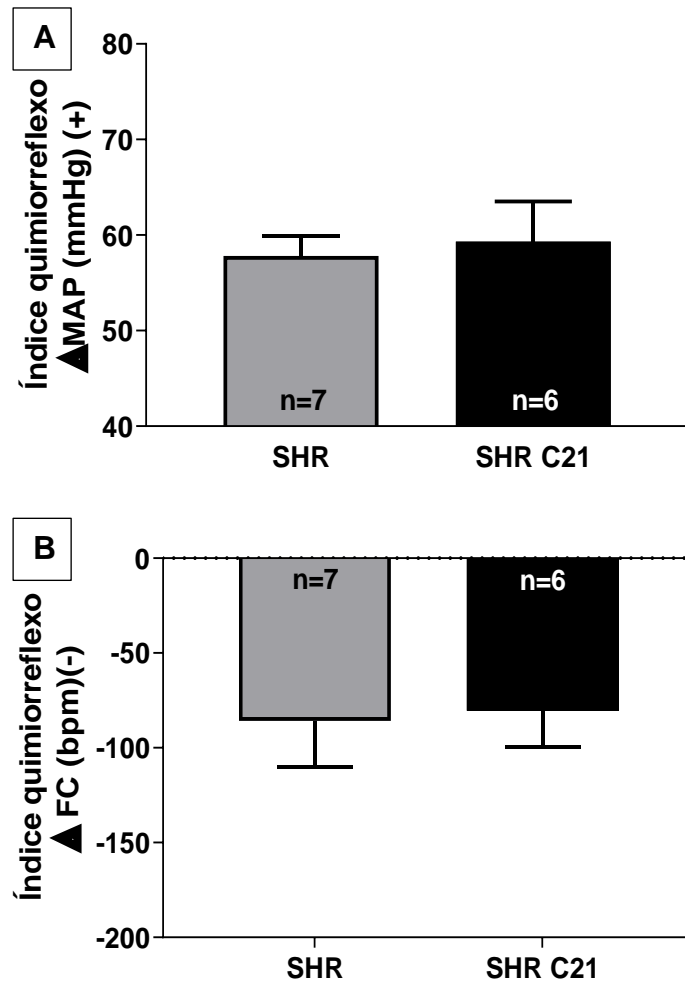


Figura 16. Resposta quimiorreflexa. Valores do índice quimiorreflexo induzido por cianeto de potássio da prole SHR e SHR C21 com 16 semanas de idade. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste T de *student* não pareado.

4.5. Efeitos do tratamento materno com C21 na função cardíaca

A análise ecocardiográfica da prole com 16 semanas demonstrou não haver diferenças significativas na morfologia ou na função cardíaca entre os grupos avaliados (tabela 4).

Tabela 5. Parâmetros avaliados pela ecocardiografia da prole de ratas hipertensas tratadas com C21.

Parâmetros	SHR (n=8)	SHR C21 (n=8)
SIVd (cm)	0.1938 ± 0.0090	0.2013 ± 0.0061
DIVEd (cm)	0.6888 ± 0.0269	0.6838 ± 0.0251
PPVEd (cm)	0.2063 ± 0.0065	0.2038 ± 0.0041
SIVs (cm)	0.2675 ± 0.0139	0.2763 ± 0.0113
DIVEs (cm)	0.4325 ± 0.0305	0.4288 ± 0.0368
PPVEs (cm)	0.2863 ± 0.0134	0.2850 ± 0.0096
VDF (ml)	0.7538 ± 0.0791	0.7438 ± 0.0728
VSF (ml)	0.2163 ± 0.0377	0.2200 ± 0.0486
FE (%)	72.90 ± 2.729	71.60 ± 4.532
Delta D (%)	37.66 ± 2.309	37.55 ± 3.917
VS (ml)	0.5425 ± 0.0438	0.5238 ± 0.0502
FC (bpm)	277.1 ± 12.88	268.9 ± 5.167

Os dados estão expressos em média ± erro padrão da média e analisados por teste T de *student* não pareado. SIVd, septo intraventricular na diástole; DIVEd, diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole; PPVEd, parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole; SIVs, septo intraventricular na sístole; DIVEs, diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole; PPVEs, parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole; VDF, volume diastólico final; VSF, volume sistólico final; FE, fração de ejeção; Delta D, fração de encurtamento pressão; VS, volume sistólico; FC, frequência cardíaca.

4.6. Efeitos do tratamento materno com C21 na recuperação pós-isquêmica e reatividade vascular coronariana em corações isolados

Embora não tenha sido observada alterações ecocardiográficas, os corações dos animais com 16 semanas de idade foram submetidos à técnica de coração isolado por pressão constante (Langendorff) para avaliar a resposta à um insulto isquêmico. Os parâmetros basais (pré-isquemia) dos corações isolados estão apresentados na tabela 5. Os animais do grupo SHR C21 apresentaram menor FC basal. Os parâmetros de contratilidade (PIVS, PIVD, dP/dt max e dP/dt min) e fluxo coronariano não foram diferentes entre os grupos.

Tabela 6. Parâmetros basais da função ventricular esquerda em corações isolados da prole de ratas hipertensas tratadas com C21.

Parâmetros	SHR (n=6)	SHR C21 (n=6)
PIVS	84.75 ± 3.803	93.80 ± 7.222
PIVD	9.907 ± 0.782	9.698 ± 0.968
dP/dt max	1860 ± 108.5	2176 ± 200.1
dP/dt min	1202 ± 83.65	1491 ± 134.5
FC	258.6 ± 4.433	245.5 ± 5.070*
Fluxo	20.64 ± 0.210	20.50 ± 0.267

Os dados estão expressos em média ± erro padrão da média e analisados por teste T de *student* não pareado. *P<0,05 vs. SHR. PIVS, pressão intraventricular sistólica; PIVD, pressão intraventricular diastólica; FC, frequência cardíaca.

Além disso, também não foram observadas alterações na PIVS, PIVD, dP/dt max, dP/dt min, FC e fluxo coronariano (figuras 17-20) durante ou após a isquemia.

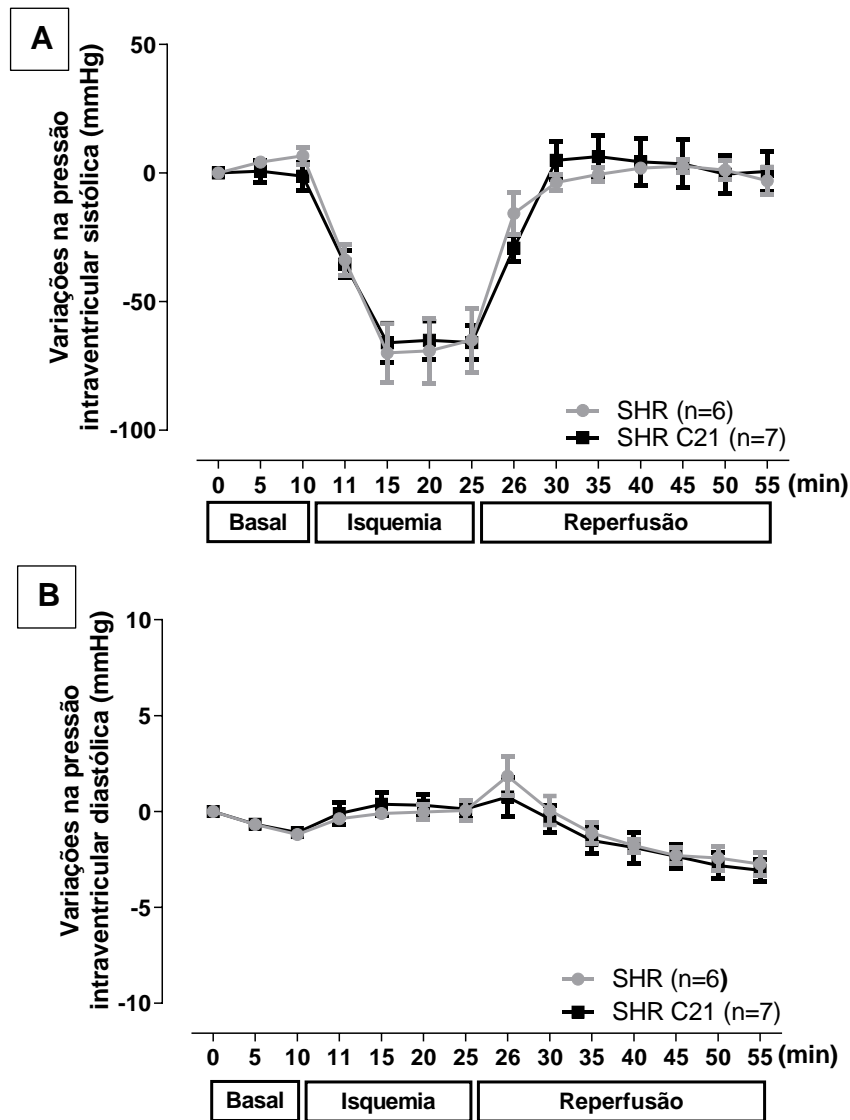


Figura 17. Variações na pressão intraventricular sistólica (A) e diastólica (B) avaliadas por meio do coração isolado (Técnica de Langendorff) da prole de SHR e SHR C21. Esses valores foram obtidos quando os animais completaram 16 semanas de idade. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por *Two Way ANOVA* seguido pelo pós teste de Sidak de múltiplas comparações.

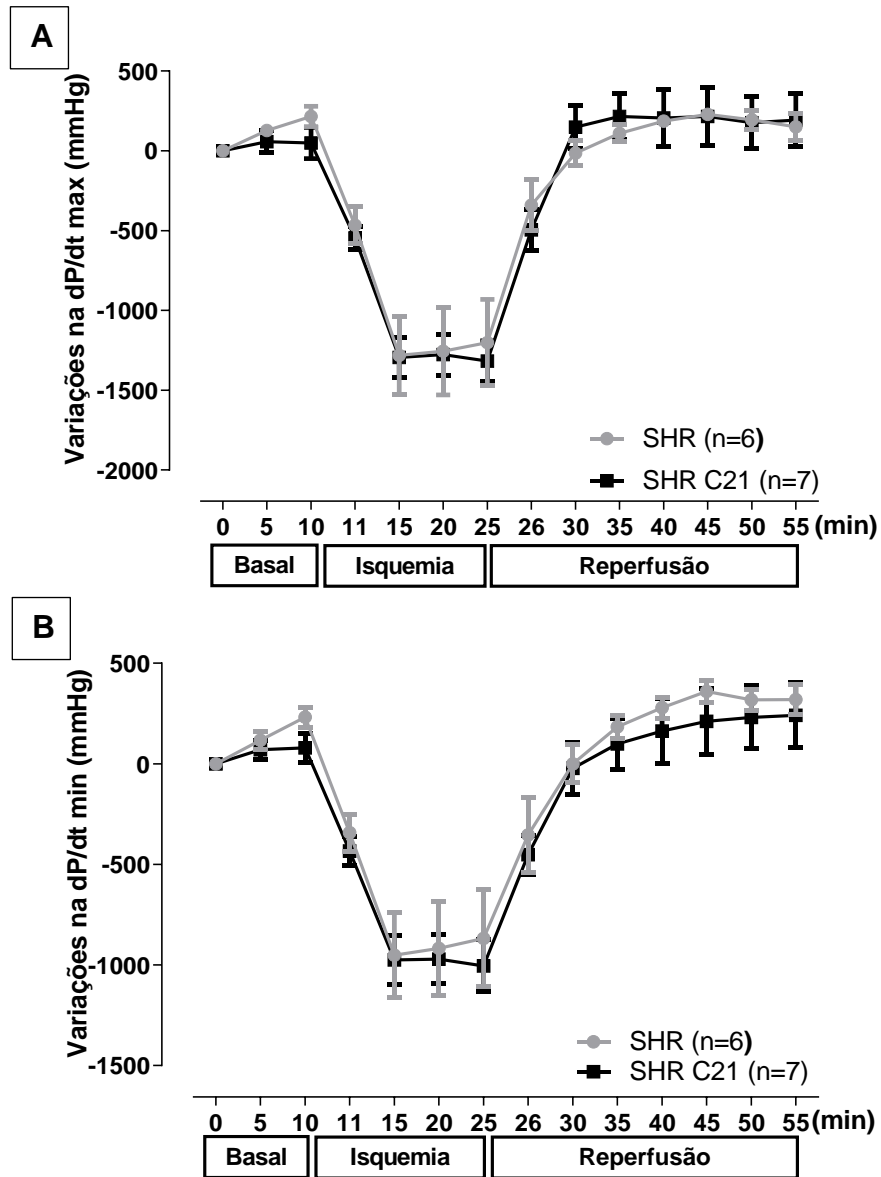


Figura 18. Variações na dP/dt max (A) e dP/dt min (B) avaliadas por meio do coração isolado (Técnica de Langendorff) da prole de SHR e SHR C21. Esses valores foram obtidos quando os animais completaram 16 semanas de idade. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por *Two Way ANOVA* seguido pelo pós teste de Sidak de múltiplas comparações.

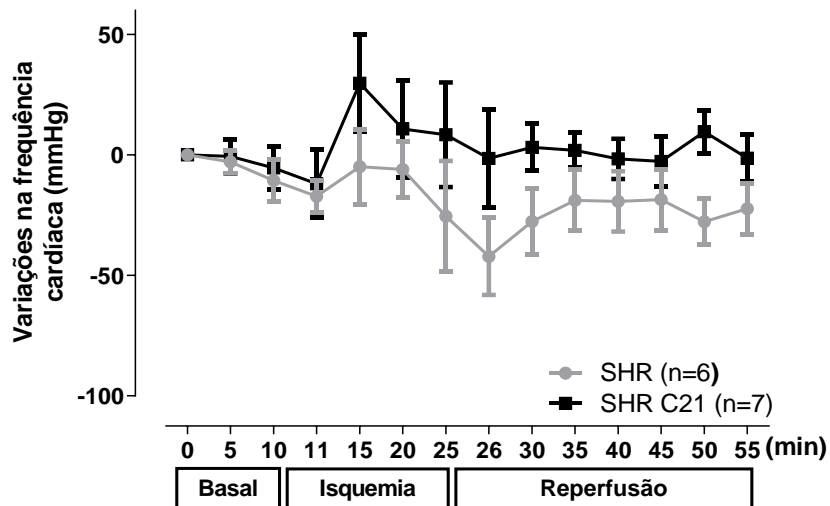


Figura 19. Variações na frequência cardíaca avaliada por meio do coração isolado (Técnica de Langendorff) da prole de SHR e SHR C21. Esses valores foram obtidos quando os animais completaram 16 semanas de idade. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por *Two Way ANOVA* seguido pelo pós teste de Sidak de múltiplas comparações.

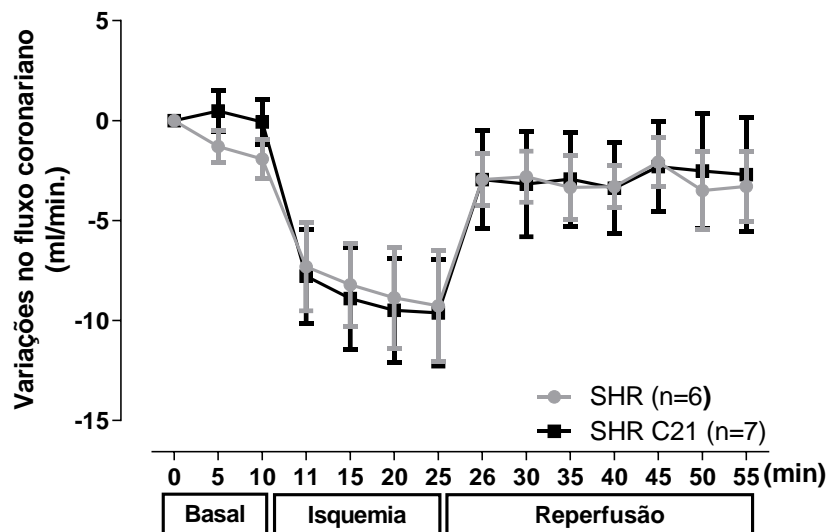


Figura 20. Variações no fluxo coronariano avaliada por meio do coração isolado (Técnica de Langendorff) da prole de SHR e SHR C21. Esses valores foram obtidos quando os animais completaram 16 semanas de idade. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por *Two Way ANOVA* seguido pelo pós teste de Sidak de múltiplas comparações.

Além dos parâmetros de função cardíaca, também foi avaliado o tempo de fibrilação ocorrida após a liberação do fluxo coronariano. Os animais SHR C21 apresentaram menor tempo de fibrilação comparado aos corações dos animais não tratados (figura 21).

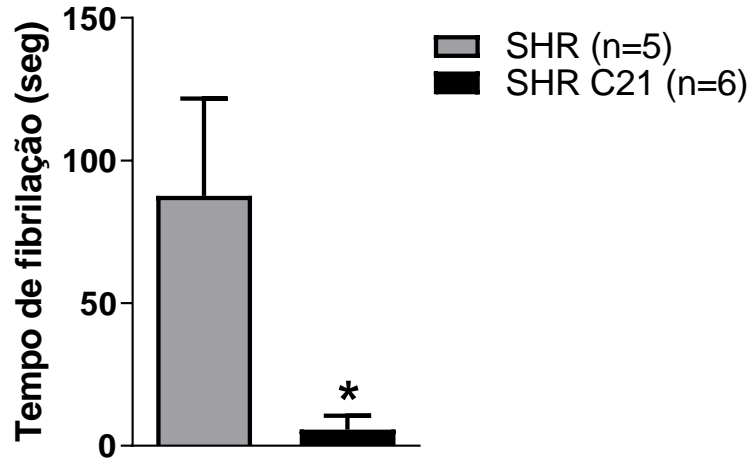


Figura 21. Tempo de fibrilação avaliado por meio do coração isolado (Técnica de Langendorff) da prole de SHR e SHR C21. Esses valores foram obtidos quando os animais completaram 16 semanas de idade. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste T de *student* não pareado. *P<0,05 vs SHR.

Em outro grupo de animais, os corações foram submetidos ao protocolo de fluxo constante para avaliar a vasodilatação coronariana em resposta à bradicinina. Os corações dos animais não apresentaram diferença na pressão de perfusão basal (figura 22A), mas os animais do grupo SHR C21 apresentaram maior redução da pressão de perfusão indicando melhora da vasodilatação vascular coronariana induzida pela bradicinina, como indicado na figura 22B.

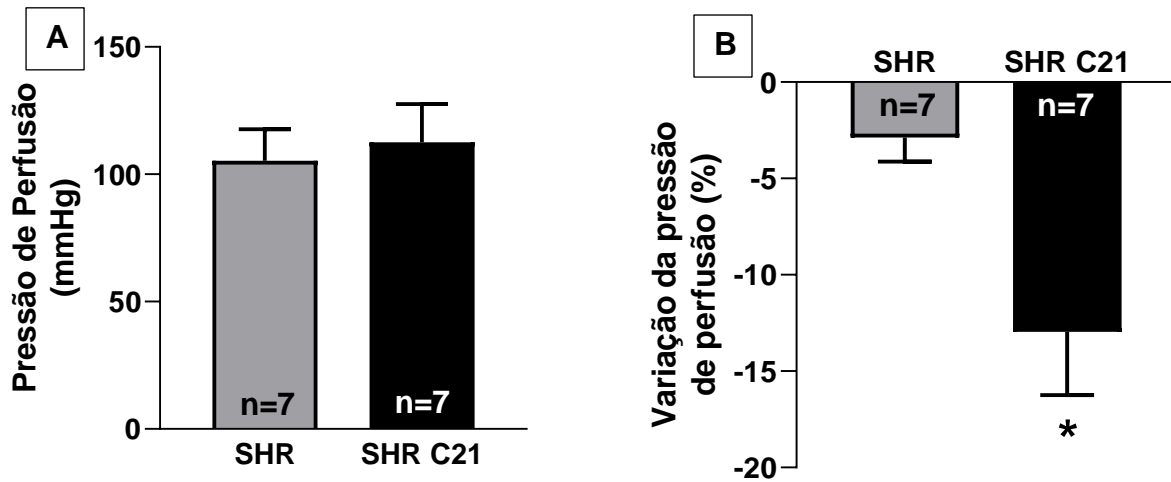


Figura 22. Pressão de perfusão basal (A) e variação da pressão de perfusão (B) avaliada por meio do coração isolado (Técnica de Langendorff) em resposta a infusão de bradicinina (10^{-5} mol/L) da prole de SHR e SHR C21. Esses valores foram obtidos quando os animais completaram 16 semanas de idade. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste T de *student* não pareado. * $P < 0,05$ vs SHR.

4.7. Efeitos do tratamento materno com C21 na reatividade vascular aórtica

Os anéis de aorta dos animais foram submetidos a protocolos de relaxamento e constrição com ou sem o endotélio preservado. O gráfico 23 indica que não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao relaxamento dependente (figura 23A) ou independente (figura 23B) de endotélio induzido por concentrações crescentes de acetilcolina ou nitroprussiato de sódio, respectivamente.

A constrição em vasos com endotélio preservado (figura 23C) ou retirado (figura 23D) avaliada por meio da administração de doses crescentes de fenilefrina também não foi diferente entre o grupo SHR C21 e SHR.

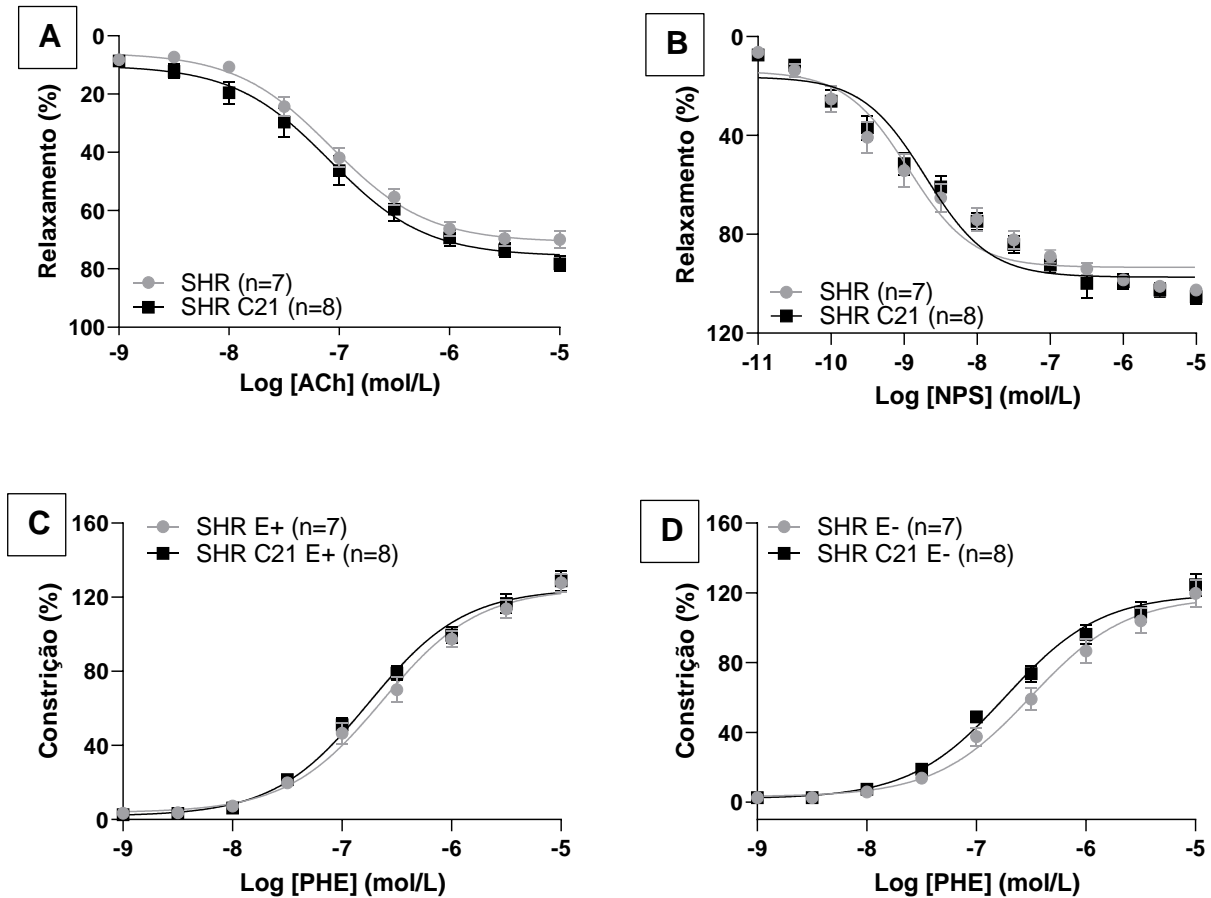


Figura 23. Reatividade vascular aórtica. Vasorrelaxamento de anéis de aorta torácica induzido por ACh em vasos com endotélio preservado (A) e NPS para vasos com o endotélio retirado (B). Os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina. Vasoconstrição induzidos por fenilefrina em vasos com endotélio preservado (C) e endotélio removido (D) da prole de SHR e SHR C21. Esses valores foram obtidos quando os animais completaram 16 semanas de idade. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por *Two Way ANOVA* seguido pelo pós teste de Sidak.

4.8. Efeitos do tratamento materno com C21 na hipertrofia e fibrose cardíaca

Os ventrículos esquerdos dos animais foram coletados e utilizados para avaliação histológica. Os animais do grupo SHR C21 apresentaram a área de cardiomiócitos significativamente menor em comparação ao grupo controle (figura 24A-C).

A deposição de colágenos intersticiais e perivasculares foram avaliados nos ventrículos esquerdos dos animais com 16 semanas de idade por coloração de tricrômico de Masson. Os animais do grupo SHR C21 apresentaram redução da deposição tanto de colágenos intersticiais (figura 24D-F) quanto de colágenos perivasculares (figura 24G-I).

Esses resultados indicam que o tratamento materno com C21 promoveu redução da fibrose no ventrículo esquerdo dos filhos adultos.

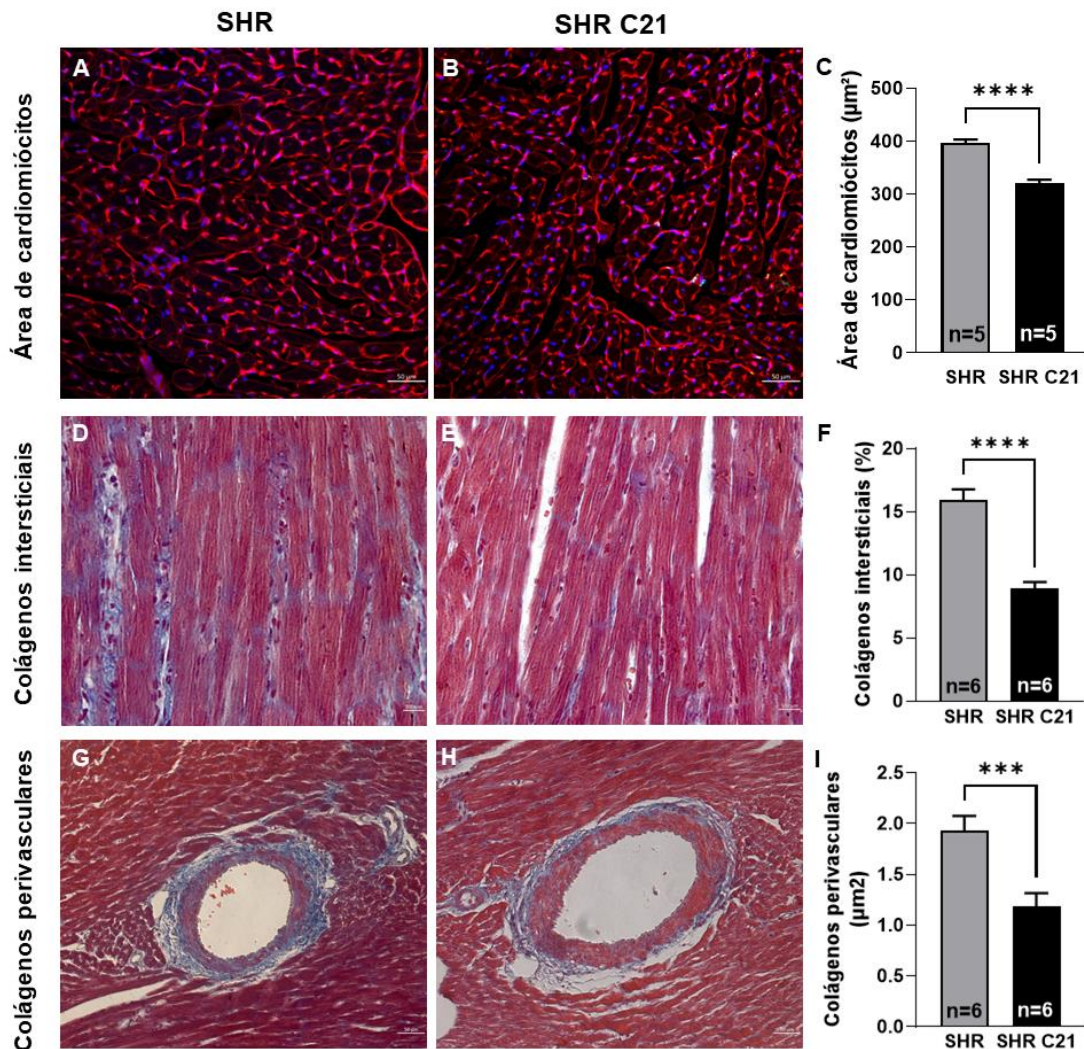


Figura 24. Remodelamento cardíaco. Área de cardiomiócitos da prole de SHR e SHR C21. Imagens representativas de imunofluorescência com marcação da membrana celular por WGA e núcleo celular por DAPI (A: SHR e B: SHR C21), e quantificação da área de cardiomiócitos (C) com magnificação de 20x. Colágenos intersticiais e perivasculares da prole de SHR e SHR C21. Imagens representativas da fibrose intersticial (D-E) e perivascular (G-H). Quantificação de colágenos intersticiais (F) e perivasculares (I) com magnificação de 20x. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. * $P < 0,0001$ vs. SHR.

4.9. Efeitos do tratamento materno com C21 na marcação de NFAT

Para avaliar mecanismos envolvidos na redução do remodelamento cardíaco patológico foi avaliada a marcação do NFAT no ventrículo esquerdo, representada na figura 25. Os animais SHR C21 apresentaram redução do NFAT total (C) e nuclear (D).

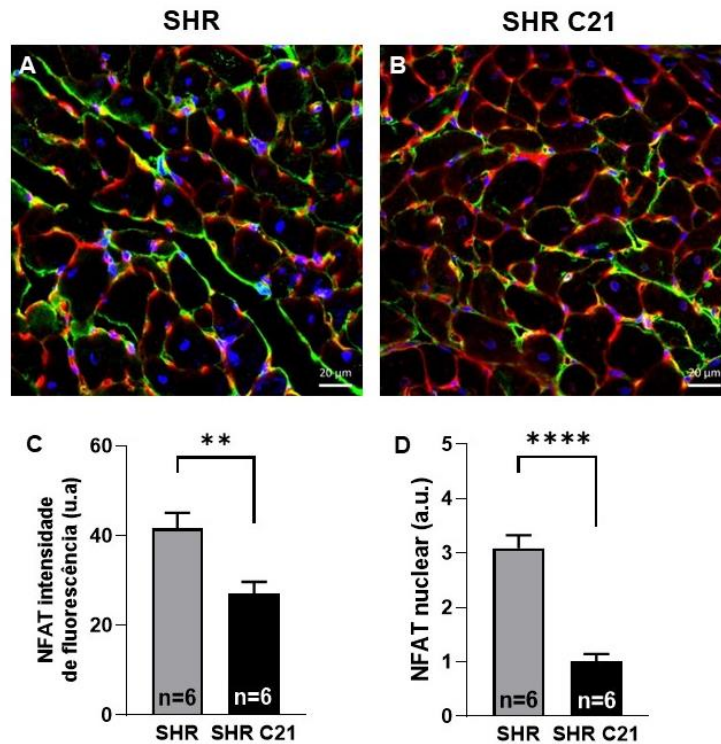


Figura 25. Marcação do NFAT no ventrículo esquerdo da prole de SHR e SHR C21 por imunofluorescência. Imagens representativas (A-B) e quantificação do NFAT total (C) e nuclear (D) 40x. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. * $P < 0,05$ vs. SHR.

4.10. Efeitos do tratamento materno com C21 na expressão de proteínas no tecido cardíaco

Para avaliação de proteínas no tecido cardíaco, foi realizada a técnica de *western blotting*. A figura 26 mostra a expressão de proteínas dos receptores AT1 e AT2 da angiotensina II, porém não foram alterados pelo tratamento materno.

Além disso, avaliou-se ainda a expressão de proteínas envolvidas em vias de sinalização associadas à hipertrofia e fibrose cardíacas. A expressão de proteínas da AKT fosforilada (Ser 473) e AKT Total foram avaliadas (figura 27). No entanto, nenhuma diferença na expressão dessa proteína foi identificada entre os grupos. A expressão da SERCA2

também não foi diferente entre os grupos avaliados (figura 28). O tecido cardíaco da prole em que as mães receberam tratamento com C21 também não apresentou alteração na expressão da pERK 1/2 e ERK total (figura 29). Avaliou-se ainda a expressão de proteínas da catalase, uma enzima antioxidante, porém sua expressão também não foi diferente entre os grupos (figura 30).

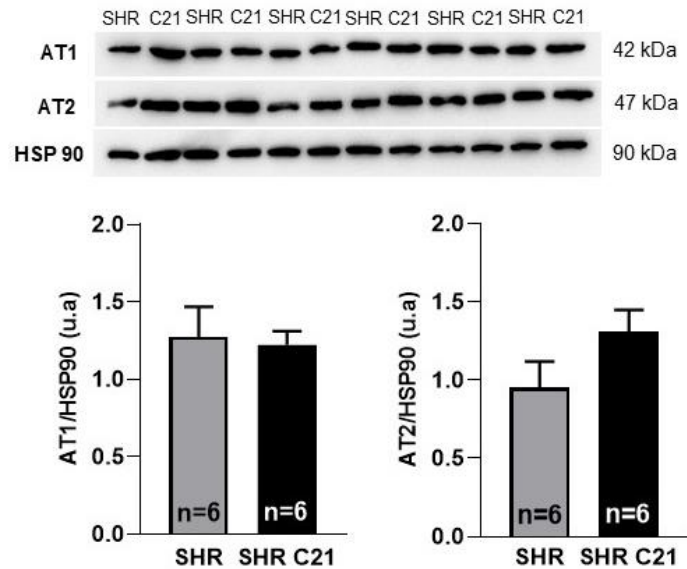


Figura 26. Expressão de proteínas dos receptores AT1 e AT2 no tecido cardíaco da prole de SHR e SHR C21 avaliadas por *western blotting*. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. Todas as proteínas foram normalizadas pela densidade da HSP90.

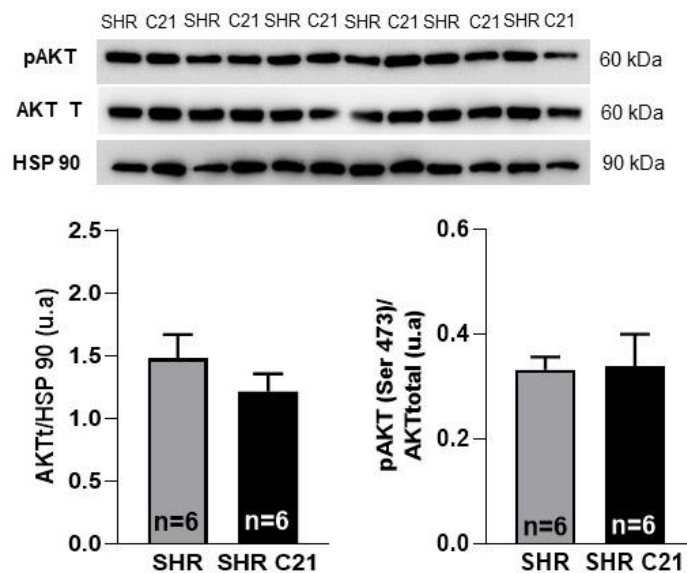


Figura 27. Expressão de proteínas da AKT fosforilada e AKT total no tecido cardíaco da prole de SHR e SHR C21 avaliadas por *western blotting*. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. Todas as proteínas foram normalizadas pela densidade da HSP90.

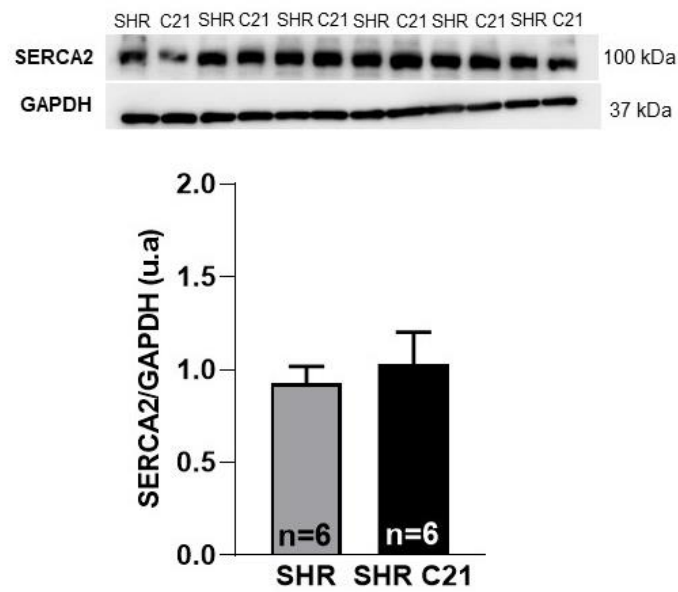


Figura 28. Expressão de proteínas da SERCA2 no tecido cardíaco da prole de SHR e SHR C21 avaliadas por *western blotting*. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. Todas as proteínas foram normalizadas pela densidade da HSP90.

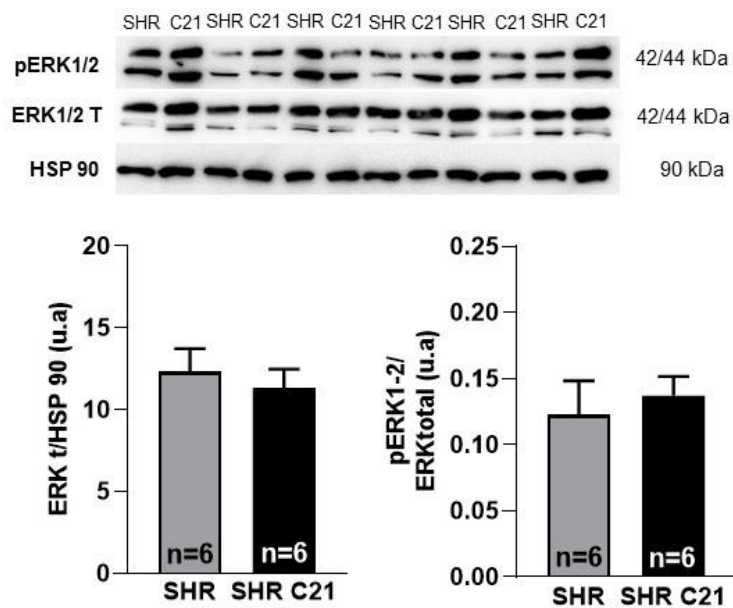


Figura 29. Expressão de proteínas da ERK 1-2 fosforilada e ERK total no tecido cardíaco da prole de SHR e SHR C21 avaliadas por *western blotting*. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. Todas as proteínas foram normalizadas pela densidade da HSP90.

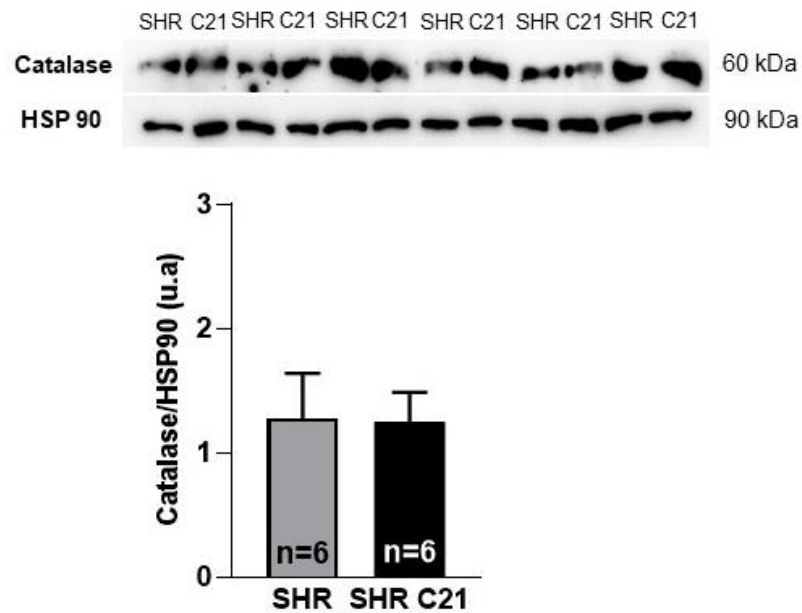


Figura 30. Expressão de proteínas da catalase no tecido cardíaco da prole de SHR e SHR C21 avaliadas por *western blotting*. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. Todas as proteínas foram normalizadas pela densidade da HSP90.

4.11. Efeitos do tratamento materno com C21 na expressão de proteínas da MMP-2 e atividade de MMPs no tecido cardíaco

Além disso, avaliou-se a expressão de proteínas da MMP-2 que não foi alterada pelo tratamento materno (figura 31). Então foi avaliado também a atividade de Pró MMP (figura 32B), MMP-9 (figura 32C) e MMP-2 (figura 32D), como indicado na figura 32. No entanto, nenhuma diferença estatística foi identificada entre os grupos.

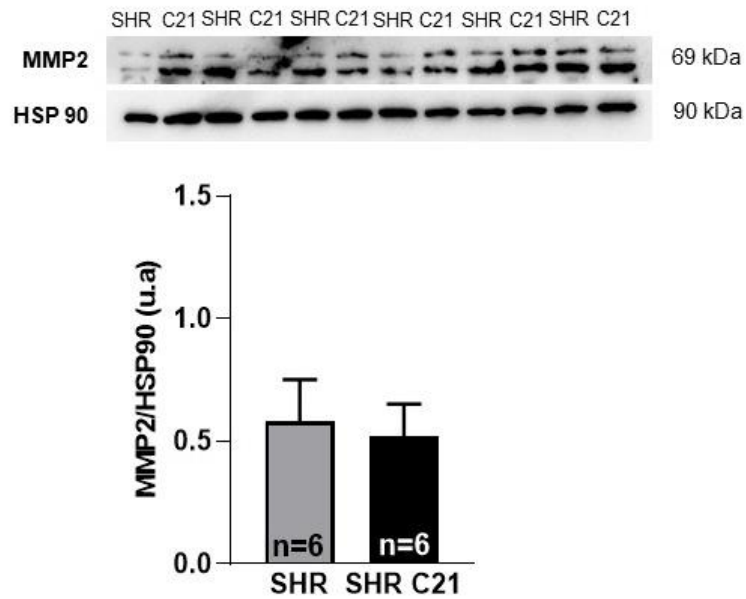


Figura 31. Expressão de proteínas da MMP2 no tecido cardíaco da prole de SHR e SHR C21 avaliadas por *western blotting*. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado. Todas as proteínas foram normalizadas pela densidade da HSP90.

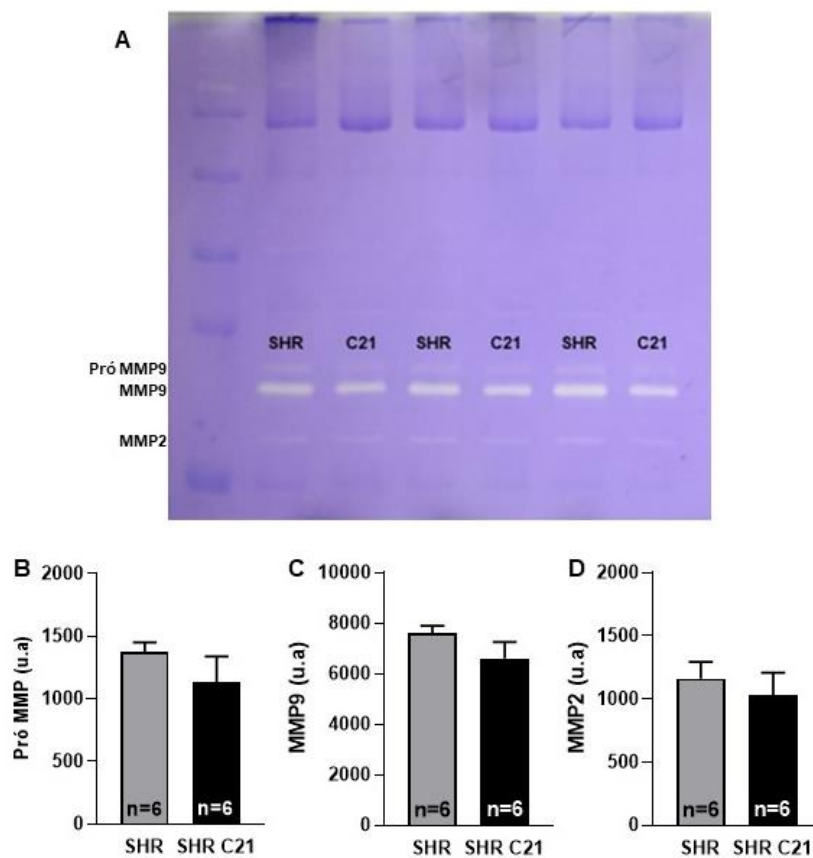


Figura 32. Atividade de MMPs no tecido cardíaco da prole de SHR e SHR C21 avaliadas por zimografia. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média e analisados por teste t de *student* não pareado.

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados desse estudo indicam que o tratamento materno com o Composto 21 durante a gestação de ratas hipertensas promoveu redução da pressão arterial dos filhos, com melhora da sensibilidade barorreflexa, melhora da reatividade vascular coronariana e redução das arritmias de reperfusão. Além disso, a prole C21 apresentou redução da hipertrofia e fibrose do ventrículo esquerdo.

Dados recentes publicados por nosso grupo (Bessa et al., 2019) demonstraram que os filhos de ratas hipertensas tratadas com o DIZE, um ativador da ECA2 ou diretamente com Ang-(1-7) durante a gestação apresentaram melhora em diversos parâmetros cardiovasculares. Foi observado que a PAS da prole foi reduzida, com melhora da reatividade coronariana e atenuação do remodelamento cardíaco patológico. Além disso, Care e colaboradores (2016) mostraram que a suplementação materna de SHR com resveratrol durante a gestação preveniu o desenvolvimento da hipertensão na prole associada à melhora da biodisponibilidade de NO (Care et al., 2016). Desta forma, o tratamento materno com substâncias cardioprotetoras emerge como uma estratégia importante para atenuar ou prevenir o desenvolvimento de DCVs nos filhos. No entanto, ainda são poucos os trabalhos que avaliaram os efeitos da exposição materna a fatores considerados benéficos, como forma de atenuar ou prevenir o desenvolvimento de doenças nos filhos.

Para a realização do estudo, utilizamos animais espontaneamente hipertensos, modelo de hipertensão essencial amplamente utilizado, devido à semelhança com a hipertensão humana e ao fator genético (Trippodo and Frohlich, 1981). Sendo assim, uma vez que a hipertensão é hereditária nessa linhagem, seria possível avaliar os efeitos do tratamento materno com C21 no desenvolvimento da doença na prole. No presente estudo, foi observado que os animais com 6 semanas de idade já apresentaram pressão arterial elevada, contudo o grupo SHR C21 apresentou uma atenuação dos valores pressóricos comparado ao grupo controle. Estudos anteriores já identificaram que o C21 promove redução da pressão arterial em alguns modelos de hipertensão (Dopona et al., 2018; Kemp et al., 2022). O tratamento com C21, entre a 7^a e 18^a semanas de idade, reduziu a PA em modelo de hipertensão induzido por alto consumo de sódio (Dopona et al., 2018). Além disso, a administração de C21 sistêmica e intrarenal por 7 dias também reduziu a PA, associada a maior excreção de sódio em ratas com hipertensão induzida por Ang II (Kemp

et al., 2022). No entanto, deve-se ressaltar que o tratamento com C21 (i.p) por 1 ou 4 semanas não apresentou efeito anti-hipertensivo em um modelo de hipertensão induzido por infusão de Ang II (Castoldi et al., 2021b), sugerindo que a resposta pressórica depende da forma de tratamento e do modelo animal utilizado.

Sabe-se que a disfunção endotelial está associada à HAS, inclusive em SHR (Bernatova et al., 2009). A disfunção endotelial é caracterizada pelo desequilíbrio entre os fatores vasoconstritores e vasorrelaxadores derivados do endotélio, especialmente com alterações na biodisponibilidade de NO (Konukoglu and Uzun, 2017). Assim, um dos principais fatores que poderia ter contribuído para a redução da PA nos animais tratados com C21 seria a melhora da função endotelial sistêmica. No entanto, não foram identificadas alterações na reatividade vascular aórtica entre os grupos, sugerindo que não houve melhora na função endotelial deste vaso no grupo tratado com C21. Porém, houve aumento da vasodilatação induzida por bradicinina na circulação coronariana, sugerindo que houve uma melhora da função endotelial nesse leito vascular. Estudos anteriores já demonstraram efeitos vasoativos divergentes em diferentes tipos de leitos vasculares (Hill et al., 2001). Isso pode ocorrer devido às particularidades morfofuncionais dos vasos, considerando que vasos de condutância apresentam paredes mais elásticas que se adaptam a grandes oscilações do fluxo sanguíneo, como é o caso da aorta enquanto os vasos de resistência possuem menor calibre e camada muscular mais desenvolvida para regulação do tônus e distribuição de sangue para os tecidos (Pugsley and Tabrizchi, 2000). Além disso, podem haver diferenças nas vias predominantes envolvidas no relaxamento a depender do leito vascular, pois em vasos de condutância o relaxamento se deve à ativação de NO-GMPc e, em vasos de resistência envolve principalmente fatores de hiperpolarização derivados do endotélio (Garland et al., 1995). Desta forma, a diferença entre os resultados obtidos pode ser explicada pelos tipos de leito vascular avaliados, considerando que a aorta é um vaso de condutância e a circulação coronariana engloba vasos de resistência. Com isso, a redução da pressão no grupo SHR C21 pode ter ocorrido, ao menos em parte, devido a uma possível melhora da função endotelial de vasos de resistência, apesar de não ter sido avaliado a reatividade vascular em vasos de resistência sistêmicos, como a mesentérica, por exemplo.

A melhora da função endotelial pode estar associada à maior biodisponibilidade de NO. Estudos anteriores também apontaram que alguns tratamentos nas mães durante a gestação contribuíram para o controle da PA da prole mediados pelo aumento da biodisponibilidade de NO (Racasan et al., 2005). As fêmeas, mas não os machos, da prole

de ratas hipertensas tratadas com tetranitrato de pentaeritritol (combinação de antioxidante com estimulantes de NO) apresentaram redução da PAS, associada ao aumento da síntese de NO (Wu et al., 2015). A prevenção do desenvolvimento da hipertensão e aumento de NO, também foram identificados na prole de ratas hipertensas tratadas com resveratrol na gestação (Care et al., 2016). O tratamento de SHRs gestantes com citrulina do 7º dia de gestação até a 6ª semana de idade da prole promoveram aumento da biodisponibilidade de NO nos filhos, associados a redução da PA (Koeners et al., 2007). Racasan e colaboradores mostraram também que o tratamento de ratas hipertensas na gestação, com outro precursor do NO, a L-arginina mais antioxidantes como a vitamina C, vitamina E e taurina promoveram redução da PA dos filhos, com aumento de NO e redução de estresse oxidativo (Racasan et al., 2004). Estudos anteriores demonstraram ainda que o C21 promove aumento na liberação de NO (Peluso et al., 2023), incluindo em modelo de obesidade que desenvolve disfunção endotelial (González-Blázquez et al., 2021).

Além da disfunção endotelial, a sensibilidade barorreflexa também está intimamente associada à HAS (Honzíková and Fišer, 2009). É amplamente conhecido que o SRA apresenta um papel modulador do sistema nervoso autônomo e conseqüentemente da atividade barorreflexa e quimiorreflexa (Krum, 2001). A Ang II está envolvida na resposta barorreflexa por meio da expressão do receptor AT1 na área postrema e principalmente no núcleo do trato solitário (NTS) (Casto and Phillips, 1986; Healy and Zhang, 1992). O aumento da resposta pressora induzida por Ang II promoveu leve alteração na FC e microinjeções de candesartan no NTS medial restaurou a bradicardia em resposta ao aumento da PA (Tan et al., 2007). Em animais que receberam dieta hiperlipídica, o bloqueio do receptor AT1 no NTS reduziu a PA e restaurou a bradicardia, e a superexpressão do AT2 melhorou a resposta barorreflexa dos animais (Ruchaya et al., 2016). Trabalhos prévios já mostraram que a hiperativação do receptor AT1 causa prejuízo da resposta barorreflexa, bem como a importância do receptor AT2 na modulação barorreflexa (Blanch et al., 2014; Luoh and Chan, 1998). O aumento da expressão do receptor AT2 no complexo solitário-vagal (núcleo do trato solitário – núcleo motor dorsal do vago) atenuou a hipertensão com melhora da sensibilidade barorreflexa em modelo de hipertensão renovascular (Blanch et al., 2014). Em SHR, o aumento da expressão do AT2 no NTS e núcleo motor dorsal do vago restaurou a bradicardia prejudicada nesse modelo apesar de não ter promovido efeitos na PAM (Ruchaya et al., 2016). Esses conjuntos de dados corroboram com nossos resultados, em

que os animais do grupo SHR C21 apresentaram aumento da sensibilidade barorreflexa induzida por fenilefrina, sugerindo melhora do componente parassimpático desses animais.

Uma das principais consequências da hipertensão é o remodelamento cardíaco e pode ser observado na linhagem SHR (González et al., 2018). Observamos que os animais SHR C21 apresentaram redução da hipertrofia do ventrículo esquerdo e da deposição de colágenos perivascular e intersticial. Esse efeito pode ter sido em parte, decorrente da redução da pressão arterial. No entanto, não podemos descartar que a redução da hipertrofia pode ter ocorrido de forma independente da pressão arterial, assim como já foi mostrado por trabalhos prévios, a clara dissociação entre efeitos anti-hipertroficantes e pressão arterial (De Almeida et al., 2015; Grobe et al., 2007). Castoldi e colaboradores (2021) identificaram que o tratamento com C21 promoveu redução da hipertrofia (apenas em animais tratados por 4 semanas) e da fibrose em modelo animal de hipertensão induzida por Ang II (Castoldi et al., 2021a). Nesse estudo, a redução da hipertrofia foi associada a redução da atividade simpática e independente da pressão, considerando que os animais tratados com C21 não apresentaram redução da PA. Além disso, a redução da fibrose nesse estudo foi associada a redução da inflamação, corroborando com estudos prévios que mostraram o papel do AT2 na redução da inflamação (Sumners et al., 2019a). Foi demonstrado em cultura de células endoteliais umbilicais humana (HUVECs) que o C21 reduziu TNF- α , aboliu a produção de EROs, atenuou a adesão leucocitária e reduziu marcadores inflamatórios estimulados pela dieta rica em gordura (Ismael and Ishrat, 2022). Em animais com traumatismo craniano o tratamento com C21 reduziu marcadores inflamatórios (IL-1 β e TNF- α) (Ismael and Ishrat, 2022).

Kokubo e colaboradores (Kokubo et al., 2005) apontam que animais SHR desenvolvem hipertrofia com 4 semanas de idade, antes mesmo da hipertensão devido ao aumento da atividade simpática. A ativação simpática está associada também ao desenvolvimento da fibrose (Ramos-Mondragón et al., 2008). Animais de um modelo de insuficiência cardíaca induzidos pela ligadura da artéria coronária que passaram por denervação simpática cardíaca apresentaram redução da fibrose cardíaca independente de alterações pressóricas (Wang et al., 2014). Com isso, o tratamento materno com C21 pode ter melhorado o remodelamento cardíaco patológico tanto por meio da redução da atividade simpática e como por redução da PA.

A proteína quinase B (AKT) está relacionada às vias de sinalização que regula o crescimento e sobrevivência celular (Kim et al., 2003). No entanto, a sua expressão não foi

alterada no coração da prole das ratas tratadas com C21. De acordo com estes achados, foi observado que o tratamento com valsartana reverteu a hipertrofia em SHR sem alteração na expressão da AKT (Chang et al., 2015). A AKT pode ainda influenciar na expressão da ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA) 2 (Kim et al., 2003), que também não foi alterada pelo tratamento materno com C21. Além disso, sabe-se que a Ang II via AT1 pode estimular proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), como por exemplo, as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), envolvidas no remodelamento cardíaco (Mehta and Griendling, 2007). Quiroga e colaboradores (Quiroga et al., 2023) mostraram que o AT2 promove fosforilação da AKT e ERK1/2 no coração, por meio da injeção de C21. A participação da AKT e ERK1/2 em ações mediadas por AT2 já foram indicadas por meio da melhora da sinalização da insulina (Dominici et al., 2020), síntese de NO (Peluso et al., 2018) e redução da fibrose (Sumners et al., 2019b), apesar de não ser conhecido ainda como essa interação ocorre. Porém, nesse estudo não houve diferença na expressão de proteínas da AKT ou ERK1/2 entre os grupos com a ativação do AT2. Como identificamos ainda a redução da fibrose no grupo C21, avaliamos a expressão da metaloproteinase 2 (MMP-2), importante enzima envolvida na degradação de proteínas de matriz extracelular, especialmente colágenos. Alterações da expressão ou atividade da MMP-2 tem sido associada a condições patológicas, como a hipertensão, associada ao desenvolvimento da fibrose cardíaca (Odenbach et al., 2011). No entanto, neste estudo, avaliamos a expressão dessa enzima no tecido cardíaco, bem como a atividade das MMP-2 e MMP-9, porém não houve diferença entre os grupos. Estes dados podem sugerir que a redução da hipertrofia no grupo experimental tenha ocorrido devido à redução de atividade de fibroblastos, contribuindo para a redução de colágeno, independente da atividade ou expressão de metaloproteinases.

O NFAT é um fator de transcrição nuclear e está envolvido no remodelamento cardíaco patológico. A Ang II via AT1 pode ativar a via de sinalização do NFAT estimulando sua translocação para o núcleo e conseqüentemente promovendo hipertrofia patológica (Wilkins et al., 2004). Neste estudo, foi observado uma redução na expressão nuclear deste fator nos cardiomiócitos do grupo SHR C21. Não há ainda estudos prévios que avaliaram a expressão do NFAT (e sua via “*upstream*”) em resposta da ativação do AT2 com C21. Desta forma, maiores estudos ainda são necessários para avaliar a via de ligação entre a ativação do AT2 pelo C21 e a inibição da translocação nuclear do NFAT.

A função cardíaca dos animais não foi alterada pelo tratamento materno com C21. No entanto, é importante ressaltar que a idade dos animais utilizados no estudo ainda não apresentavam disfunção sistólica, ou seja, ainda estariam na fase compensada do remodelamento cardíaco (Kemp and Conte, 2012). A hipertrofia cardíaca patológica se desenvolve a princípio como um processo adaptativo, mantendo a fração de ejeção preservada. Posteriormente evolui para disfunção cardíaca, associadas a alterações dos níveis intracelulares de cálcio e de proteínas contráteis, com angiogênese prejudicada (Nakamura and Sadoshima, 2018). Há algumas divergências na literatura pois, segundo um estudo, SHRs com aproximadamente 8 semanas de idade apresentam disfunção sistólica (Kokubo et al., 2005), porém para Slama e colaboradores (Slama et al., 2004) esse modelo animal permanece com a função sistólica inalterada mesmo com o processo de envelhecimento.

Apesar do tratamento não ter promovido alterações na função cardíaca avaliadas pela ecocardiografia, submetemos o coração a técnica de coração isolado e ao insulto isquêmico. A FC basal do grupo SHR C21 foi reduzida, o que não havia sido identificado anteriormente *in vivo* pela ecocardiografia, sugerindo que essa resposta seja intrínseca ao coração. A função contrátil dos animais não foi alterada pelo tratamento, porém os animais do grupo SHR C21 apresentaram menor tempo de arritmias de reperfusão que os animais SHR. Já é descrito que os SHRs apresentam níveis elevados de ânion superóxido, o que pode promover alterações no transiente de cálcio no tecido cardíaco causando arritmias, além de alterações na biodisponibilidade de NO (Senoner and Dichtl, 2019). Ratos Zucker obesos que receberam dieta rica em sódio tratados com C21 por 14 dias apresentaram redução do estresse oxidativo renal (Patel et al., 2016). Desta forma, os animais do grupo C21 podem ter apresentado uma redução do estresse oxidativo, contribuindo para a redução do tempo de fibrilação. Essa resposta pode estar associada a melhora da reatividade coronariana induzida por bradicinina e redução da pressão arterial identificada no grupo tratado, sugerindo aumento da biodisponibilidade de NO. No entanto, outros experimentos seriam necessários para esclarecer a redução no tempo de fibrilação. Na literatura são escassos os estudos que investigaram a ativação do AT2 com C21 em resposta a isquemia ou infarto do miocárdio. Já foi descrito que a administração de C21 em animais submetidos a isquemia e reperfusão reduziu a área infartada, porém outros parâmetros não foram relatados (Ozhan et al., 2021).

Apesar dos SHRs representarem um modelo de hipertensão genética, há evidências que sugerem que há mecanismos epigenéticos envolvidos (Wu et al., 2015). Com base nos resultados obtidos neste estudo, os efeitos benéficos ao sistema cardiovascular dos filhos de mães hipertensas tratadas com C21 podem ter ocorrido via programação fetal por alterações epigenéticas. Essas alterações ocorrem nos padrões de metilação do DNA, acetilação e metilação das histonas ou ainda por microRNAs. Um dos locais onde essas alterações poderiam estar envolvidas é em regiões específicas como a do gene promotor do receptor AT1 promovendo sua menor expressão e conseqüentemente contribuindo para alguns dos efeitos cardioprotetores identificados. As alterações epigenéticas já foram identificadas em estudos anteriores em que os filhos de mães expostas a uma dieta rica em sacarose (Wu et al., 2016) ou ao sulfeto de hidrogênio (Guo et al., 2017) apresentaram hipometilação da região do gene promotor do AT1, contribuindo para o aumento de sua expressão. Esses dados foram associados ao aumento da PA nos filhos e ao desenvolvimento de disfunções cardiovasculares.

Com isso, pode ter ocorrido uma contra-regulação do SRA, entre a expressão de receptores da Ang II. Esses receptores, AT1 e AT2 compartilham apenas 33% da sua estrutura (Gasparo et al., 2000), apesar da Ang II apresentar afinidade semelhante em relação a esses dois receptores, no entanto o AT1 é mais expresso na fase adulta e o AT2 durante o desenvolvimento fetal (Nakajima et al., 1993). Uma das hipóteses é que o tratamento materno com o C21 possa ter promovido o aumento da expressão do receptor AT2 e reduzido a expressão do receptor AT1 nos filhos, de forma indireta, contribuindo para a redução da pressão arterial e melhora de alguns parâmetros avaliados. Avaliamos a expressão de proteínas desses receptores no tecido cardíaco da prole, mas não foi diferente entre os grupos. No entanto, apesar de não ter sido identificada diferença na expressão do AT1 e AT2 no coração da prole, proteínas desses receptores podem estar alteradas em outros tecidos, como por exemplo, na vasculatura e estar envolvido nos efeitos avaliados. Porém, as alterações epigenéticas podem ter ocorrido em outras vias, como por exemplo, por melhora da biodisponibilidade do NO, citados aqui anteriormente, considerando que foi identificada melhora da reatividade coronariana e redução da PA. Porém, outra alternativa seria, pelo menos em parte, que os efeitos benéficos identificados poderiam ter ocorrido por meio de efeitos diretos do tratamento, pois não se sabe ainda se o C21 pode atravessar a placenta atingindo diretamente a prole e desencadeando assim os seus efeitos. Em contrapartida, considerando que os efeitos benéficos foram identificados nos animais SHR

C21 com 4 meses, além da redução da PAS ter ocorrido de forma duradoura durante todo o período avaliado e o tratamento foi realizado apenas durante a gestação, sugere que os efeitos provavelmente não ocorreram apenas de forma direta, atravessando a placenta.

Considerando que diversos tipos de exposições maternas a fatores adversos podem implicar em doenças, um forte indício disso é o baixo peso ao nascer que está associado ao desenvolvimento prejudicado de órgãos, contribuindo para o desenvolvimento de doenças. O baixo peso ao nascer é uma característica já identificada nessa linhagem de animais hipertensos usada no estudo (South et al., 2019). Estudos desenvolvidos por Barker indicaram que o baixo peso ao nascer e aumento do peso placentário estão diretamente relacionados com o aumento da pressão arterial (Barker et al., 1990). Um dos primeiros resultados obtidos aqui, indicou que o tratamento materno contribuiu para um aumento do peso ao nascer se comparado ao grupo SHR não tratado. O sistema cardiovascular é o primeiro a ser formado durante o desenvolvimento e o coração é o primeiro órgão funcional do corpo, formado em três etapas principais: formação do tubo cardíaco, looping cardíaco e septação cardíaca (Moorman et al., 2003). As alterações provenientes da hipertensão na gestação, podem ter prejudicado o desenvolvimento de órgãos, como o próprio coração, refletindo no baixo peso ao nascer. O tratamento por sua vez, pode estar associado a melhora no desenvolvimento de órgãos, refletindo em um aumento do peso ao nascer e estar relacionado a atenuação da hipertensão na prole. Além disso, as alterações vasculares envolvidas na gestação e remodelamento vascular inadequado da hipertensão gestacional, em associação ao aumento do PA, disfunção contrátil e endotelial e inflamação podem estar associadas as disfunções na prole (Clark and Khalil, 2024). Outra possível explicação é que os prejuízos vasculares durante a gestação podem contribuir para a hipóxia, pois o transporte de nutrientes e oxigênio pode ser prejudicado. A hipóxia por sua vez, assim como visto por Campbell e colaboradores (Campbell et al., 1967) promove uma alteração no débito cardíaco fetal, desviando sangue do tronco para promover a perfusão do cérebro, como um mecanismo protetor. Esse fator poderia influenciar a estrutura e complacência vascular, com o espessamento arterial, contribuindo para o aumento da pressão.

Considerando o aumento de citocinas pró inflamatórias presentes na fisiopatologia da hipertensão, o tratamento, pode ter contribuído para a redução de citocinas pró inflamatórias nas mães e conseqüentemente nos filhos, como efeito direto do tratamento, ou por modulação passada de mãe para a prole. Sendo assim, considerando a hipertensão durante o período gestacional como um fator importante ao desenvolvimento fetal devido ao

comprometimento vascular, acompanhamos a PAS das fêmeas hipertensas utilizadas para o tratamento materno. O padrão pressórico observado indica que o tratamento com C21 preveniu o aumento da PAS das grávidas hipertensas. Esse dado pode estar associado a redução da resistência vascular, aumento do fluxo uterino e ter contribuído para uma melhora do transporte de nutrientes e desenvolvimento fetal, que poderia também explicar o maior peso ao nascer no grupo C21.

Esses dados mostraram que o período gestacional é um importante período dentro da janela de programação, em que terapias durante essa etapa podem atuar prevenindo ou atenuando doenças. Os resultados corroboram para os principais achados deste estudo, em que vimos efeitos benéficos também com ativação materna do receptor AT2 no sistema cardiovascular da prole. Desta forma, identificamos alternativas que poderão contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos para a hipertensão na gestação.

Um importante ponto a se destacar são os riscos da utilização das principais classes de medicamentos utilizados no controle da hipertensão durante a gestação, principalmente os que atuam no SRA, como BRA e IECA devido ao efeito teratogênico. A contraindicação de alguns desses medicamentos está relacionada à restrição do crescimento fetal e malformação fetal (Barroso et al., 2020). Sendo assim, isso mostra a necessidade de vias alternativas para o controle da pressão arterial em gestantes para excluir ou minimizar efeitos adversos no feto ou no indivíduo em algum momento da vida.

6. CONCLUSÕES

Esses dados mostram que a ativação do receptor AT2 com o Composto 21 foi benéfico para as ratas gestantes hipertensas, promovendo redução da pressão arterial. Além disso, o tratamento materno também promoveu efeitos cardioprotetores importantes ao sistema cardiovascular dos filhos, como redução da PAS, melhora da função vascular coronariana e da sensibilidade barorreflexa. A redução da hipertrofia e fibrose tanto intersticial quanto perivascular também foram observados em resposta ao tratamento materno.

Assim, pode-se observar que a janela de programação fetal, além de ser considerada como período importante para o desenvolvimento de patologias, pode também ser responsável por promover importantes alterações no sistema cardiovascular, inclusive atenuando o desenvolvimento de doenças na prole.

Desta forma, considerando os riscos dos principais fármacos para o controle da hipertensão na gestação, a ativação do receptor AT2 surge como uma possível alternativa que poderá contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos para a hipertensão na gestação promovendo ainda, benefícios para a prole.

7. REFERÊNCIAS

- Barker, D.J., Bull, A.R., Osmond, C., Simmonds, S.J., 1990. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ Br. Med. J.* 301, 259. <https://doi.org/10.1136/BMJ.301.6746.259>
- Barker, D.J.P., 2007. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261, 412–417. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2796.2007.01809.X>
- Barker, D.J.P., 2002. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 364–368. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(02\)00689-6](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(02)00689-6)
- Barker, D.J.P., 1990. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 301, 1111. <https://doi.org/10.1136/BMJ.301.6761.1111>
- Barroso, W.K.S., Rodrigues, C.I.S., Bortolotto, L.A., Mota-Gomes, M.A., Brandão, A.A., Feitosa, A.D. de M., Machado, C.A., 2020. Diretrizes Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020 Diretrizes. *Brazilian Guidel. Hypertens.* 116, 516–658.
- Bassien-Capsa, V., Fouron, J.-C., Comte, B., Chorvatova, A., 2006. Structural, functional and metabolic remodeling of rat left ventricular myocytes in normal and in sodium-supplemented pregnancy. *Cardiovasc. Res.* 69, 423–31. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.10.017>
- Bernardo, B.C., Weeks, K.L., Pretorius, L., McMullen, J.R., 2010. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* 128, 191–227. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.005>
- Bernatova, I., Victoria Conde, M., Kopincova, J., Carmen González, M., Puzserova, A., Arribas, S.M., 2009. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: focus on methodological aspects. *J. Hypertens. Suppl.* 27. <https://doi.org/10.1097/01.HJH.0000358834.18311.FC>
- Bessa, A.S.M., Jesus, E.F., Nunes, A.D.C., Pontes, C.N.R., Lacerda, I.S., Costa, J.M., Souza, E.J., Lino-Júnior, R.S., Biancardi, M.F., Santos, F.C.A., Pedrino, G.R., Colugnati, D.B., Mazaro-Costa, R., Mendes, E.P., Castro, C.H., 2019. Stimulation of the ACE2 / Ang-(1–7)/Mas axis in hypertensive pregnant rats attenuates cardiovascular dysfunction in adult male offspring. *Hypertens. Res.* 42, 1883–1893. <https://doi.org/10.1038/s41440-019-0321-8>
- Bhullar, S.K., Dhalla, N.S., 2022. Angiotensin II-Induced Signal Transduction Mechanisms for Cardiac Hypertrophy. *Cells* 11. <https://doi.org/10.3390/CELLS11213336>
- Blanch, G.T., Freiria-Oliveira, A.H., Speretta, G.F.F., Carrera, E.J., Li, H., Speth, R.C., Colombari, E., Sumners, C., Colombari, D.S.A., 2014. Increased expression of angiotensin II type 2 receptors in the solitary-vagal complex blunts renovascular hypertension. *Hypertension* 64, 777–783. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03188>
- Boeldt, D.S., Bird, I.M., 2017. Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia. *J. Endocrinol.* 232, R27–R44. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0340>
- Bogdarina, I., Welham, S., King, P.J., Burns, S.P., Clark, A.J.L., 2007. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ. Res.* 100, 520–526. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000258855.60637.58>
- Bosnyak, S., Jones, E.S., Christopoulos, A., Aguilar, M.I., Thomas, W.G., Widdop, R.E., 2011. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin. Sci.* 121, 297–303. <https://doi.org/10.1042/CS20110036>

- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brito, V.B., Nascimento, L.V.M., Nunes, R.B., Moura, D.J., Lago, P.D., Saffi, J., 2016. Exercise during pregnancy decreases doxorubicin-induced cardiotoxic effects on neonatal hearts. *Toxicology* 368–369, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.08.017>
- Brouwers, S., Smolders, I., Wainford, R.D., Dupont, A.G., 2016. Hypotensive and sympathoinhibitory responses to selective central AT₂ receptor stimulation in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.* 129, 81–92. <https://doi.org/10.1042/CS20140776.HYPOTENSIVE>
- Calvert, J.W., Condit, M.E., Aragón, J.P., Nicholson, C.K., Moody, B.F., Hood, R.L., Sindler, A.L., Gundewar, S., Seals, D.R., Barouch, L.A., Lefer, D.J., 2011. Exercise Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion injury via stimulation of β 3-Adrenergic Receptors and Increased Nitric Oxide Signaling: Role of Nitrite and Nitrosothiols. *Circ. Res.* 108, 1448. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.241117>
- Campbell, A.G., Dawes, G.S., Fishman, A.P., Hyman, A.I., 1967. Regional redistribution of blood flow in the mature fetal lamb. *Circ. Res.* 21, 229–235. <https://doi.org/10.1161/01.RES.21.2.229>
- Care, A.S., Sung, M.M., Panahi, S., Gragasin, F.S., Dyck, J.R.B., Davidge, S.T., Bourque, S.L., 2016. Perinatal resveratrol supplementation to spontaneously hypertensive rat dams mitigates the development of hypertension in adult offspring. *Hypertension* 67, 1038–1044. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06793>
- Carey, R.M., 2017a. AT₂ Receptors: Potential Therapeutic Targets for Hypertension. *Am. J. Hypertens.* 30, 339–347. <https://doi.org/10.1093/AJH/HPW121>
- Carey, R.M., 2017b. AT₂ Receptors: Potential Therapeutic Targets for Hypertension. *Am. J. Hypertens.* 30, 339–347. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpw121>
- Carey, R.M., 2017c. Update on angiotensin AT₂ receptors. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000304>
- Carey, R.M., Padia, S.H., 2013. Role of angiotensin AT₂ receptors in natriuresis: Intrarenal mechanisms and therapeutic potential. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12059>
- Carmos-Silva, C., Almeida, J.F.Q. de, Macedo, L.M., Melo, M.B.B., Pedrino, G.R., Santos, F.F.C.A., Biancardi, M.F., Santos, R.A.S.D.A.S., Carvalho, A.A., Mendes, E.P., Colugnati, D.B., Mazaro-Costa, R., Castro, C.H. de, 2016. Mas receptor contributes to pregnancy-induced cardiac remodeling. *Clin. Sci. (Lond)*. <https://doi.org/10.1042/CS20160095>
- Carter, L.G., Qi, N.R., Cabo, R. de, Pearson, K.J., 2013. Maternal exercise improves insulin sensitivity in mature rat offspring. *Med Sci Sport. Exerc* 45, 832–840. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31827de953>
- Casto, R., Phillips, M.I., 1986. Angiotensin II attenuates baroreflexes at nucleus tractus solitarius of rats. *Am. J. Physiol.* 250. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.1986.250.2.R193>
- Castoldi, G., Carletti, R., Ippolito, S., Stella, A., Zerbini, G., Pelucchi, S., Zatti, G., Di Gioia, C.R.T., 2021a. Angiotensin Type 2 and Mas Receptor Activation Prevents Myocardial Fibrosis and Hypertrophy through the Reduction of Inflammatory Cell Infiltration and Local Sympathetic Activity in Angiotensin II-Dependent Hypertension. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, Vol. 22, Page 13678 22, 13678. <https://doi.org/10.3390/IJMS222413678>
- Castoldi, G., Carletti, R., Ippolito, S., Stella, A., Zerbini, G., Pelucchi, S., Zatti, G., Di Gioia, C.R.T., 2021b. Angiotensin Type 2 and Mas Receptor Activation Prevents Myocardial

- Fibrosis and Hypertrophy through the Reduction of Inflammatory Cell Infiltration and Local Sympathetic Activity in Angiotensin II-Dependent Hypertension. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 13678. <https://doi.org/10.3390/IJMS222413678>
- Castoldi, G., Di Gioia, C., Bombardi, C., Maestroni, S., Carletti, R., Steckelings, U., Dahlöf, B., Unger, T., Zerbini, G., Stella, A., 2014. Prevention of diabetic nephropathy by compound 21, selective agonist of angiotensin type 2 receptors, in Zucker diabetic fatty rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 307, F1123–F1131. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00247.2014>
- Castoldi, G., di Gioia, C.R.T., Roma, F., Carletti, R., Manzoni, G., Stella, A., Zerbini, G., Perseghin, G., 2019. Activation of angiotensin type 2 (AT2) receptors prevents myocardial hypertrophy in Zucker diabetic fatty rats. *Acta Diabetol.* 56, 97–104. <https://doi.org/10.1007/s00592-018-1220-1>
- Chang, P., Wang, Q., Xu, H., Yang, M., Lin, X., Li, X., Zhang, Z., Zhang, X., Zhao, F., Zhao, X., Bai, F., Yu, J., 2015. Tetrahydrobiopterin reverse left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction through the PI3K/p-Akt pathway in spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463, 1012–1020. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.06.051>
- Ciccarone, F., Castelli, S., Ioannilli, L., Ciriolo, M.R., 2019. High dietary fat intake affects DNA methylation / hydroxymethylation in mouse heart: epigenetic hints for obesity-related cardiac dysfunction. *Mol Nutr Food Res* 63(4), 1–14. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800970>
- Clark, C.R., Khalil, R.A., 2024. Regulation of vascular angiotensin II type 1 and type 2 receptor and angiotensin-(1-7)/MasR signaling in normal and hypertensive pregnancy. *Biochem. Pharmacol.* 220. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2023.115963>
- Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S.E., Oliveira-dos-Santos, A.J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C.M., Manoukian, A.S., Chappell, M.C., Backx, P.H., Yagil, Y., Penninger, J.M., 2002. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417, 822–828. <https://doi.org/10.1038/NATURE00786>
- DATASUS, 2020. Indicadores de Mortalidade.
- De Almeida, P.W.M., Melo, M.B., De Freitas Lima, R., Gavioli, M., Santiago, N.M., Greco, L., Jesus, I.C.G., Nocchi, E., Parreira, A., Alves, M.N.M., Mitraud, L., Resende, R.R., Campagnole-Santos, M.J., Dos Santos, R.A.S., Guatimosim, S., 2015. Beneficial Effects of Angiotensin-(1-7) Against Deoxycorticosterone Acetate-Induced Diastolic Dysfunction Occur Independently of Changes in Blood Pressure. *Hypertension* 66, 389–395. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04893>
- Dominici, F.P., Veiras, L.C., Shen, J.Z.Y., Bernstein, E.A., Quiroga, D.T., Steckelings, U.M., Bernstein, K.E., Giani, J.F., 2020. Activation of AT2 receptors prevents diabetic complications in female db/db mice by NO-mediated mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 177, 4766–4781. <https://doi.org/10.1111/BPH.15241>
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E., Acton, S., 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87, E1-9.
- Dopona, E.P.B., Rocha, V.F., Furukawa, L.N.S., Oliveira, I.B., Heimann, J.C., 2018. Myocardial hypertrophy induced by high salt consumption is prevented by angiotensin II AT2 receptor agonist. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 23, 301–305. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.11.001>
- Eghbali, M., Wang, Y., Toro, L., Stefani, E., 2006. Heart hypertrophy during pregnancy: a

better functioning heart? *Trends Cardiovasc. Med.* 16, 285–291.
<https://doi.org/10.1016/J.TCM.2006.07.001>

- Etelvino, G.M., Peluso, A.A.B., Santos, R.A.S., 2014. New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. *Curr. Hypertens. Rep.* 16, 433. <https://doi.org/10.1007/s11906-014-0433-0>
- Evangelou, E., Warren, H.R., Mosen-Ansorena, D., Mifsud, B., Pazoki, R., Gao, H., Ntritsos, G., Dimou, N., Cabrera, C.P., Karaman, I., Ng, F.L., Evangelou, M., Witkowska, K., Tzani, E., Hellwege, J.N., Giri, A., Velez Edwards, D.R., Sun, Y. V., Cho, K., Gaziano, J.M., Wilson, P.W.F., Tsao, P.S., Kovesdy, C.P., Esko, T., Mägi, R., Milani, L., Almgren, P., Boutin, T., Debette, S., Ding, J., Giulianini, F., Holliday, E.G., Jackson, A.U., Li-Gao, R., Lin, W.Y., Luan, J., Mangino, M., Oldmeadow, C., Prins, B.P., Qian, Y., Sargurupremraj, M., Shah, N., Surendran, P., Thériault, S., Verweij, N., Willems, S.M., Zhao, J.H., Amouyel, P., Connell, J., de Mutsert, R., Doney, A.S.F., Farrall, M., Menni, C., Morris, A.D., Noordam, R., Paré, G., Poulter, N.R., Shields, D.C., Stanton, A., Thom, S., Abecasis, G., Amin, N., Arking, D.E., Ayers, K.L., Barbieri, C.M., Batini, C., Bis, J.C., Blake, T., Bochud, M., Boehnke, M., Boerwinkle, E., Boomsma, D.I., Bottinger, E.P., Braund, P.S., Brumat, M., Campbell, A., Campbell, H., Chakravarti, A., Chambers, J.C., Chauhan, G., Ciullo, M., Cocca, M., Collins, F., Cordell, H.J., Davies, G., Borst, M.H. d., Geus, E.J. d., Deary, I.J., Deelen, J., Del Greco M, F., Demirkale, C.Y., Dörr, M., Ehret, G.B., Elosua, R., Enroth, S., Erzurumluoglu, A.M., Ferreira, T., Frånberg, M., Franco, O.H., Gandin, I., Gasparini, P., Giedraitis, V., Gieger, C., Girotto, G., Goel, A., Gow, A.J., Gudnason, V., Guo, X., Gyllensten, U., Hamsten, A., Harris, T.B., Harris, S.E., Hartman, C.A., Havulinna, A.S., Hicks, A.A., Hofer, E., Hofman, A., Hottenga, J.J., Huffman, J.E., Hwang, S.J., Ingelsson, E., James, A., Jansen, R., Jarvelin, M.R., Joehanes, R., Johansson, Å., Johnson, A.D., Joshi, P.K., Jousilahti, P., Jukema, J.W., Jula, A., Kähönen, M., Kathiresan, S., Keavney, B.D., Khaw, K.T., Knekt, P., Knight, J., Kolcic, I., Kooner, J.S., Koskinen, S., Kristiansson, K., Kutalik, Z., Laan, M., Larson, M., Launer, L.J., Lehne, B., Lehtimäki, T., Liewald, D.C.M., Lin, L., Lind, L., Lindgren, C.M., Liu, Y.M., Loos, R.J.F., Lopez, L.M., Lu, Y., Lyytikäinen, L.P., Mahajan, A., Mamasoula, C., Marrugat, J., Marten, J., Milanese, Y., Morgan, A., Morris, A.P., Morrison, A.C., Munson, P.J., Nalls, M.A., Nandakumar, P., Nelson, C.P., Niiranen, T., Nolte, I.M., Nutile, T., Oldehinkel, A.J., Oostra, B.A., O'Reilly, P.F., Org, E., Padmanabhan, S., Palmas, W., Palotie, A., Pattie, A., Penninx, B.W.J.H., Perola, M., Peters, A., Polasek, O., Pramstaller, P.P., Nguyen, Q.T., Raitakari, O.T., Ren, M., Rettig, R., Rice, K., Ridker, P.M., Ried, J.S., Riese, H., Ripatti, S., Robino, A., Rose, L.M., Rotter, J.I., Rudan, I., Ruggiero, D., Saba, Y., Sala, C.F., Salomaa, V., Samani, N.J., Sarin, A.P., Schmidt, R., Schmidt, H., Shrine, N., Siscovick, D., Smith, A. V., Snieder, H., Söber, S., Sorice, R., Starr, J.M., Stott, D.J., Strachan, D.P., Strawbridge, R.J., Sundström, J., Swertz, M.A., Taylor, K.D., Teumer, A., Tobin, M.D., Tomaszewski, M., Toniolo, D., Traglia, M., Trompet, S., Tuomilehto, J., Tzourio, C., Uitterlinden, A.G., Vaez, A., van der Most, P.J., van Duijn, C.M., Vergnaud, A.C., Verwoert, G.C., Vitart, V., Völker, U., Vollenweider, P., Vuckovic, D., Watkins, H., Wild, S.H., Willemsen, G., Wilson, J.F., Wright, A.F., Yao, J., Zemunik, T., Zhang, W., Attia, J.R., Butterworth, A.S., Chasman, D.I., Conen, D., Cucca, F., Danesh, J., Hayward, C., Howson, J.M.M., Laakso, M., Lakatta, E.G., Langenberg, C., Melander, O., Mook-Kanamori, D.O., Palmer, C.N.A., Risch, L., Scott, R.A., Scott, R.J., Sever, P., Spector, T.D., van der Harst, P., Wareham, N.J., Zeggini, E., Levy, D., Munroe, P.B., Newton-Cheh, C., Brown, M.J., Metspalu, A., Hung, A.M., O'Donnell, C.J., Edwards, T.L., Psaty, B.M., Tzoulaki, I., Barnes, M.R., Wain, L. V., Elliott, P., Caulfield, M.J., 2018. Genetic analysis of over 1 million people identifies 535 new loci associated

- with blood pressure traits. *Nat. Genet.* 2018 50(10), 1412–1425. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0205-x>
- Falcón, B.L., Stewart, J.M., Bourassa, E., Katovich, M.J., Walter, G., Speth, R.C., Sumners, C., Raizada, M.K., Stewart, J.M., Bourassa, E., Katovich, J., Walter, G., Speth, R.C., Sumners, C., Raizada, M.K., Li, A., 2004. Angiotensin II type 2 receptor gene transfer elicits cardioprotective effects in an angiotensin II infusion rat model of hypertension. *Physiol Genomics* 19, 255–261. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00170.2004>
- Fernandes, T., Hashimoto, N.Y., Magalhães, F.C., Fernandes, F.B., Casarini, D.E., Carmona, A.K., Krieger, J.E., Phillips, M.I., Oliveira, E.M., 2011. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension* 58, 182–189. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.168252>
- Ferrario, C.M., Strawn, W.B., 2006. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 98, 121–128. [https://doi.org/S0002-9149\(06\)00573-X](https://doi.org/S0002-9149(06)00573-X) [pii]10.1016/j.amjcard.2006.01.059
- Forrester, S.J., Booz, G.W., Sigmund, C.D., Coffman, T.M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R., Eguchi, S., 2018. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 98, 1627–1738. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2017>
- Frey, N., Katus, H.A., Olson, E.N., Hill, J.A., 2004. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109, 1580–1589. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000120390.68287.BB>
- Gao, J., Zucker, I.H., Gao, L., 2014. Activation of central angiotensin type 2 receptors by compound 21 improves arterial baroreflex sensitivity in rats with heart failure. *Am. J. Hypertens.* 27, 1248–1256. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu044>
- Garland, C.J., Plane, F., Kemp, B.K., Cocks, T.M., 1995. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 23–30. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)88969-5](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)88969-5)
- Gasparo, M. De, Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., Unger, T., 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 415–472.
- Gomes-Filho, A., Ferreira, A.J., Santos, S.H., Neves, S.R., Silva Camargos, E.R., Becker, L.K., Belchior, H.A., Dias-Peixoto, M.F., Pinheiro, S. V., Santos, R.A., 2008. Selective increase of Angiotensin-(1-7) and its receptor in spontaneously hypertensive rat hearts subjected to physical training. *Exp Physiol* 93, 589–598.
- González-Blázquez, R., Alcalá, M., Fernández-Alfonso, M.S., Steckelings, U.M., Paz Lorenzo, M., Viana, M., Boisvert, W.A., Unger, T., Gil-Ortega, M., Somoza, B., 2021. C21 preserves endothelial function in the thoracic aorta from DIO mice: role for AT2, Mas and B2 receptors. *Clin. Sci.* 135, 1145–1163. <https://doi.org/10.1042/CS20210049>
- González, A., Ravassa, S., López, B., Moreno, M.U., Beaumont, J., San José, G., Querejeta, R., Bayés-Genís, A., Díez, J., 2018. Myocardial Remodeling in Hypertension. *Hypertension* 72, 549–558. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11125>
- Goyal, R., Goyal, D., Leitzke, A., Gheorghe, C., Longo, L., 2010. Brain renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy. *Reprod. Sci.* 17, 227–238. <https://doi.org/10.1177/1933719109351935>
- Grady, E.F., Sechi, L.A., Griffin, C.A., Schambelan, M., Kalinyak, J.E., 1991. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J. Clin. Invest.* 88, 921–933. <https://doi.org/10.1172/JCI115395>
- Grobe, J.L., Mecca, A.P., Lingis, M., Shenoy, V., Bolton, T. a, Machado, J.M., Speth, R.C.,

- Raizada, M.K., Katovich, M.J., 2007. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin- (1 – 7). *AJP-Heart Circ Physiol* 292, 736–742. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00937.2006>.
- Guo, Q., Feng, X., Xue, H., Teng, X., Jin, S., Duan, X., Xiao, L., Wu, Y., 2017. Maternal renovascular hypertensive rats treatment with hydrogen sulfide increased the methylation of AT1b gene in offspring. *Am. J. Hypertens.* 30, 1220–1227. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpx124>
- Handy, D., Castro, R., Loscalzo, J., 2011. Epigenetic Modifications Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation* 123, 2145–2156.
- Healy, D.P., Zhang, N., 1992. Angiotensin II receptors in the solitary-vagal area of hypertensive rats. *Hypertension* 19, 355–361. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.19.4.355>
- Hill, C.E., Phillips, J.K., Sandow, S.L., 2001. Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds. *Med. Res. Rev.* 21, 1–60. [https://doi.org/10.1002/1098-1128\(200101\)21:1<1::aid-med1>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/1098-1128(200101)21:1<1::aid-med1>3.0.co;2-6)
- Honzíková, N., Fišer, B., 2009. Baroreflex sensitivity and essential hypertension in adolescents. *Physiol. Res.* 58, 605–612. <https://doi.org/10.33549/PHYSIOLRES.931700>
- Ichihara, S., Senbonmatsu, T., Price, E., Ichiki, T., Gaffney, F.A., Inagami, T., 2001. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation* 104, 346–351. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.104.3.346>
- Ismael, S., Ishrat, T., 2022. Compound 21, a Direct AT2R Agonist, Induces IL-10 and Inhibits Inflammation in Mice Following Traumatic Brain Injury. *Neuromolecular Med.* 24, 274. <https://doi.org/10.1007/S12017-021-08687-7>
- Itani, N., Salinas, C.E., Villena, M., Skeffington, K.L., Beck, C., Villamor, E., Blanco, C.E., Giussani, D.A., 2018. The highs and lows of programmed cardiovascular disease by developmental hypoxia: studies in the chicken embryo. *J. Physiol.* 596, 2991–3006. <https://doi.org/10.1113/JP274111>
- Johnson, R.A., Huntley, A., Hughes, R.A., Cramer, H., Turner, K.M., Perkins, B., Feder, G., 2018. Interventions to support shared decision making for hypertension: A systematic review of controlled studies. *Heal. Expect.* 1–17.
- Kaschina, E., Grzesiak, A., Li, J., Foryst-Ludwig, A., Timm, M., Rompe, F., Sommerfeld, M., Kemnitz, U.R., Curato, C., Namsolleck, P., Tschöpe, C., Hallberg, A., Alterman, M., Hucko, T., Paetsch, I., Dietrich, T., Schnackenburg, B., Graf, K., Dahlöf, B., Kintscher, U., Unger, T., Steckelings, U.M., 2008. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: A novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation* 118, 2523–2532. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.784868>
- Kemp, B.A., Howell, N.L., Gildea, J.J., Keller, S.R., Brautigan, D.L., Carey, R.M., 2022. Renal AT2 Receptors Mediate Natriuresis via Protein Phosphatase PP2A. *Circ. Res.* 130, 96–111. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319519>
- Kemp, C.D., Conte, J. V., 2012. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc. Pathol.* 21, 365–371. <https://doi.org/10.1016/J.CARPATH.2011.11.007>
- Khalil, R.A., Crews, J.K., Novak, J., Kassab, S., Granger, J.P., 1998. Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* 31, 1065–1069. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.31.5.1065>
- Khalil, R.A., Granger, J.P., 2002. Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00762.2001>
- Kim, Y.K., Kim, S.J., Yatani, A., Huang, Y., Castelli, G., Vatner, D.E., Liu, J., Zhang, Q., Diaz,

- G., Zieba, R., Thaisz, J., Drusco, A., Croce, C., Sadoshima, J., Condorelli, G., Vatner, S.F., 2003. Mechanism of enhanced cardiac function in mice with hypertrophy induced by overexpressed Akt. *J. Biol. Chem.* 278, 47622–47628. <https://doi.org/10.1074/JBC.M305909200>
- Koeners, M.P., Van Faassen, E.E., Wesseling, S., De Sain-Van Der Velden, M., Koomans, H.A., Braam, B., Joles, J.A., 2007. Maternal supplementation with citrulline increases renal nitric oxide in young spontaneously hypertensive rats and has long-term antihypertensive effects. *Hypertension* 50, 1077–1084. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.095794>
- Kokubo, M., Uemura, A., Matsubara, T., Murohara, T., 2005. Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. *Hypertens. Res.* 28, 601–609. <https://doi.org/10.1291/HYPRES.28.601>
- Konukoglu, D., Uzun, H., 2017. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* 956, 511–540. https://doi.org/10.1007/5584_2016_90
- Koulis, C., Chow, B.S.M., McKelvey, M., Steckelings, U.M., Unger, T., Thallas-Bonke, V., Thomas, M.C., Cooper, M.E., Jandeleit-Dahm, K.A., Allen, T.J., 2015. AT2R Agonist, Compound 21, Is Reno-Protective Against Type 1 Diabetic Nephropathy. *Hypertension* 65, 1073–1081. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05204>
- Krum, H., 2001. Differentiation in the Angiotensin II Receptor 1 Blocker Class on Autonomic Function. *Curr. Hypertens. Rep.* 17–23.
- Lauer, D., Slavic, S., Sommerfeld, M., Thöne-Reineke, C., Sharkovska, Y., Hallberg, A., Dahlöf, B., Kintscher, U., Unger, T., Steckelings, U.M., Kaschina, E., 2014. Angiotensin type 2 receptor stimulation ameliorates left ventricular fibrosis and dysfunction via regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1/Matrix metalloproteinase 9 axis and transforming growth factor β 1 in the rat heart. *Hypertension* 63, 60–67. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02522>
- Lautner, R.Q., Villela, D.C., Fraga-Silva, R.A., Silva, N., Verano-Braga, T., 2013. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res* 112, 1104–11.
- Longo, L.D., 1983. Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. *Am. J. Physiol.* 245, R720-9.
- Luoh, H.F., Chan, S.H.H., 1998. Participation of AT1 and AT2 receptor subtypes in the tonic inhibitory modulation of baroreceptor reflex response by endogenous angiotensins at the nucleus tractus solitarii in the rat. *Brain Res.* 782, 73–82. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01198-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01198-0)
- Maejima, Y., Kuroda, J., Matsushima, S., Ago, T., Sadoshima, J., 2011. Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 408–416. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2010.12.018>
- Maillet, M., Berlo, J.H. Van, Molkenin, J.D., 2013. Molecular basis of physiological heart growth : fundamental concepts and new players. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 38–48. <https://doi.org/10.1038/nrm3495>
- Mancia, G., Rea, F., Corrao, G., Grassi, G., 2019. Two-Drug Combinations as First-Step Antihypertensive Treatment. *Circ. Res.* 124, 1113–1123. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313294>
- Marchini, G.S., Tamashiro, D.S.U., Oyama, H.T., Cortella, L., Cestari, I.N., 2017. Experimental Method for Recording Epicardium Potentials and Cardiac Myocyte Shortening. *Comput. Cardiol.* (2010). 44. <https://doi.org/10.22489/CinC.2017.291-130>
- Marques, A.H., Bjørke-Monsen, A.-L., Teixeira, A.L., Silverman, M.N., 2015. Maternal stress,

- nutrition and physical activity: Impact on immune function, CNS development and psychopathology. *Brain Res.* 1617, 28–46. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.051>
- Mehta, P.K., Griendling, K.K., 2007. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, 82–97. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00287.2006>.-The
- Metcalf, B.L., Huentelman, M.J., Parilak, L.D., Taylor, D.G., Katovich, M.J., Knot, H.J., Summers, C., Raizada, M.K., 2004. Prevention of Cardiac Hypertrophy by Angiotensin II Type-2 Receptor Gene Transfer. *Hypertension* 43, 1233–1238. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000127563.14064.FD>
- Millis, R.M., 2011. Epigenetics and Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 13, 21–28. <https://doi.org/10.1007/s11906-010-0173-8>
- MohanKumar, S.M., King, A., Shin, A.C., Sirivelu, M.P., MohanKumar, P.S., Fink, G.D., 2007. Developmental programming of cardiovascular disorders: focus on hypertension. *Rev Endocr Metab Disord* 8, 115–125. <https://doi.org/10.1007/s11154-007-9047-z>
- Moorman, A., Webb, S., Brown, N.A., Lamers, W., Anderson, R.H., 2003. Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart* 89, 806–814. <https://doi.org/10.1136/HEART.89.7.806>
- Nakajima, M., Mukoyama, M., Pratt, R.E., Horiuchi, M., Dzau, V.J., 1993. Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 393–399. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1993.2492>
- Nakamura, M., Sadoshima, J., 2018. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat. Rev. Cardiol.* 15, 387–407. <https://doi.org/10.1038/S41569-018-0007-Y>
- Nguyen, T., Li, G.E., Chen, H., Cranfield, C.G., McGrath, K.C., Gorrie, C.A., 2018. Maternal E-Cigarette Exposure Results in Cognitive and Epigenetic Alterations in Offspring in a Mouse Model. *Chem. Res. Toxicol.* 31, 601–611. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00084>
- Nicholls, M.G., Richards, A.M., Agarwal, M., 1998. The importance of the renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *J Hum Hypertens* 12, 295–299.
- Ocaranza, M.P., Riquelme, J.A., García, L., Jalil, J.E., Chiong, M., Santos, R.A.S., Lavandero, S., 2019. Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 2019 172 17, 116–129. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0244-8>
- Odenbach, J., Wang, X., Cooper, S., Chow, F.L., Oka, T., Lopaschuk, G., Kassiri, Z., Fernandez-Patron, C., 2011. MMP-2 mediates angiotensin ii-induced hypertension under the transcriptional control of MMP-7 and TACE. *Hypertension* 57, 123–130. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.159525>
- Ozhan, O., Parlakpinar, H., Acet, A., 2021. Comparison of the effects of losartan, captopril, angiotensin II type 2 receptor agonist compound 21, and MAS receptor agonist AVE 0991 on myocardial ischemia–reperfusion necrosis in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 35, 669–680. <https://doi.org/10.1111/FCP.12599>
- Patel, S.N., Ali, Q., Hussain, T., 2016. Angiotensin II type 2-receptor agonist C21 reduces proteinuria and oxidative stress in kidney of high-salt fed obese Zucker rats. *Hypertension* 67, 906. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06881>
- Paulis, L., Becker, S.T.R., Lucht, K., Schwengel, K., Slavic, S., Kaschina, E., Thöne-Reineke, C., Dahlöf, B., Baulmann, J., Unger, T., Steckelings, U.M., 2012. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation in N ω- nitro-L-arginine-methyl ester-induced hypertension: The effect on pulse wave velocity and aortic remodeling. *Hypertension* 59, 485–492.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.185496>

- Peluso, A.A., Bertelsen, J.B., Andersen, K., Mortensen, T.P., Hansen, P.B., Sumners, C., Bader, M., Santos, R.A., Steckelings, U.M., 2018. Identification of protein phosphatase involvement in the AT₂ receptor-induced activation of endothelial nitric oxide synthase. *Clin. Sci. (Lond)*. 132, 777–790. <https://doi.org/10.1042/CS20171598>
- Peluso, A.A., Souza-Silva, I.M., Villela, D.C., Hansen, P.B.L., Hallberg, A., Bader, M., Santos, R., Sumners, C., Steckelings, U.M., 2023. Functional assay for assessment of agonistic or antagonistic activity of angiotensin AT₂ receptor ligands reveals that EMA401 and PD123319 have agonistic properties. *Biochem. Pharmacol.* 216, 115793. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2023.115793>
- Porrello, E.R., Widdop, R.E., Delbridge, L.M.D., 2008. Early origins of cardiac hypertrophy: does cardiomyocyte attrition programme for pathological “catch-up” growth of the heart? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35, 1358–1364. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1681.2008.05036.X>
- Poulter, N., Prabhakaran, D., Caulfield, M., 2015. Hypertension. *Lancet* 386, 801–812. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61468-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61468-9)
- Povlsen, A.L., Grimm, D., Wehland, M., Infanger, M., Krüger, M., 2020. The Vasoactive Mas Receptor in Essential Hypertension. *J. Clin. Med.* 9, 267. <https://doi.org/10.3390/jcm9010267>
- Pugsley, M.K., Tabrizchi, R., 2000. The vascular system. An overview of structure and function. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44, 333–340. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00125-8](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00125-8)
- Qi, Y., Li, H., Shenoy, V., Li, Q., Wong, F., Zhang, L., Raizada, M., Sumners, C., Katovich, M., 2012. Moderate cardiac-selective overexpression of angiotensin II type 2 receptor protects cardiac functions from ischaemic injury. *Exp. Physiol.* 97, 89–101. <https://doi.org/10.1113/EXPPHYSIOL.2011.060673>
- Quiroga, D.T., Narvaéz Pardo, J.A., Zubiría, M.G., Barrales, B., Muñoz, M.C., Giovambattista, A., Dominici, F.P., 2023. Acute In Vivo Administration of Compound 21 Stimulates Akt and ERK1/2 Phosphorylation in Mouse Heart and Adipose Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* 24. <https://doi.org/10.3390/IJMS242316839>
- Racasan, S., Braam, B., Koomans, H.A., Joles, J.A., 2005. Programming blood pressure in adult SHR by shifting perinatal balance of NO and reactive oxygen species toward NO: the inverted Barker phenomenon. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 288. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00314.2004>
- Racasan, S., Braam, B., Van Der Giezen, D.M., Goldschmeding, R., Boer, P., Koomans, H.A., Joles, J.A., 2004. Perinatal L-arginine and antioxidant supplements reduce adult blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* 44, 83–88. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000133251.40322.20>
- Raina, R., Krishnappa, V., Das, A., Amin, H., Radhakrishnan, Y., Nair, N.R., Kusumi, K., 2019. Overview of Monogenic or Mendelian Forms of Hypertension. *Front. Pediatr.* 7, 263. <https://doi.org/10.3389/FPED.2019.00263>
- Ramos-Mondragón, R., Galindo, C.A., Avila, G., 2008. Role of TGF- β on cardiac structural and electrical remodeling. *Vasc. Health Risk Manag.* 4, 1289. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S3985>
- Rapsomaniki, E., Timmis, A., George, J., Pujades-Rodriguez, M., Shah, A.D., Denaxas, S., White, I.R., Caulfield, M.J., Deanfield, J.E., Smeeth, L., Williams, B., Hingorani, A., Hemingway, H., 2014. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1·25 million people. *Lancet* 383. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60685-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60685-1)

- Rehman, A., Leibowitz, A., Yamamoto, N., Rautureau, Y., Paradis, P., Schiffrin, E.L., 2012. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 59, 291–299. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180158>
- Rompe, F., Artuc, M., Hallberg, A., Alterman, M., Ströder, K., Thöne-Reineke, C., Reichenbach, A., Schacherl, J., Dahlöf, B., Bader, M., Alenina, N., Schwaninger, M., Zuberbier, T., Funke-Kaiser, H., Schmidt, C., Schunck, W.H., Unger, T., Steckelings, U.M., 2010. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kb. *Hypertension* 55, 924–931. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147843>
- Rosenkranz, S., 2004. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* 63, 423–432. <https://doi.org/10.1016/J.CARDIORES.2004.04.030>
- Ruchaya, P.J., Speretta, G.F., Blanch, G.T., Li, H., Sumners, C., Menani, J. V., Colombari, E., Colombari, D.S.A., 2016. Overexpression of AT2R in the solitary-vagal complex improves baroreflex in the spontaneously hypertensive rat. *Neuropeptides* 60, 29–36. <https://doi.org/10.1016/J.NPEP.2016.06.006>
- Sakairi, A., Ishida, J., Honjo, K., Inaba, S., Nakamura, S., Sugiyama, F., Yagami, K.-I., Fukamizu, A., 2008. Angiotensin type 1 receptor blockade prevents cardiac remodeling in mice with pregnancy-associated hypertension. *Hypertens. Res.* 31, 2165–2175. <https://doi.org/10.1291/hypres.31.2165>
- Samak, M., Fatullayev, J., Sabashnikov, A., Zerouh, M., Schmack, B., Farag, M., Popov, A.F., Dohmen, P.M., Choi, Y.H., Wahlers, T., Weymann, A., 2016. Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 22, 75. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.900437>
- Santos, R.A., Simoes e Silva, A.C., Maric, C., Silva, D.M., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V, Lopes, M.T., Bader, M., Mendes, E.P., Lemos, V.S., Campagnole-Santos, M.J., Schultheiss, H.P., Speth, R., Walther, T., 2003. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8258–8263.
- Santos, R.A.S., Sampaio, W.O., Alzamora, A.C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., Campagnole-Santos, M.J., 2018. The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). *Physiol. Rev.* 98, 505–553.
- Senbonmatsu, T., Ichihara, S., Price, E., Gaffney, F.A., Inagami, T., 2000. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J. Clin. Invest.* 106. <https://doi.org/10.1172/JCI10037>
- Senoner, T., Dichtl, W., 2019. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/NU11092090>
- Shimada, C., Akaishi, R., Cho, K., Morikawa, M., Kaneshi, Y., Yamda, T., Minakami, H., 2015. Outcomes of 83 fetuses exposed to angiotensin receptor blockers during the second or third trimesters: a literature review. *Hypertens. Res.* 38, 308–313. <https://doi.org/10.1038/hr.2015.12>
- Slama, M., Ahn, J., Varagic, J., Susic, D., Frohlich, E.D., 2004. Long-term left ventricular echocardiographic follow-up of SHR and WKY rats: Effects of hypertension and age. *Am. J. Physiol.* 286, 181–185.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2016. 7ª Diretriz Brasileira De Hipertensão Arterial 107.
- South, A.M., Shaltout, H.A., Washburn, L.K., Diz, D.I., Chappell, M.C., Hendricks, A.S., 2019. Fetal programming and the angiotensin- (1-7) axis : a review of the experimental and clinical data. *Clin. Sci.* 133, 55–74.
- Sumners, C., Peluso, A.A., Haugaard, A.H., Bertelsen, J.B., Steckelings, U.M., 2019a. Anti-

- fibrotic mechanisms of angiotensin AT₂-receptor stimulation. *Acta Physiol.* 227, e13280. <https://doi.org/10.1111/APHA.13280>
- Sumners, C., Peluso, A.A., Haugaard, A.H., Bertelsen, J.B., Steckelings, U.M., 2019b. Anti-fibrotic mechanisms of angiotensin AT₂ -receptor stimulation. *Acta Physiol. (Oxf).* 227. <https://doi.org/10.1111/APHA.13280>
- Tan, P.S.P., Killinger, S., Horiuchi, J., Dampney, R.A.L., 2007. Baroreceptor reflex modulation by circulating angiotensin II is mediated by AT₁ receptors in the nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, 2267–2278. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00267.2007.-Circulating>
- Tomek, J., Bub, G., 2017. Hypertension-induced remodelling: on the interactions of cardiac risk factors. *J. Physiol.* 595, 4027–4036. <https://doi.org/10.1113/JP273043>
- Touyz, R.M., Berry, C., 2002. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 35, 1001–1015.
- Trippodo, N.C., Frohlich, E.D., 1981. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. *Man and rat. Circ. Res.* 48, 309–319. <https://doi.org/10.1161/01.RES.48.3.309>
- Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A., Tummino, P., 2002. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 277, 14838–14843.
- Wan, Y., Wallinder, C., Plouffe, B., Beaudry, H., Mahalingam, A., Wu, X., Johansson, B., Holm, M., Botoros, M., Karlén, A., Pettersson, A., Nyberg, F., Fändriks, L., Gallo-Payet, N., Hallberg, A., Alterman, M., 2004. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of the First Selective Nonpeptide AT₂ Receptor Agonist. *J. Med. Chem.* 47, 5995–6008. <https://doi.org/10.1021/JM049715T>
- Wang, H.J., Wang, W., Cornish, K.G., Rozanski, G.J., Zucker, I.H., 2014. Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure. *Hypertension* 64, 745–755. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03699>
- Whelton, P.K., Carey, R.M., Aronow, W.S., Casey, D.E., Collins, K.J., Himmelfarb, C.D., DePalma, S.M., Gidding, S., Jamerson, K.A., Jones, D.W., MacLaughlin, E.J., Muntner, P., Ovbiagele, B., Smith, S.C., Spencer, C.C., Stafford, R.S., Taler, S.J., Thomas, R.J., Williams, K.A., Williamson, J.D., Wright, J.T., 2018. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Hypertension 71, 1269–1324. <https://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000066>
- WHO, 2014. Global status report on noncommunicable diseases 2014. World Heal. Organ. <https://doi.org/ISBN 9789241564854>
- Wilkins, B.J., Dai, Y.S., Bueno, O.F., Parsons, S.A., Xu, J., Plank, D.M., Jones, F., Kimball, T.R., Molkentin, J.D., 2004. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 94, 110–118. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000109415.17511.18>
- Wu, L., Shi, A., Zhu, D., Bo, L., Zhong, Y., Wang, J., Xu, Z., Mao, C., 2016. High sucrose intake during gestation increases angiotensin II type 1 receptor-mediated vascular contractility associated with epigenetic alterations in aged offspring rats. *Peptides* 86, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.11.002>
- Wu, Z., Siuda, D., Xia, N., Reifenberg, G., Daiber, A., Münzel, T., Förstermann, U., Li, H., 2015. Maternal treatment of spontaneously hypertensive rats with pentaerythritol

- tetranitrate reduces blood pressure in female offspring. *Hypertension* 65, 232–237. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04416>
- Xiao, D., Dasgupta, C., Li, Y., Huang, X., Zhang, L., 2014. Perinatal nicotine exposure increases angiotensin II receptor-mediated vascular 1. *PLoS One* 9, e108161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108161>
- Xiao, D., Xu, Z., Huang, X., Longo, L.D., Yang, S., Zhang, L., 2008. Prenatal gender-related nicotine exposure increases blood pressure response to angiotensin II in adult offspring. *Hypertension* 51, 1239–47. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.106203>
- Xu, J., Sun, Y., Carretero, O.A., Zhu, L., Harding, P., Shesely, E.G., Dai, X., Rhaleb, N.-E., Peterson, E., Yang, X.-P., 2014. Effects of Cardiac Overexpression of the Angiotensin II Type 2 Receptor on Remodeling and Dysfunction in Mice Post–Myocardial Infarction. *Hypertension* 63, 1251–1259. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03247>
- Yamauchi, T., Mogi, M., Kan-No, H., Shan, B.S., Higaki, A., Min, L.J., Higaki, T., Iwanami, J., Ishii, E.I., Horiuchi, M., 2018. Roles of angiotensin II type 2 receptor in mice with fetal growth restriction. *Hypertens. Res.* 41, 157–164. <https://doi.org/10.1038/S41440-017-0004-2>
- Yildiz, O., Seyrek, M., Gul, H., 2013. Pharmacology of Arterial Grafts for Coronary Artery Bypass Surgery. *Artery Bypass*.

