



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

EFEITOS CARDIOVASCULARES DAS ALATENSINAS

(Des[Asp¹]-[Ala¹]-Angiotensinas)

GIOVANNI NAVES CANTA

Belo Horizonte – MG

2018

GIOVANNI NAVES CANTA

EFEITOS CARDIOVASCULARES DAS ALATENSINAS

(Des[Asp¹]-[Ala¹]-Angiotensinas)

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

Orientador: Prof. Robson Augusto Souza dos Santos

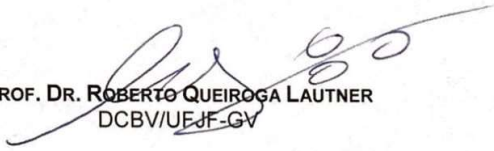
Belo Horizonte, junho de 2018

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Hipertensão Arterial do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob a orientação do Professor Dr. Robson Augusto Souza Santos e na vigência de auxílios concedidos pelo INCT e pela CAPES.

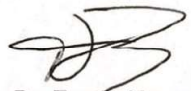
**"EFEITOS CARDIOVASCULARES DAS ALATENSINAS
(DES[ASP1] -[ALA1] -ANGIOTENSINAS)"**

GIOVANNI NAVES CANTA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **08 de junho de 2018**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. ROBERTO QUEIROGA LAUTNER
DCBV/UFJF-GV



PROF. DR. THIAGO VERANO BRAGA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

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

Belo Horizonte, 08 de junho de 2018.

Se um dia, já homem feito e realizado, sentires que a terra cede a teus pés, que tuas obras desmoronam, que não há ninguém à tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta à tua infância e balbúcia, entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre te restarão na alma: minha mãe, meu pai.

(Rui Barbosa)

Àqueles animais que, através de seu olhar, nos falaram de sua vontade de viver; vítimas solicitadas pela ciência para o benefício da humanidade, nosso respeito e toda gratidão.

(Autor desconhecido)

DEDICATÓRIA

Com muito carinho, dedico aos meus pais Vincenzo Canta e Beatriz Naves Canta, exemplos-fonte de meu saber, integridade e caráter.

AGRADECIMENTO

Inicialmente agradeço aos meus pais, tão imprescindíveis na formação do meu caráter, e que regam minha vida com um amor incondicional!

Ao orientador Prof.Dr. Robson Augusto Souza dos Santos pela competência com que conduziu este processo, do alvorecer da ideia até a sua síntese. Agradeço, ainda, ao Prof Robson pelo respeito e compreensão dos momentos difíceis que eventualmente passei ao longo destes anos. Agradeço, também, pelos ensinamentos do valor do trabalho científico.

Ao Professor Dr. Roberto Queiroga Lautner, pois certamente deixou uma marca em mim, um pedaço do seu 'eu', da sua sabedoria, que não atrapalha, que muitas vezes não se consegue rastrear até ela, mas que é o suficiente para alguém falar: "você me lembrou o Lautner". Fico satisfeito! Além disso, minha trajetória acadêmica não teria iniciado sem o Prof. Roberto.

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da UFMG pelo conhecimento transmitido e incentivo científico.

Ao Funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pelo suporte e cordialidade.

A José Roberto pelos ensinamentos práticos desde meu primeiro dia de laboratório e por toda ajuda prestada durante minha caminhada.

A Stephanie Viana pela paciência e ajuda em muitos momentos necessários no laboratório.

A todos amigos do Laboratório de Hipertensão - ICB UFMG que, de alguma forma, contribuíram para esse trabalho. Agradeço pela harmoniosa convivência que tivemos. Em especial ao Jônathas de Almeida, Gabriel Sanglard, Nádia Leão, Mariana Oliveira, Marcos Mello e Aline Oliveira.

Ao grande amigo Lucas Araújo, pela sua agradável companhia durante os experimentos que realizei no laboratório mas também fora do ambiente acadêmico, pela sua inestimável amizade, pelas estimulantes discussões científicas e pelas ricas ajudas dadas na escrita deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, que acompanharam a minha trajetória de vida desde muito: Junior, João e Raphael.

Dedico também em especial a Iara Carolina Silva Lopes, que se apropriou do meu coração desde os tempos finais da graduação. Agradeço por sua cumplicidade, parceria e incentivo contínuo. Muito obrigado por tudo!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A779 – D-Ala⁷-Ang-(1-7), antagonista do receptor *Mas*

Ala¹ – Resíduo de alanina na posição 1, da cadeia peptídica

Ang A – Angiotensina A

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

Ang III – Angiotensina III

Ang IV – Angiotensina IV

Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)

Ang-(1-9) – Angiotensina-(1-9)

Asp¹ – Resíduo de aspartato na posição 1, da cadeia peptídica

AT₁ – Receptor para angiotensina II tipo 1

AT₂ – Receptor para angiotensina II tipo 2

CHO – Células de Ovário da Hamster

CVLM – bulbo ventrolateral caudal

D-pro⁷- D-pro⁷-Ang-(1-7), antagonista do receptor MrgD

ECA – Enzima Conversora da Angiotensina

ECA2 – Enzima Conversora da Angiotensina tipo 2

FC – Frequência Cardíaca

i.v – intravenoso

KO – Knockout

LPS – Lipopolissacarídeos

Mas – Receptor *Mas*

MrgD – Receptor MrgD

NEP – Endopeptidase Neutra

ng – nano grama

NO – Óxido Nítrico

PA – Pressão arterial

PAM – Pressão Arterial Média

PAP – pressão arterial pulsátil

PE10 – Tubo de Polietileno N° 10

PE50 – Tubo de Polietileno N° 50

PEP – Prolyl endopeptidase

Phe⁸ – Resíduo de fenilalanina na posição 8, da cadeia peptídica

Pro⁷ – Resíduo de prolina na posição 7, da cadeia peptídica

RVLM – Bulbo ventrolateral rostral

SD – Sprague-Dawley

SRA – Sistema renina angiotensina

WT – Wild type

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Experimento de Tigerstedt. Efeito pressor do extrato bruto de rim em quatro coelhos.....	16
Figura 2- Visão clássica do sistema renina angiotensina.	19
Figura 3- Visão moderna do sistema renina angiotensina.....	22
Figura 4- Processo enzimático da descarboxilação do resíduo de aspartato com formação da Angiotensina A e sua posterior metabolização em alamandina via enzima ECA2.....	26
Figura 5- Cascata do SRA simplificada e as vias de formação da Alamandina.	27
Figura 6- Alterações da PAM e da FC após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ang I ou Ala1-Ang I.	37
Figura 7- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ala1-Ang I ou Ala1-Ang I após administração de captopril.	38
Figura 8- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ala1-Ang I ou Ala1-Ang I após administração de captopril e D-pro7.	38
Figura 9- Alterações da PAM após administração intravenosa,in bolus, de doses crescentes de Ala1-Ang I ou Ala1-Ang I após administração de D-pro7.....	39
Figura 10- Alterações da PAM e da FC após administração intravenosa,in bolus, de doses crescentes de Ang II ou Ang A.	40
Figura 11- Alterações da PAM após administração intravenosa,in bolus, de doses crescentes de Ang A ou Ang A após administração de D-pro7.....	41
Figura 12- Visualização gráfica da área sob a curva produzida pelo efeito do peptídeo Ang A ou Ang A após administração de D-pro7.....	41
Figura 13- Efeito da Ang A ou Ang A após administração de Dpro7 sobre a pressão arterial ao longo do tempo. Aumento da duração do efeito promovido em ratos tratados com Dpro7, antagonista do receptor MrgD	42
Figura 14- Alterações da PAM e da FC após administração intravenosa,in bolus, de doses crescentes de Ala1-Ang-(1-9).	42
Figura 15- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ala1-Ang-(1-9) ou Ala1-Ang-(1-9) após administração de Losartan.	43
Figura 16- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ala1-Ang-(1-9) ou Ala1-Ang-(1-9) após administração de Losartan e D-pro7.....	44

Figura 17- Efeito induzido pelo peptídeo Ala1-Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD.	44
Figura 18- Alterações da PAM e da FC após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de alamandina.	45
Figura 19- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de alamandina ou alamandina após administração de Dpro7.	46
Figura 20- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de alamandina ou alamandina após administração de losartan.	47
Figura 21- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de alamandina ou alamandina após administração de losartan e Dpro7.	47
Figura 22- Visão hipotética do novo eixo paralelo ao Sistema Renina-Angiotensina clássico.....	50

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	12
1 REVISÃO DA LITERATURA	16
1.1 Abordagem histórica do sistema renina-angiotensina	16
1.2 Sistema renina-angiotensina (visão clássica)	18
1.3 Sistema renina-angiotensina (visão moderna)	20
1.3.1 Vias não clássicas do sistema renina-angiotensina	22
1.3.2 Eixo: angiotensina A/ alamandina / MrgD	24
1.3.2.1 Angiotensina A	24
1.3.2.2 Alamandina	26
2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivo Específico	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Animais	31
4.2 Reatividade vascular	31
4.2.1 Avaliação do efeito da Ala ¹ -Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD normotensos.	31
4.3 Avaliação do efeito da administração aguda dos peptídeos sobre a PA e FC em ratos normotensos	32
4.3.1 Implantação de cânula na artéria e veia femoral	32
4.3.2 Registro das variáveis cardiovasculares em animais acordados	33
4.3.3 Protocolos experimentais	33
4.4 Análise Estatística	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Efeitos cardiovasculares da administração aguda do peptídeo Ala ¹ -Ang I em ratos SD.	37
5.2 Efeitos cardiovasculares da administração aguda do peptídeo Angiotensina A em ratos SD.	39
5.3 Efeitos cardiovasculares da administração aguda do peptídeo Ala ¹ -Ang-(1-9) em ratos SD.	42
5.4 Efeitos cardiovasculares da administração aguda do peptídeo alamandina em ratos SD.	45
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	55

RESUMO

Introdução e objetivo: Ao longo dos anos novos peptídeos, enzimas e receptores foram descritos como componentes do sistema renina-angiotensina (SRA). Atualmente, um novo eixo tem sido aceito como parte integrante deste sistema, as alatensinas, termo elaborado pelo pesquisador Robson Augusto S. dos Santos. Essa nova família de peptídeos do SRA apresenta estrutura Des[Asp¹]-[Ala¹]-Angiotensinas. Sendo assim, a sequência desses peptídeos difere dos demais peptídeos do eixo clássico do SRA em apenas um resíduo de aminoácido no N-terminal: um resíduo de Ala¹ ao invés do resíduo de Asp¹. Em 2007 e 2013, trabalhos descreveram a existência de dois novos peptídeos vasoativos no plasma humano, nomeados de angiotensina A (Ang A) e alamandina, respectivamente. Trabalhos recentes demonstraram que a Ang A parece exercer seu efeito vasoconstritor via receptor AT₁, enquanto a alamandina, a partir de seu receptor MrgD, induz usualmente efeitos opostos àqueles produzidos pela ativação do receptor AT₁. Embora o conhecimento das ações biológicas desses peptídeos em condições fisiológicas e patológicas tenha expandido nos últimos anos, ainda é bem limitado. Neste estudo, avaliamos os efeitos cardiovasculares da injeção intravenosa (i.v.) de alatensinas [Ala¹-Ang I, Ala¹-Ang-(I-9), Ang A e alamandina] em animais normotensos. **Métodos:** Para a realização deste estudo, foram utilizados ratos Sprague-Dawley (SD) com 12 semanas de idade. Para a avaliação dos parâmetros cardiovasculares *in vivo* e injeção de drogas, foi realizada a canulação da artéria e da veia femoral, respectivamente, seguida pela avaliação direta da pressão arterial (PA) a partir de um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados (Biopac®, EUA). Para a avaliação dos efeitos desses peptídeos sobre o relaxamento vascular, foi utilizada a técnica de reatividade vascular. **Resultados:** A injeção i.v. de Ala¹-Ang I produziu efeito pressor dose-dependente, o qual foi totalmente abolido na presença de captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA). Esses resultados sugerem que o efeito observado esteja relacionado à formação de Ang A. Além disso, houve potencialização do efeito pressor do peptídeo na presença de Dpro⁷, antagonista do receptor MrgD, sugere que a Ala¹-Ang I é também um substrato para a formação de alamandina. A injeção i.v. de Ang A, induziu, assim como esperado, o aumento dose-dependente da PA. De forma interessante, a administração de D-pro⁷

aumentou a duração do efeito da Ang A, sugerindo a formação de alamandina a partir do metabolismo da Ang A. A Ala¹-Ang-(1-9) produziu relaxamento vascular dose-dependente em anéis de aorta de ratos SD. Entretanto, diferente dos resultados observados *ex-vivo*, a injeção i.v. de Ala¹-Ang-(1-9) não induziu alterações importantes na PA de ratos SD. Por outro lado, a administração de Ala¹-Ang-(1-9) na presença de Losartan, antagonista do receptor AT₁, reduziu a PA, enquanto a administração do peptídeo na presença de Losartan e D-pro⁷ aboliu o efeito hipotensor, sugerindo a possível formação de alamandina a partir da Ala¹-Ang-(1-9). A alamandina, último peptídeo desta rota enzimática, apresentou efeito com curva em U sobre a PA de ratos SD, ou seja, as doses intermediárias de alamandina induziram maior redução da PA em relação às menores e maiores doses do peptídeo, sendo a dose de 0,02 ng a que induziu maior redução da PA. O efeito hipotensor induzido pela injeção i.v. de alamandina foi abolido na presença de D-pro⁷, o que confirma que a alamandina é o ligante endógeno para o receptor MrgD. Além disso, o pré-tratamento de ratos SD com o Losartan potencializou o efeito hipotensor da injeção i.v. de alamandina, o que sugere o envolvimento do receptor AT₁ nos efeitos observados.

Conclusão: Este estudo demonstrou que os peptídeos que compõem o eixo das alateninas são biologicamente ativos e que o metabolismo desses peptídeos leva, de forma direta ou indireta, à formação de alamandina.

Palavras-chave: Sistema renina angiotensina, pressão arterial, Ala¹-Ang I, Ala¹-Ang-(1-9), angiotensina A, alamandina.

ABSTRACT

Background and aim: Over the years new peptides, enzymes and receptors were described as components of the renin-angiotensin system (RAS). Currently, a new axis, composed by alatensins, a term suggested by the researcher Robson Augusto S. dos Santos, has been accepted and added to the RAS. This new family of peptides presents a Des[Asp¹]-[Ala¹]-Angiotensins structure. Therefore, the sequence of these peptides differs from the sequence of the peptides of the classical axis of the RAS in only an amino acid residue at the N-terminal: a Ala¹ residue instead a Asp¹ residue. In 2007 and 2013, studies described two new vasoactive peptides in the human plasma named angiotensin A (Ang A) and alamandine, respectively. Recent studies have shown that Ang A seems to have a vasoconstrictive effect through AT₁ receptor while alamandine normally shows opposite effects through its receptor MrgD. Although the knowledge about the biological actions of these peptides in physiological and pathophysiological conditions has expanded in the last years, it is still limited. In this study, we evaluated the cardiovascular effects of the intravenous (i.v.) injections of alatensins [Ala¹-Ang I, Ala¹-Ang-(1-9), Ang A and alamandine] in normotensive animals.

Methods: To perform this study, we used 12 weeks old Sprague-Dawley (SD) rats. To assess the cardiovascular parameters *in vivo* and to inject drugs, we cannulated the femoral artery and vein respectively, which was followed by an invasive assessment of arterial pressure (AP) through a pressure transducer coupled to data acquisition system (Biopac®, USA). To evaluate the effects of these peptides on vascular relaxation, vascular reactivity technique was used. **Results:** The i.v. injection of Ala¹-Ang I produced a dose-dependent pressor effect which was abolished by Captopril, inhibitor of the angiotensin converting enzyme (ACE). These results suggest that the observed effect is related to the formation of Ang A. Beside that, the potentiation of the peptide's pressor effect with Dpro⁷, MrgD receptor antagonist, suggest that Ala¹-Ang I is also a substrate for the formation of alamandine. The i.v. injection of Ang A, induced as expected an dose-dependent increase in AP. Interestingly, D-pro⁷ administration increased the duration of the effect, suggesting the formation of alamandine from the metabolism of Ang A. Ala¹-Ang-(1-9) produced a dose-dependent vascular relaxation at aortic rings from SD rats. However, unlike the *ex-vivo* observed results, i.v. injection of Ala¹-Ang-(1-9) did not induce important changes on the AP of SD rats. On the other hand, Ala¹-Ang-(1-9) administration with Losartan, AT₁ receptor antagonist, decreased

the AP, while the administration of the peptide with Losartan and D-pro⁷ abolished the depressor effect, which indicated the formation of alamandine from Ala¹-Ang-(1-9). Alamandine, the last peptide of this enzymatic route, presented a U-shaped curve effect on AP of SD rats, i.e., the intermediate doses of alamandine decreased more the AP than the lower and higher doses of the peptide, being the 0.02 ng dose that induced the greater reduction on AP. The depressor effect caused by the i.v. injection of alamandine was abolished by D-pro⁷, confirming alamandine as an endogenous ligand of the MrgD receptor. Moreover, the pre-treatment of SD rats with Losartan potentiated the depressor effect observed with the i.v. injection of alamandine, suggesting that AT₁ receptor is involved in the observed results. **Conclusion:** This study demonstrated that peptides of the alatensins axis of the RAS are biologically active and the metabolism of these peptides leads, directly or indirectly, to the formation of alamandine.

Key-words: Renin-angiotensin system; arterial pressure; Ala¹-Ang I; Ala¹-Ang-(1-9); angiotensin A, alamandine.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Abordagem histórica do sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) e suas ações biológicas na regulação da pressão arterial (PA) e do equilíbrio hidroeletrólítico são alvos de estudos desde o final do século XIX. Em 1898, o finlandês Robert A. Tigerstedt, professor de fisiologia no instituto karoliska na Suécia e seu aluno de medicina Bergman, ambos inspirados pelos experimentos do francês Charles Edouard Brown Séquard que utilizava extratos de glândulas para estudar as funções das “secreções internas”, foram os primeiros pesquisadores envolvidos diretamente neste tema. Tigerstedt infundiu extrato de rim de um coelho doador na veia jugular de outro coelho e observou o aumento da pressão sanguínea no animal, deste modo, inferiram a presença de um componente pressor no rim e baseado em sua origem, nomearam-no de renina (Figura 1).

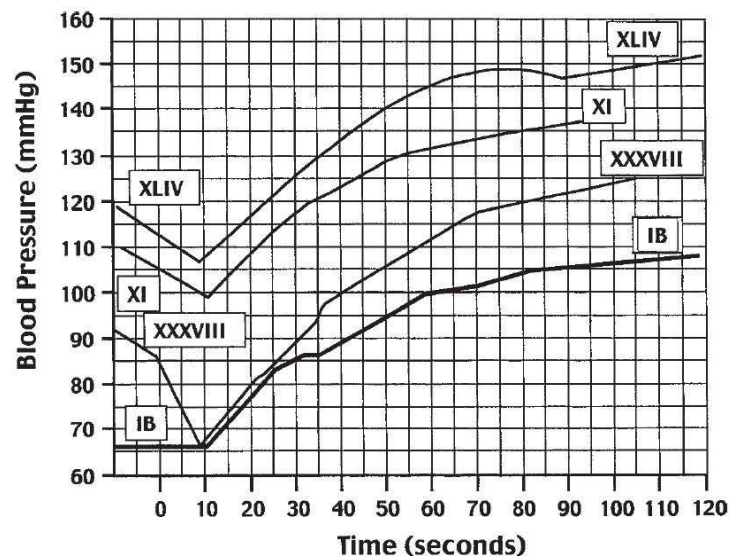


Figura 1- Experimento de Tigerstedt. Efeito pressor do extrato bruto de rim em quatro coelhos. Fonte: (HALL, JOHN E., [S.d.]

Observaram também que o princípio ativo estava presente apenas na região cortical do parênquima renal e que a resposta pressora era independente de um sistema nervoso intacto (TIEGERSTEDT R, 1898). Como consequência de seus trabalhos, foram realizados ao longo dos anos várias tentativas em desenvolver um

modelo experimental de hipertensão arterial através da manipulação da função renal (JANEWAY, 1909)

Entretanto, o primeiro experimento de sucesso após os trabalhos de Tiegerstedt foi realizado somente em 1934 por Harry Goldblatt e colaboradores, que induziram hipertensão em cães através da constrição parcial da artéria renal usando um clip metálico (GOLDBLATT *et al.*, 1934). Seus resultados foram confirmados por diferentes grupos (FREEMAN; PAGE, 1937), iniciando-se assim a busca pelos mecanismos envolvidos no aumento da pressão arterial naquele modelo.

Dois grupos de pesquisas, trabalhando de forma independente, foram os responsáveis pela caracterização inicial do SRA. Dr. Braun Menendez liderou o grupo Argentino na universidade de Buenos Aires, enquanto Dr. Page conduziu as pesquisas em Indianapolis, nos Estados Unidos (INAGAMI, 1998).

No ano de 1939 e 1940, Braun-Menendez e seus colaboradores pela primeira vez reconheceram a renina como uma enzima que age em seu substrato, denominado por este grupo de hipertensinogênio, gerando a “hipertensina”, o peptídeo efetor (BRAUN-MENENDEZ *et al.*, 1940). O grupo de Indianapolis obteve conclusões similares e foi o responsável por sintetizar, pela primeira vez, o octapeptídeo efetor, denominado por este grupo de “angiotonina” (BUMPUS; SCHWARZ; PAGE, 1957). Como consequência das diferentes nomenclaturas entre os dois grupos, em 1957 uma conferência foi organizada a fim de unificar as terminologias, atualmente reconhecidas como angiotensinogênio para o substrato e angiotensina para o efetor (BRAUN-MENENDEZ; PAGE, 1958).

Um terceiro grande salto foi realizado no início dos anos 50, quando Skegss e seus colaboradores demonstraram que a angiotensina está presente em duas formas: a angiotensina I (Ang I), um decapeptídeo que após ser clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), forma a angiotensina II (Ang II), o peptídeo vasoativo efetor (SKEGGS, L. T. *et al.*, 1954; SKEGGS, LEONARD T.; KAHN; SHUMWAY, 1956).

Em vista destas descobertas, a identificação e caracterização dos receptores angiotensinérgicos tornou-se um campo de estudo vasto e desafiante. Um grande avanço no entendimento da biologia do SRA foi obtido a partir da clonagem e do sequenciamento de receptores angiotensinérgicos e da descoberta de antagonistas específicos para receptores de Ang II. Somente no final do século passado, com base em vários estudos de binding foi proposta a designação de AT₁ para receptores

inibidos pelo Losartan (Dup753,MK954) e AT₂ para os receptores inibidos pelo PD 123177 e seus análogos, no entanto a multiplicidade de receptores angiotensinérgicos vai bem além dessa classificação original (BRUNNER *et al.*, 1994; TIMMERMANS *et al.*, 1993). Tanto AT₁ quanto AT₂ possuem sete segmentos transmembranares formando alfa-hélices na bicamada lipídica acoplado à proteína G (Chiu *et al.*, 1989; Bottari *et al.*, 1992; Bumpus *et al.*, 1991; Wong *et al.*, 1990a; Wong *et al.*, 1990b).

Em síntese, este conjunto de importantes trabalhos clássicos estabeleceram a arquitetura inicial do SRA e abriram o caminho para nossa compressão atual do sistema que sofreu e sofre constantes ampliações (DZAU, 1988; ERDOS; YANG, 1967; LARAGH *et al.*, 1960; LIN; GOODFRIEND, 1970; SANTOS, R. A. *et al.*, 1988).

1.2 Sistema renina-angiotensina (visão clássica)

O sistema renina-angiotensina (SRA) é uma coordenada cascata hormonal circulante, sendo um dos principais reguladores das funções cardiovasculares e renais. Seus efeitos incluem a regulação humoral e neuro-hormonal da pressão arterial e do balanço hidroeletrolítico do organismo, contribuindo de forma essencial para a homeostase corporal (HALL, J. E.; GUYTON; MIZELLE, 1990).

A visão clássica da formação dos peptídeos do SRA consiste em uma sequência de reações que têm início com a renina, uma enzima proteolítica sintetizada pelos rins à nível das células justaglomerulares e liberada para a corrente sanguínea em resposta a uma série de estímulos fisiológicos, que incluem: redução da perfusão sanguínea renal, diminuição da concentração de cloreto de sódio no conteúdo tubular distal e estimulação da inervação simpática renal. Seu substrato, o angiotensinogênio, uma *alfa-2 globulina* é sintetizada principalmente pelos hepatócitos (SOFFER, 1976)

A hidrólise do segmento amino-terminal do angiotensinogênio pela renina leva à formação do decapeptídeo biologicamente inativo, angiotensina I (Ang I), que, por sua vez, é hidrolisada através da remoção do dipeptídeo His-Leu da porção C-terminal pela enzima conversora de angiotensina (ECA), produzindo assim, a angiotensina II (Ang II) (NG; VANE, 1967)

A Ang II é um peptídeo composto por 8 resíduos de aminoácidos e considerado o principal efetor deste sistema, sendo responsável pelos diversos efeitos biológicos exercidos pelo SRA a partir de seus receptores angiotensinérgicos do tipo 1 e 2 (AT₁R

e AT₂R) que apresentam sete domínios transmembranares acoplados às proteínas G_q e G_i, respectivamente (KASCHINA; UNGER, 2003). Estes receptores diferem entre si por suas massas moleculares, mecanismos de sinalização, funções e expressão tecidual (MENDOZA-TORRES *et al.*, 2015). Enquanto os receptores AT₁ são amplamente distribuídos, a expressão dos receptores AT₂ é mais limitada. Sabe-se que esses receptores estão presentes principalmente em tecidos fetais em desenvolvimento, o que sugere uma possível participação na morfogênese dos órgãos (KIM; IWAO, 2000).

O octapeptídeo Ang II atua principalmente via seu receptor AT₁, para produzir diversas respostas fisiológicas, como vasoconstrição, reabsorção renal de sódio, proliferação celular e secreção de aldosterona (MEHTA; GRIENGLING, 2007). Como neuroregulador, a Ang II modula o controle central da pressão arterial, atividade simpática, a sede, o apetite ao sal, e estimula a atividade noradrenérgica periférica. Contudo, a Ang II pode interagir também com o receptor AT₂, no qual apresenta 34% de homologia com AT₁R, produzindo, usualmente, efeitos opostos àqueles produzidos pela ativação do receptor AT₁ (Figura 2) (FUNKE-KAISER *et al.*, 2010; HENRION; KUBIS; LÉVY, 2001)

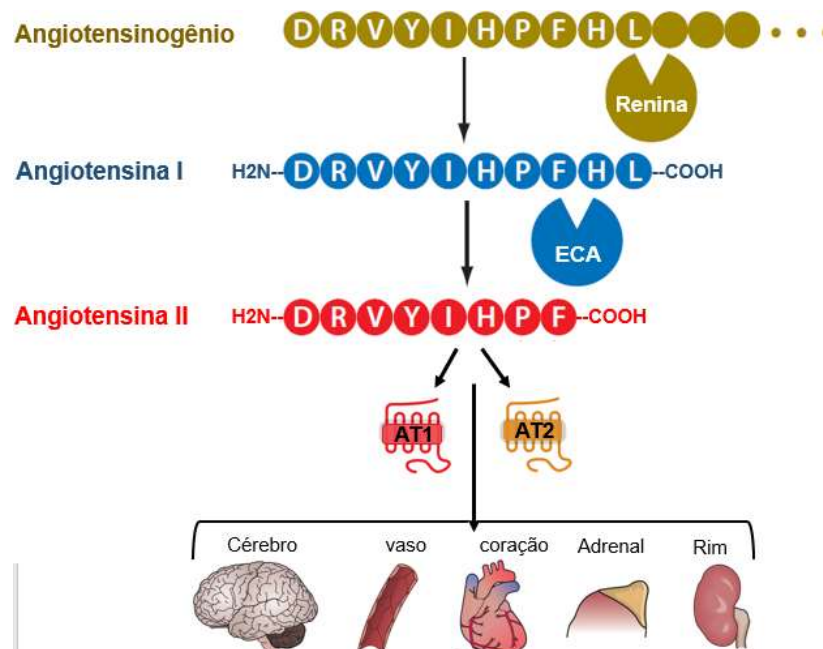


Figura 2- Visão clássica do sistema renina angiotensina.
Fonte: modificada de (Bader, 2010)

Embora a ativação do SRA seja uma resposta essencial na regulação dos processos fisiológicos para manter a homeostase corporal e a vida, a hiperatividade do eixo clássico representada pela renina / Ang I / ECA / Ang II / AT₁, em combinação com outros fatores de risco cardiovascular está criticamente envolvida em uma série de efeitos deletérios, o que incluem: desequilíbrio dos tónus basais da árvore vascular, disfunção endotelial, proliferação celular, remodelamento, fibrose e efeito arritmogênico (TIMMERMANS *et al.*, 1992).

Em vista disso, este clássico eixo do SRA tem sido desde a década de 1970 alvo farmacológico para o tratamento de doenças cardiovasculares. Destaca-se aqui os trabalhos de Ferreira e colaboradores que em 1965 demonstraram que o veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca* continha um fator, denominado BPF (bradykinin-potentiating factor)(FERREIRA, 1965), capaz de potenciar os efeitos farmacológicos do peptídeo bradicinina *in vivo* e *in vitro*. Posteriormente, demonstrou-se a capacidade do BPF em inibir a conversão enzimática na Ang I no leito vascular pulmonar. A partir dos trabalhos de purificação do BPF a terminologia foi substituída por inibidores da enzima de angiotensina(FERREIRA *et al.*, 1970; FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970). Posteriormente baseando-se no sítio de clivagem desta enzima, desenvolveu-se um inibidor da ECA, inibidor este que representou um marco na descoberta do captopril e outros que se seguiram(CUSHMAN *et al.*, 1977; ONDETTI *et al.*, 1971).

Além do já citado inibidores da ECA, cabe destacar os inibidores da renina e os antagonistas específicos do receptor AT₁, empregados amplamente no controle da hipertensão arterial, da insuficiência cardíaca, do infarto agudo do miocárdio, da insuficiência renal, das nefropatias proteinúricas, dentre outras doenças correlacionadas.

Considerando o importante impacto dessas alterações promovidas pela hiperatividade do eixo clássico do SRA, estudos que visem esclarecer os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na modulação desse sistema, bem como, a identificação de novos alvos terapêuticos, são necessários.

1.3 Sistema renina-angiotensina (visão moderna)

Tradicionalmente, acreditava-se que o principal efector do eixo, Ang II, era formado exclusivamente no sangue e em seguida distribuído aos principais órgãos e

tecidos pelo fluxo sanguíneo. Entretanto, uma revisão de conceitos emergiu após a demonstração de que a maioria dos seus componentes possuem características além de endócrinas, parácrinas e autócrinas podendo ser produzidas localmente em diferentes tecidos, como o rim, coração, cérebro, tecido adiposo, pâncreas, vasos, placenta e outros (DZAU, 1988; TAUGNER *et al.*, 1982; GANTEN; SPECK, 1978; SCHLING *et al.*, 1999; SNYDER; WATT; WINTROUB, 1985; CASSIS; LYNCH; PEACH, 1988). Corroborando a visão atualizada do SRA, inúmeros trabalhos demonstraram que além da renina e da ECA, outras enzimas são capazes de formar respectivamente Ang I (Tonina e catepsina D) e Ang II (tonina, catepsina G, Quimase, catepsina A). Contudo, a real importância dessas vias alternativas para a formação destes peptídeos ainda não foi totalmente elucidada (FERRARIO, CARLOS M. *et al.*, 2010).

Além disso, o efeito final da ativação do SRA é bastante complexo e baseia-se não apenas nos efeitos da Ang II, mas também nas ações de outros produtos biologicamente ativos recentemente descritos, provenientes do metabolismo da Ang I e da própria Ang II: Ang-(1-12), Ang III, Ang IV, Ang-(1-9), Ang-(1-7) e seu receptor *Mas*, angiotensina A, alamandina e seu receptor *MrgD*. (Figura 3) (NAGATA *et al.*, 2006; SNYDER; WATT; WINTROUB, 1985; SANTOS, R. A. *et al.*, 1988; JANKOWSKI *et al.*, 2007; LAUTNER *et al.*, 2013; CAREY, 2013).

Cabe, também, destacar a importância das inúmeras técnicas fisiofarmacológicas associadas à genômica moderna e métodos de detecção proteica que nos últimos anos permitiram esta importante ampliação do conceito inicial do SRA, no qual uma cascata linear e relativamente simples deu lugar a um sistema complexo e com características contrarregulatórias intrínsecas (FERRARIO, C. M. *et al.*, 1997).

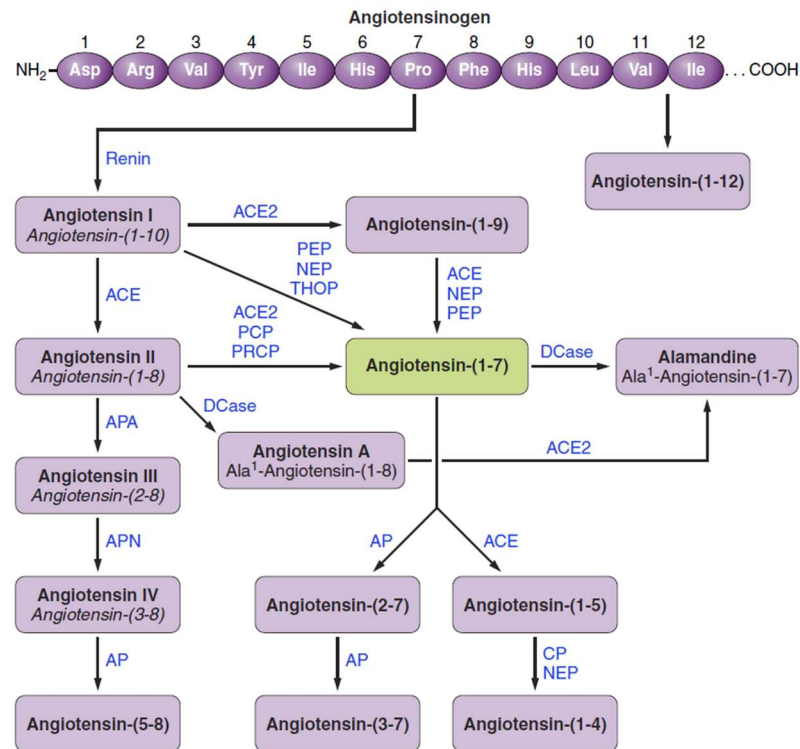


Figura 3-Visão moderna do sistema renina angiotensina
Fonte: (Santos et al., 2018)

1.3.1 Vias não clássicas do sistema renina-angiotensina

O conceito de contrarregulação intrínseca do SRA emergiu juntamente com a descoberta de uma importante via não clássica representada pelo peptídeo angiotensina (1-7), seu receptor *Mas* e a enzima ECA2.

A visão que se tinha do SRA começou a mudar quando, em 1988, Santos e colaboradores identificaram a formação do heptapeptídeo Ang-(1-7) a partir da Ang I por uma via independente da ECA (SANTOS, R. A. *et al.*, 1988). Ainda em 1988, Schiavone e colaboradores demonstraram que a Ang-(1-7) estimula a liberação de vasopressina pela neurohipófise (SCHIAVONE *et al.*, 1988). Um ano depois, Campagnole-Santos e colaboradores ao injetar Ang-(1-7) no núcleo do trato solitário de ratos descreveram as primeiras ações in vivo (Campagnole-Santos *et al.*, 1989).

Em 2000, a identificação de uma nova carboxipeptidase (ECA2), revelou a presença de uma via enzimática distinta para produção de Ang-(1-7) (DONOGHUE *et al.*, 2000). A ECA2 é um homólogo da ECA endotelial humana, que apresenta 40- 42% de homologia com essa enzima, sendo classificada como uma zinco-metaloprotease (TURNER; HOOPER, 2002). Esta enzima, ECA2, gera a Angiotensina-(1-7)

diretamente da Ang II via clivagem do aminoácido fenilalanina C terminal. A ECA2 pode ainda converter Ang I em angiotensina (1-9) via clivagem do aminoácido Leucina no C terminal, então, Ang-(1-9) pode ser subsequentemente hidrolisada pela ECA ou endopeptidase neutra, formando assim Ang-(1-7) (CHAPPELL *et al.*, 1998; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS; ANDRADE, 2000; VICKERS *et al.*, 2002)

Atualmente, devido a estudos realizados em nosso laboratório, sabe-se que boa parte das ações da Ang-(1-7) ocorrem por estímulo do seu receptor específico, o Mas, um receptor até então órfão, acoplado à proteína G e codificado pelo protooncogene *Mas*. Além disso, também foi mostrado que em cultura de células CHO (ovário de hamster chinês), transfectadas com *Mas*, a Ang-(1-7) apresenta alta afinidade de ligação. Essa ligação da Ang-(1-7) ao receptor *Mas* pode ser deslocada pelo antagonista específico, o A-779, mas não pelos antagonistas dos receptores AT₁ ou AT₂, CV11974 e PD123319, sugerindo que o A-779 é um antagonista específico para o receptor *Mas* (Santos *et al.*, 2003).

Estudos indicam que ações exercidas pela Ang-(1-7), através de seu receptor *Mas* são capazes de atenuar os efeitos deletérios mediados pela Ang II. Destacam-se aqui seu efeito vaso dilatador local e sistêmico e efeito cardioprotetor (ALMEIDA *et al.*, 2000; LEMOS, VIRGÍNIA S. *et al.*, 2002; LEMOS, VIRGINIA S. *et al.*, 2005). A Ang-(1-7) demonstrou também ter efeito antiproliferativo, antifibrotico, antioxidante, hipoglicemiante e dentre outros (SANTOS *et al.*, 2018), que, somados com a identificação da ECA2, e do *Mas*, acrescentaram maior suporte ao conceito de dois eixos contra regulatórios do SRA; o eixo ECA/Ang II/AT₁ com ações deletérias quando super-expresso, e o eixo ECA2/Ang-(1-7)/*Mas* com ações opostas àquelas observados do eixo clássico.

Além disso, cabe resaltar que os efeitos protetores do eixo ECA2 podem ser atribuídos a degradação da Ang I à Ang-(1-9), limitando assim a disponibilidade do substrato para a ECA, juntamente com a degradação da Ang II e a geração de Ang-(1-7). Sendo assim, a perda da atividade da ECA2 resulta na ativação do eixo Ang II / AT₁R e na progressão de doenças cardiovasculares, enquanto o aumento da atividade da ECA2 leva à ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/*Mas* e consequente proteção cardiovascular (MENDOZA-TORRES *et al.*, 2015)

Ainda mais recente, um novo eixo contra-regulatório baseado em peptídeos dos quais o aspartato aminoterminal é substituído por alanina, foi descrito. Esse novo eixo é formado pela: angiotensina A/ alamandina / receptor MrgD, parece fornecer

novos entendimentos à fisiopatologia cardiovascular. Esta nova classe de peptídeos começou a ser caracterizada no ano de 2007, quando Jankowski e colaboradores descreveram pela primeira vez uma angiotensina biologicamente ativa que continha o aminoácido Alanina no lugar do Aspartato na posição inicial N-terminal, denominada pelo grupo de angiotensina A (JANKOWSKI *et al.*, 2007).

1.3.2 Eixo: angiotensina A/ alamandina / MrgD

1.3.2.1 Angiotensina A

Em 2007, Jankowski e seus colaboradores descreveram a existência de um novo octapeptídeo vasoativo no plasma humano, nomeando-o de Angiotensina A, onde “A” entende-se por alanina. A sequência deste peptídeo (Ala–Arg–Val–Tyr–Ile–His–Pro–Phe) difere da Ang II em apenas um aminoácido: Ala¹ no lugar do resíduo de Asp¹. Supostamente sua via de formação é através da descarboxilação do resíduo de aspartato da Angiotensina II. Sua formação foi originalmente demonstrada em leucócitos mononucleares de humanos. Entretanto, até o presente momento, a natureza, tipos de substrato e distribuição tecidual da enzima descarboxilase permanece incerto (JANKOWSKI *et al.*, 2007).

As concentrações plasmáticas da angiotensina A em humanos saudáveis mostrou ser menor do que 20% da concentração normal de Ang II. Entretanto, a razão Ang A / Ang II subiu, aproximadamente, de 0,2 para 0,7 em paciente com insuficiência renal estágio 5. Corroborando ainda estes dados, demonstrou-se que diferentemente da Ang II, a vasoconstrição mediada pela Ang A foi nitidamente reduzida em aorta de ratos alimentados com dieta aterogênica, sugerindo o papel relevante da razão Ang A/ Ang II circulante em situações patológicas (HABIYAKARE *et al.*, 2014; JANKOWSKI *et al.*, 2007).

As ações biológicas promovidas pela Ang A dependem dos receptores AT₁ e AT₂ e assim como a Ang II, também provoca vasoconstrição, efeito pró-proliferativo e aumento da PA. Entretanto, é necessária uma dose maior de Ang A para se alcançar o mesmo efeito máximo que a Ang II (COUTINHO *et al.*, 2014; HRENAK; PAULIS; SIMKO, 2016). Sua menor potência farmacológica foi explicada por Jankowski *et al.* (2011) como sendo o resultado de sua ação como agonista parcial. Contudo, foi

exposto por outros autores que a atividade intrínseca da Ang A e Ang II sobre o receptor AT₁ são semelhantes e que portanto sua menor potência poderia ser explicada por razões farmacocinéticas (YANG, RUI *et al.*, 2011).

Jankowski *et al.* (2007), em modelo de rim isolado demonstrou o efeito vasoconstritor da Ang A, no qual foi inibido por antagonistas do receptor AT₁, enquanto a utilização de antagonista de receptor AT₂ não levou a nenhuma alteração significativa no efeito. Habiyakare, *et al.* (2014) obtiveram conclusões semelhantes em experimentos *in vivo* ao aplicar angiotensina A de forma IV e intra-renal em ratos WT e SHR, onde Ang A diminuiu a perfusão renal e aumentou a PAM. O Candezartan, antagonista do receptor AT₁, reverteu o efeito da Ang A, enquanto PD123319 antagonista de AT₂ não afetou a perfusão (YANG, RUI *et al.*, 2011).

Corroborando os trabalhos anteriores, Coutinho *et al.* (2014), em modelo de coração isolado, evidenciou a ação vasoconstritora da Ang A, entretanto, ao associar Losartan, antagoista de AT₁, o efeito foi revertido apenas parcialmente e não abolido como no trabalho de Yang *et al.* (2011). Além disso, enquanto a administração de Ang II provocou aumento da duração de taquiarritimia e fibrilação ventricular no período de repercussão após isquemia, o mesmo não foi observado para Ang A. Neste mesmo trabalho, Ang A, diferentemente da Ang II, não afetou a amplitude do transiente de cálcio em cardiomiócitos isolados. Este conjunto de trabalhos demonstram, portanto, que embora suas ações são em sua maioria semelhantes aos da Ang II, Ang A, também parece exercer efeitos cardiovasculares próprios. (COUTINHO *et al.*, 2014)

Posteriormente, em 2013, Lautner e colaboradores observaram que a Ang A poderia ser subsequentemente degradada pela ECA2 e formar um novo heptapéptido que mantinha a mesma alteração na posição N terminal, chamado pelo grupo de alamandina (Ala¹-Ang-(1-7)) (Figura 4). Em comparação com a Ang A, onde seus efeitos biológicos se assemelham ao seu análogo Ang II e partilham, inclusive, dos mesmos receptores: AT₁ e AT₂; os efeitos cardiovasculares da alamandina apesar de serem, em sua maioria, semelhantes às observadas com a angiotensina-(1-7) / receptor Mas, dependem da interação com o receptor MrgD (Mas-related G-protein-coupled receptor, member D).

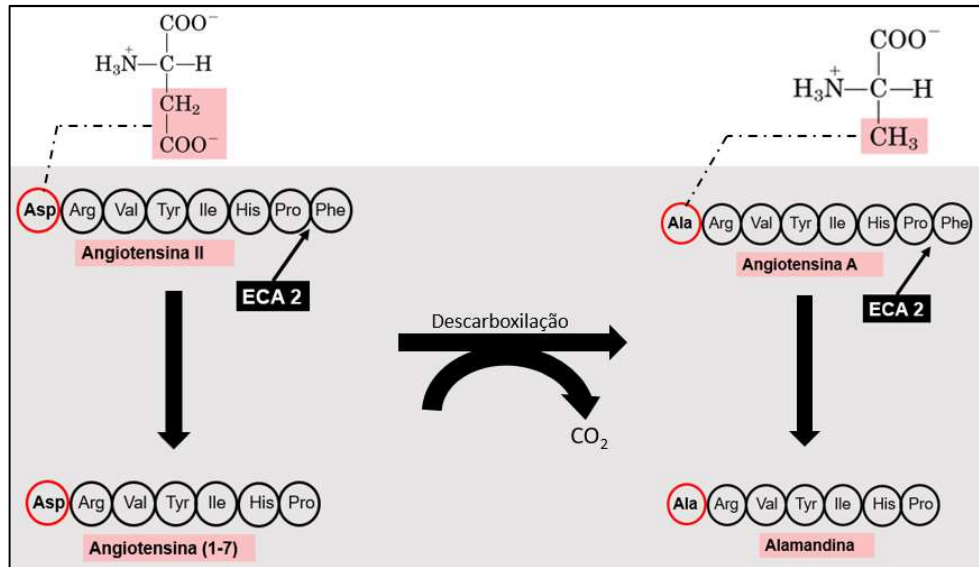


Figura 4- Processo enzimático da descarboxilação do resíduo de aspartato com formação da Angiotensina A e sua posterior metabolização em alamandina via enzima ECA2.

Fonte: (elaborada pelo autor)

1.3.2.2 Alamandina

Uma vez que a Ang A tem marcantes similaridades com a Ang II, nosso grupo hipotetizou que a Ang A poderia ser consequentemente substrato para ECA2, formando um heptapeptídeo similar a Ang-(1-7), porém mantendo a mesma modificação no segmento N-terminal: Ala¹ no lugar de Asp¹. Em 2013, Lautner, Vilella e colaboradores, pertencentes do nosso grupo de pesquisa, confirmaram esta hipótese ao incubarem Ang A na presença da enzima conversora de angiotensina 2 recombinantes humana (hECA2). Após a incubação, uma nova massa molecular foi detectada no espectrômetro de massa, obedecendo exatamente à massa do peptídeo Ala¹-Ang-(1-7) que posteriormente foi batizado de alamandina (855,135 Da). Além disso, os autores, em modelo de coração isolado, também observaram que sua formação poderia ser diretamente através da Ang-(1-7) (Figura 5).

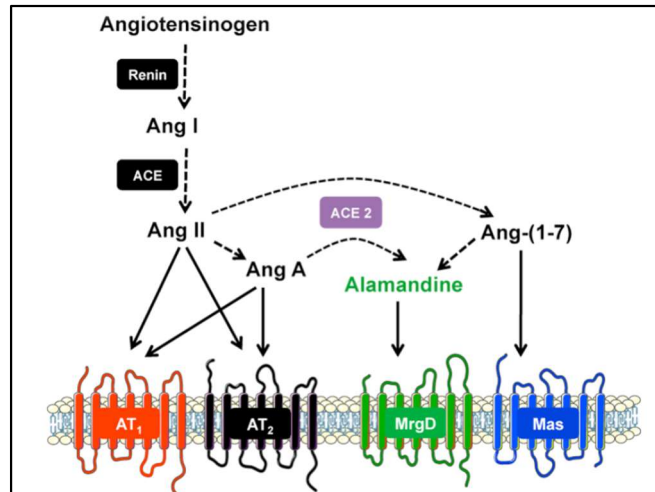


Figura 5- Cascata do SRA simplificada e as vias de formação da Alamandina.
Fonte: (Lautner., 2013)

Coube ainda destacar por Lautner e colaboradores (2013) que a alamandina além de estar presente na circulação, tem sua concentração plasmática aumentada em paciente nefropatas terminais quando comparados com pacientes saudáveis, indicando sua possível relevância em situações fisio-patológicas. Além disso, demonstraram que a alamandina é o ligante endógeno para o receptor acoplado a proteína G da família do Mas, subtipo D, (MrgD). Inicialmente, acreditava-se que esse receptor fosse um receptor específico do neurônio nociceptivo IB4 (DONG *et al.*, 2001). No entanto, há evidências crescentes de que o MrgD está presente em outros tecidos e células, incluindo cardiomiócitos e células endoteliais (DE JESUS *et al.*, 2018; HABİYAKARE *et al.*, 2014; OLIVEIRA AC *et al.*, 2014)

O trabalho original da descoberta da alamandina mostrou que este heptapeptídeo produz efeito vasodilatador dependente de endotélio em anéis isolados de aorta torácica de ratos e camundongos (LAUTNER *et al.*, 2013). Outras ações biológicas de destaque e que são similares aos obtidos em trabalhos em que foi utilizado Ang-(1-7), incluem, seu efeito anti-hipertensivo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) que receberam dose oral diária do peptídeo incluído em HP- β ciclodextrina e diminuição do acúmulo de colágeno do tipo I, III e fibronectina em ratos tratados com isoproterenol, modelo farmacológico capaz de induzir efeitos deletérios na função e histologia cardíaca (LAUTNER *et al.*, 2013). Além disso, recentemente um efeito cardioprotetor da alamandina foi descrito em um modelo experimental de sepse, demonstrando que a alamandina atenua a disfunção cardíaca induzida por LPS, resultando em aumento da contratilidade cardíaca e redução da inflamação e

apoptose (UCHIYAMA *et al.*, 2017). Corroborando fortemente esses dados, nosso grupo demonstrou que a deleção genética do MrgD em camundongos leva à disfunção cardíaca (OLIVEIRA A *et al.*, 2017)

A alamandina também apresentou efeitos similares a Ang-(1-7) quando micro injetada em áreas centrais responsáveis pela manutenção da PA: Região ventrolateral caudal do bulbo (CVLM) e área ventrolateral rostral do bulbo (RVLM) (SHEN *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2017). Além disso, foi observado assim como para Ang-(1-7), seu efeito anti-inflamatório. Em um modelo de aterogênese, alamandina reduziu os produtos da degranulação de neutrófilos presentes na circulação e em placas ateroscleróticas de aorta de camundongos.(DA SILVA *et al.*, 2017).

Contudo, deve-se destacar que os efeitos da alamandina não são limitados apenas em serem semelhantes aos da Ang-(1-7), diferenças marcantes entre esses dois peptídeos estão se tornando progressivamente evidentes.

Interessantemente a alamandina apresenta ações biológicas própria via seu receptor MrgD, que inclusive podem ser opostas as da Ang-(1-7). Lautner e colaboradores (2013) observaram que diferentemente da Ang-(1-7), alamandina não alterou a proliferação em células tumorais. Além disso, em modelo de aterogênese, alamandina diferentemente da Ang-(1-7) não potencializou o efeito vasoconstritor da Ang II em anéis de aorta (HABIYAKARE *et al.*, 2014). Em outro trabalho avaliando sua ação metabólica, foi observado que enquanto Ang-(1-7) aumentou a expressão e secreção de leptina em tecido adiposo, alamandina reduziu, demonstrando que o receptor Mas e MrgD desempenham ações opostas na regulação deste hormônio (UCHIYAMA *et al.*, 2017). Ainda nesta linha de raciocínio, enquanto a Ang-(1-7) promove a liberação de NO principalmente ativando a via AKT (SAMPAIO *et al.*, 2007), a alamandina parece levar à liberação de NO por um mecanismo diferente, provavelmente via AMPK (DE JESUS *et al.*, 2018). Em um trabalho ainda mais recente realizado pelo nosso grupo, foi demonstrado que no córtex insular, a alamandina, diferentemente da a Ang-(1-7), promove efeitos cardiovasculares excitatórios, incluindo aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, associados ao aumento da atividade simpática renal (MARINS FR *et al.*, 2014). Essas diferenças adicionam, portanto, novas possibilidades terapêuticas e possibilitam uma visualização ainda mais clara do SRA.

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A recente identificação do eixo compreendido pela angiotensina A /alamandina/ MrgD, representa uma nova peça do quebra cabeça do RAS. Contudo, pouco se sabe desta via e de sua relevância biológica e fisiopatológica.

De maneira interessante, tanto a angiotensina A, quanto a alamandina são formados a partir da descarboxilação do resíduo de aspartato (Asp¹), que é convertido em alanina (Ala¹), o que parece conferir a estes novos peptídeos ações biológicas próprias e abre a perspectiva de que outros peptídeos possam sofrer também este mesmo tipo de processo enzimático. Sendo assim, um questionamento crítico é se este processo de biotransformação do resíduo de aspartato pode ocorrer até mesmo em componentes do RAS anteriores à formação da Ang II, o que significaria a existência de uma nova rota enzimática paralela ao sistema clássico, que tem como intermediário a Ang A , possíveis outros metabólitos com estrutura Des[Asp¹]-[Ala¹]-Angiotensinas e tendo, como produto final, a alamandina.

Neste sentido, o nosso grupo, em um estudo preliminar por meio da técnica de espectrometria de massas, forneceu indícios da existência endógena, em roedores e seres humanos, dos seguintes peptídeos modificados em suas porções N- terminal: angiotensina I descarboxilada em seu primeiro resíduo de aminoácido, ou Des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang I (Ala¹-Ang I), e angiotensina(1-9) também descarboxilada em seu primeiro resíduo de aminoácido, ou Des[Asp¹]-[Ala¹]-Ang-(1-9) (Ala¹-Ang-(1-9)) (dados não publicados). O conhecimento da atividade dessa nova classe de peptídeos, embora em expansão, tanto em condições fisiológicas como em condições patológicas ainda é muito limitado.

Sendo assim, a presente dissertação de mestrado investigou as ações cardiovasculares da angiotensina A, alamandina, Ala¹-Ang I e Ala¹-Ang-(1-9) chamados aqui, coletivamente, de “Alatensinas” como potenciais peptídeos capazes de desempenhar ações no meio biológico, buscando assim, ampliar os conhecimentos do papel do SRA na fisiologia cardiovascular.

3 OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar os efeitos cardiovasculares da administração aguda de alateninas em ratos Sprague-Dawley (SD)

3.2 – Objetivo Específico

- a) Determinar os efeitos cardiovasculares da injeção intravenosa da Ala¹-Ang I ; Ala¹-Ang-(1-9); angiotensina A e alamandina em ratos SD normotensos acordados.

- b) Obter evidências fisiológicas do metabolismo desses peptídeos na circulação de ratos SD.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley (SD) machos, com 12 semanas, pesando entre 300-350g, provenientes do Biotério do Laboratório de Hipertensão, ICB, UFMG. Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação (ciclo claro-escuro de 12/12 horas) e alimentados com ração apropriada e água filtrada *ad libitum*.

4.2 Reatividade vascular

Ratos Sprague-Dawley machos foram eutanasiados por decapitação para que fosse, então, retirado um segmento da artéria aorta descendente torácica. Os anéis (2 a 3 mm) foram fixados em haste metálicas, e transferidos para cubas de vidro (10 ml) contendo líquido nutritivo de Krebs-Henseleit (composição: NaCl 118; KCl 4,7; KH_2PO_4 0,9; MgSO_4 1,1; CaCl_2 2,5; NaHCO_3 25, D-glucose 11 (mM), aquecido à $\pm 37^\circ\text{C}$ e aerado com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). Estes anéis foram mantidos sob tensão de 1 g durante 60 minutos. Foi necessário trocar a solução contida nas cubas de vidro em intervalos de 20min para evitar um possível acúmulo de produtos do metabolismo dos vasos. Ao término do período de estabilização, foi adicionado fenilefrina (agonista de receptores α_1 adrenérgicos; 1 μM) para induzir uma contração sustentada, sobre a qual foi adicionada a acetilcolina (agonista muscarínico; 1 μM) para confirmar a presença ou ausência de endotélio nas preparações estudadas. Foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo relaxamento induzido pela acetilcolina foi igual ou superior a 80% da contração. As respostas foram registradas usando-se transdutores de tensão isométrica (ADInstruments). Foi utilizado o programa PowerLab na versão 7.1, tanto para análise, quanto para aquisição dos dados.

4.2.1 Avaliação do efeito da Ala¹-Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD normotensos.

Após o teste da funcionalidade vascular, os vasos foram lavados com solução de Krebs-Henseleit em intervalos de 15 min, durante 30 minutos. Após este período, os vasos foram pré-contraídos novamente com fenilefrina (0,1 µM), após atingir o efeito máximo da contração, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas do peptídeo Ala¹-Ang-(1-9) (10⁻¹⁰ a 10⁻⁶ mol/L) em vasos contendo endotélio funcional.

4.3 Avaliação do efeito da administração aguda dos peptídeos sobre a PA e FC em ratos normotensos

4.3.1 Implantação de cânula na artéria e veia femoral

Para os experimentos foram utilizados ratos SD normotensos. A metodologia adotada, constituiu inicialmente em anestésiar os animais com Xilazina (15 mg/Kg) e Cetamine (75 mg/Kg). Em seguida, para canulação da artéria femoral foi utilizada uma cânula confeccionada a partir da conexão de 15 cm de polietileno PE50, junto à 4 cm de polietileno PE10, preenchida com solução fisiológica (NaCl 0.9%) contendo heparina (100 U./ 0,1mL). Após realizada a tricotomia da região inguinal direita do animal, uma pequena incisão foi realizada, o feixe nervoso femoral foi localizado para mínima manipulação possível. Posteriormente, artéria femoral cuidadosamente isolada. A cânula foi introduzida na aorta abdominal através da artéria femoral, sendo utilizada para obtenção do registro dos parâmetros cardiovasculares. Uma segunda cânula, confeccionada a partir da conexão de 15 cm de polietileno PE50 junto à 2 cm de polietileno PE10, preenchida, também, com solução fisiológica (NaCl 0.9%), foi introduzida na veia femoral para a administração dos peptídeos. Após a canulação, os cateteres foram exteriorizados subcutaneamente em direção ao dorso do animal para sua fixação na região cervical. Após a cirurgia os animais foram novamente colocados em suas caixas individuais, com água e ração *ad libitum*.

4.3.2 Registro das variáveis cardiovasculares em animais acordados

Vinte e quatro horas após o procedimento de implantação de cânulas foi realizado o registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) nos animais acordados. A pressão arterial foi registrada por um sinal enviado a um transdutor conectado à cânula inserida na aorta abdominal pela artéria femoral, através do sistema de aquisição de dados (Biopac System, modelo MP100. Através do software de leitura da placa, Acqknowledge v.3.5.7 (Biopac System), a PAP foi registrada continuamente para que os valores de PAM e da FC fossem calculados a partir de pulsos de PA e posteriormente registrados pelo sistema.

No momento do experimento, a cânula arterial foi conectada ao transdutor de pressão, iniciando o registro. Após o período de uma hora de estabilização dos parâmetros cardiovasculares, doses crescentes dos peptídeos (ng) ou salina no volume de 100 μ L foram injetadas via intravenosa. O intervalo entre as doses respeitou o tempo necessário que cada animal levou para retornar aos parâmetros cardiovasculares basais. Após a injeção em bolus da última dose do peptídeo, os parâmetros cardiovasculares foram monitorados por um período adicional de 30 minutos. Quando necessário os animais foram tratados 20 min antes de iniciar o protocolo com: (I) antagonista do receptor AT₁, o losartan, na dose única de 5mg/kg ou (II) antagonista do receptor MrgD, D-Pro⁷-Ang-(1-7) (D-Pro⁷), em infusão contínua na dose de (1 micrograma/kg/min) ou (III) inibidor da ECA, captopril, na dose única de 5mg/kg.

4.3.3 Protocolos experimentais

4.3.3.1 Determinação dos efeitos cardiovasculares da Ala¹-Ang I

Objetivo I: Verificar se a Ala¹-Ang I induz alterações da PAM e FC em ratos SD acordados.

Foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda intravenosa (i.v) de Ala¹-Ang I nas doses de: 5,10,20 e 40 ng.

Objetivo II: Investigar a participação da ECA sobre a resposta pressora produzida pela administração da Ala¹-Ang I

Foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda i.v de Ala¹-Ang I nas doses de: 5,10,20 e 40 ng em animais pré tratados com captopril (5mg/kg).

Objetivo III: Investigar a participação do receptor MrgD nos mecanismos de redução da pressão arterial produzida pela Ala¹-Ang I em ratos pré tratados com captopril.

Foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda i.v de Ala¹-Ang I nas doses de: 5,10,20 e 40 ng em animais pré-tratados com captopril (5mg/kg) e na presença concomitante do antagonista de D-Pro⁷ (1micrograma/kg/min).

Objetivo IV: Avaliar se a produção de alamandina é responsável pela menor potência da Ala¹-Ang I.

Foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda i.v de Ala¹-Ang I nas doses de: 5,10,20 e 40 ng em animais pré-tratados com D-Pro⁷ (1micrograma/kg/min).

4.3.3.2 Determinação dos efeitos cardiovasculares da Ang A

Objetivo I: Verificar se a Ang A induz alterações da PAM e FC em ratos SD acordados.

Foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda de Ang A nas doses de: 5,10,20 e 40 ng

Objetivo II: Investigar se a produção de alamandina é responsável pela menor potência da Ang A.

Foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda i.v de Ang A nas doses de 5, 10, 20 e 40ng em animais pré-tratados com Dpro⁷ (1micrograma/kg/min).

4.3.3.3 Determinação dos efeitos cardiovasculares da Ala¹-Ang-(1-9)

Objetivo I: *Verificar se a Ala¹-Ang-(1-9) induz alterações da PAM e FC em ratos SD acordados.*

Foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda i.v de Ala¹-Ang I nas doses de: 5,10,20 e 40 ng.

Objetivo III: *Investigar a participação do receptor AT₁ na resposta pressora induzida pela Ala¹-Ang-(1-9).*

Foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda i.v da Ala¹-Ang-(1-9), nas doses de: 5,10,20 e 40 ng em animais pré-tratados com losartan (5mg/kg)

Objetivo IV: *Investigar a participação do receptor MrgD nos mecanismos de redução da pressão arterial produzida pela Ala¹-Ang-(1-9) em ratos pré tratados com losartan*

Foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda i.v da Ala¹-Ang-(1-9), nas doses de: 5,10,20 e 40 ng em animais pré-tratados com losartan (5mg/kg) e na presença concomitante de D-Pro⁷ (1micrograma/kg/min).

4.3.3.4 Determinação dos efeitos cardiovasculares da alamandina.

Objetivo I: *Verificar se a alamandina induz alterações da PAM e FC em ratos SD acordados.*

Foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda i.v de Ala¹-Ang I nas doses de 0,002; 0,005; 0,01; 0,2; 1; 5; 20 e 80 ng. Afim de evitar uma possível sobrecarga de volume e/ou efeito de taquifilaxia, as doses foram divididas em dois grupos. No primeiro, foram administradas as doses de 0,002; 0,005; 0,01; 0,2 ng) e, no segundo, as doses de 1; 5; 20 e 80 ng. Os experimentos foram realizados de forma semelhante nos dois grupos, de forma que a única variável foi a dose do peptídeo administrado.

Objetivo II: *Investigar a participação do receptor MrgD sobre a resposta hipotensora produzida pela administração da alamandina*

Seguindo o protocolo anterior, foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda i.v de alamandina nas doses de 0,002; 0,005; 0,01; 0,2; 1; 5; 20 e 80 ng em animais pré-tratados com D-Pro⁷ (1micrograma/kg/min).

Objetivo III: *Investigar a participação do receptor AT₁ sobre a resposta pressora induzida pela administração da alamandina em ratos pré-tratados com D-Pro⁷.*

Seguindo o protocolo anterior, foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda i.v de alamandina nas doses de 0,002; 0,005; 0,01; 0,2; 1; 5; 20 e 80 ng em animais pré-tratados com losartan (5mg/kg)

Objetivo IV: *Confirmar a participação do receptor AT₁ sobre a resposta bifásica induzida pela administração de alamandina*

Seguindo o protocolo anterior, foram construídas curvas dose-resposta a partir da injeção aguda i.v de alamandina nas doses de 0,002; 0,005; 0,01; 0,2; 1; 5; 20 e 80 ng em animais pré-tratados com losartan (5mg/kg) e na presença concomitante de D-Pro⁷ (1micrograma/kg/min).

4.4 Análise Estatística

Inicialmente, foi avaliada a distribuição dos dados. Os que apresentaram distribuição normal, foi utilizada análise de variância (One-way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey para comparação das médias entre grupos quando houve apenas um fator de variação. Para comparação das médias entre grupos que tiveram dois fatores de variação, foi utilizada a análise de variância de dois fatores (Two-way ANOVA) seguida do pós-teste Bonferroni. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Corporation, versão 7.1, 2016). Os dados foram expressos como médias \pm erro padrão da média e o nível de significância estatística estabelecido será de $\alpha=0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos cardiovasculares da administração aguda do peptídeo Ala¹-Ang I em ratos SD.

Como demonstrado na Figura 6, a administração de Ala¹-Ang I produziu um aumento da pressão arterial média (PAM) de maneira dose-dependente em ratos SD acordados, associado a redução da frequência cardíaca (FC). Por outro lado, seu efeito pressor foi menor em relação ao efeito da Ang I, principalmente na dose de 10ng. (Δ PAM: $2,2 \pm 0,91$ mmHg, Ala¹-Ang I vs. Δ PAM: $18,8 \pm 1,28$ mmHg, Ang I).

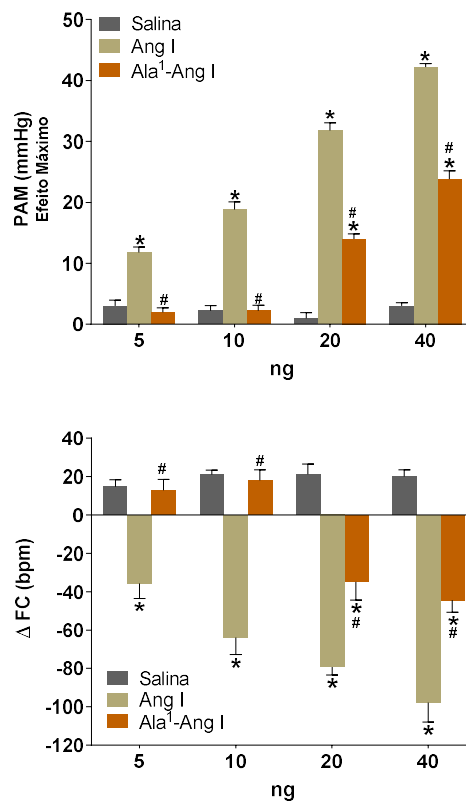


Figura 6- Alterações da PAM e da FC após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ang I ou Ala¹-Ang I.

* $p < 0,05$ vs salina; # $p < 0,05$ vs Ang I. (Two-way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni; n=6)

Com a finalidade de avaliar se o efeito pressor poderia ser devido à formação de Ang A, investigamos a participação da ECA sobre a resposta pressora produzida pela administração do peptídeo Ala¹-Ang I.

A inibição farmacológica da ECA, a partir da administração de captopril (5 mg/kg), aboliu o efeito pressor produzido pela Ala¹-Ang I. Além disto, nesta condição,

observou-se uma diminuição da pressão arterial na dose de 10 ng (Δ : $-9,5 \pm 0,97$ mmHg, Figura 7).

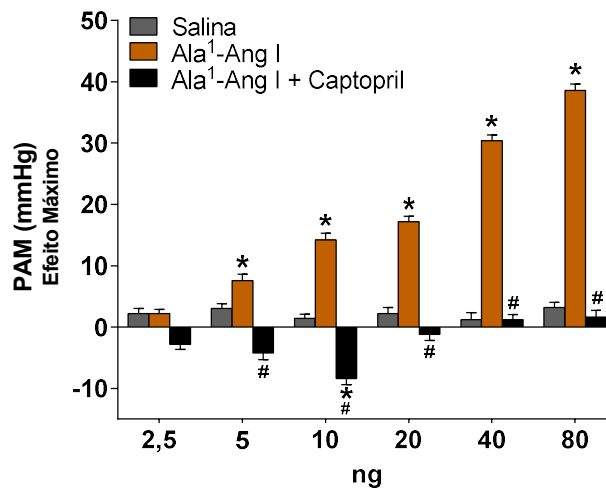


Figura 7- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ala¹-Ang I ou Ala¹-Ang I após administração de captopril.
* $p < 0,05$ vs salina; # $p < 0,05$ vs Ala¹-Ang I. (Two-way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni; $n=7$)

No intuito de investigar se o receptor MrgD tinha participação nos mecanismos de redução da pressão arterial produzida pelo peptídeo Ala¹-Ang I em ratos pré-tratados com o captopril, realizamos o mesmo experimento citado acima, mas agora na presença do antagonista deste receptor, D-pro⁷-Ang-(1-7) (D-pro⁷). De forma interessante, o efeito hipotensor observado anteriormente na presença apenas de captopril, foi abolido totalmente, sugerindo, assim, a participação da alamandina neste efeito (Figura 8).

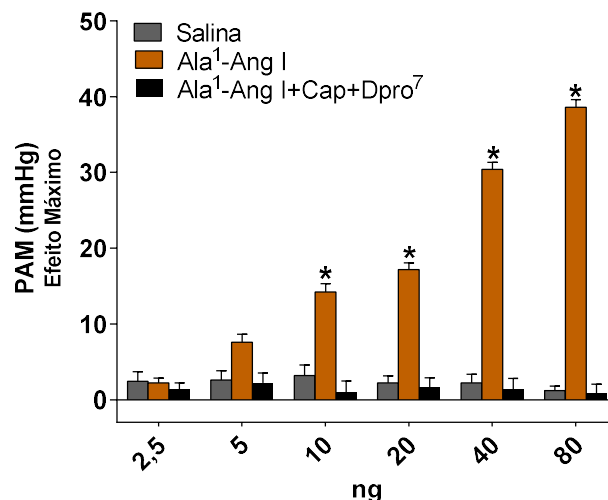


Figura 8- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ala¹-Ang I ou Ala¹-Ang I após administração de captopril e D-pro⁷.
* $p < 0,05$ vs salina. (Two-way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni; $n=5$)

Sendo assim, decidimos investigar se o efeito pressor menos pronunciado da Ala¹-Ang I, quando comparada a Ang I, poderia ser devido à formação de alamandina. Avaliamos, então, o efeito do bloqueio do receptor MrgD sobre a resposta pressora induzida pelo peptídeo Ala¹-Ang I em ratos pré-tratados com o antagonista D-pro⁷.

De forma interessante, houve a potencialização do efeito da Ala¹-Ang I, especialmente na dose de 10ng (Δ PAM: 17,4 \pm 0,88 mmHg, Ala¹-Ang I + D-pro⁷ vs. Δ PAM: 4,3 \pm 0,95 mmHg, Ala¹-Ang I, Figura 9), no qual o efeito pressor da Ala¹-Ang I passou a ser, inclusive, similar ao efeito da Ang I. Estes achados sugerem uma possível formação de alamandina a partir da Ala¹-Ang I.

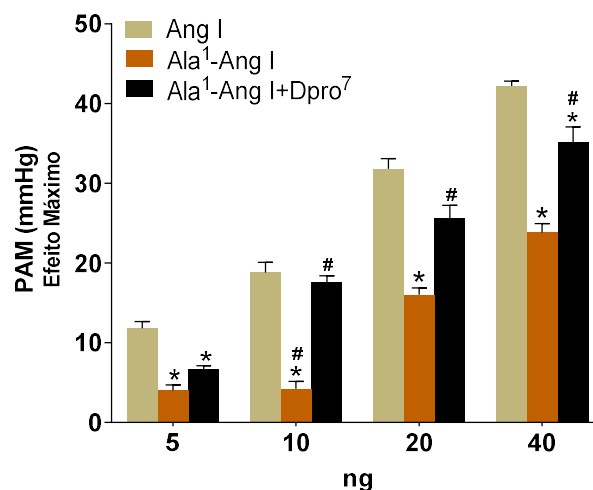


Figura 9- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ala¹-Ang I ou Ala¹-Ang I após administração de D-pro⁷.

*p<0,05 vs. Ang I; #p<0,05 vs. Ala¹-Ang I. (Two-way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni; n=6)

5.2 Efeitos cardiovasculares da administração aguda do peptídeo Angiotensina A em ratos SD.

Como pode ser visualizado na Figura 10, a administração aguda de Ang A produziu um aumento significativo da PAM de maneira dose-dependente e com redução reflexa da FC. Por outro lado, seu efeito foi menor quando comparado ao efeito da Ang II, principalmente na dose de 10ng (Δ PAM: 20,1 \pm 0,88 mmHg, Ang A vs. Δ PAM: 29,2 \pm 0,95 mmHg, Ang II).

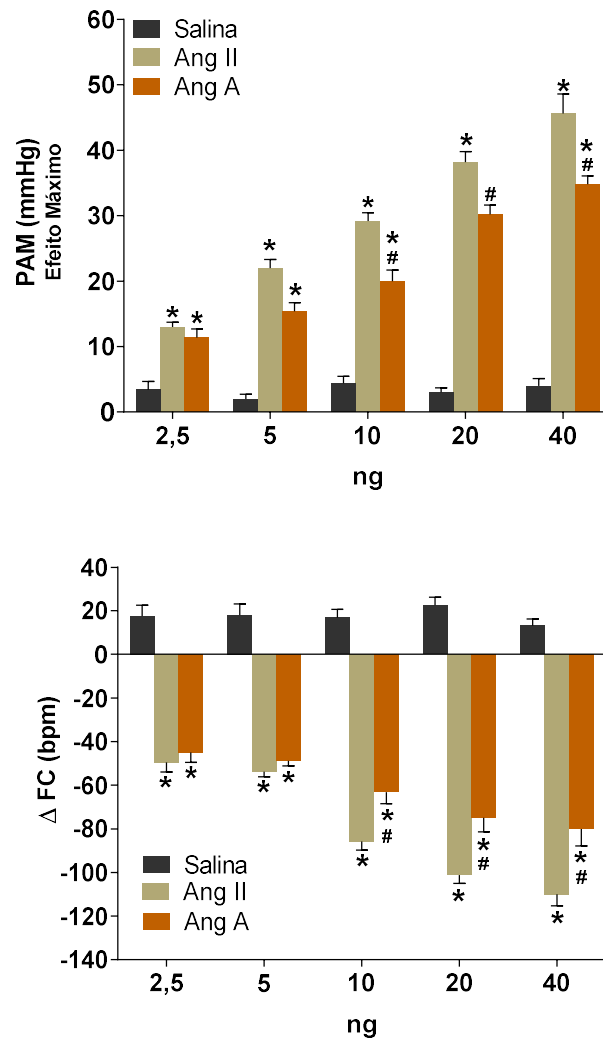


Figura 10- Alterações da PAM e da FC após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ang II ou Ang A.

* $p < 0,05$ vs salina; # $p < 0,05$ vs. Ang II. (Two-way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni; $n=6$)

Na tentativa de entender se a alamandina estaria envolvida no menor efeito pressor observado com a administração de Ang A, decidimos investigar a participação do receptor MrgD sobre a resposta pressora induzida pelo peptídeo Ang A. De forma inesperada, em termos de efeito máximo, a administração de D-pro⁷ não provocou alterações nas respostas induzidas pela Ang A (Figura 11).

Entretanto, como pode ser observado na figuras 12 e 13, representação gráfica da área sob a curva, houve um aumento do efeito cumulativo do peptídeo sobre a pressão ao longo do tempo, sugerindo, assim, a influência da alamandina no efeito observado. Juntos, esses achados apontam para uma possível formação de alamandina a partir da Ang A.

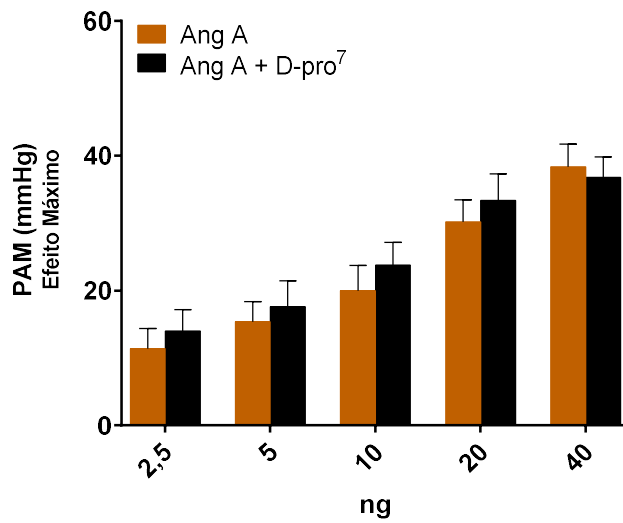


Figura 11- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ang A ou Ang A após administração de D-pro⁷ (Two-way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni; n=6)

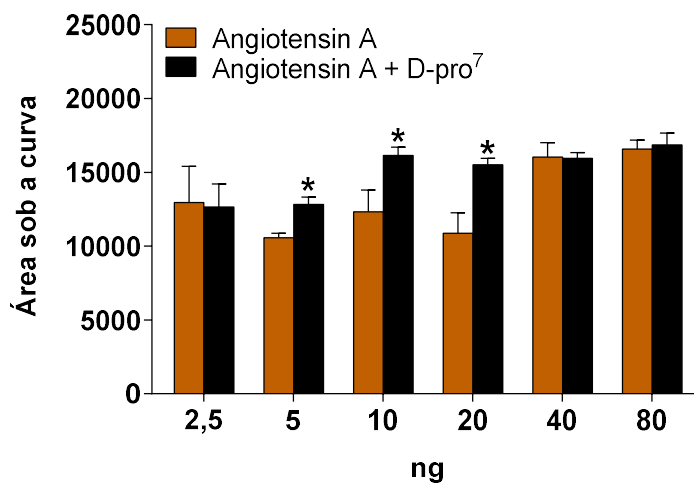


Figura 12- Visualização gráfica da área sob a curva produzida pelo efeito do peptídeo Ang A ou Ang A após administração de D-pro⁷ *p<0,05 vs. Ang A. (Two-way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni; n=6)

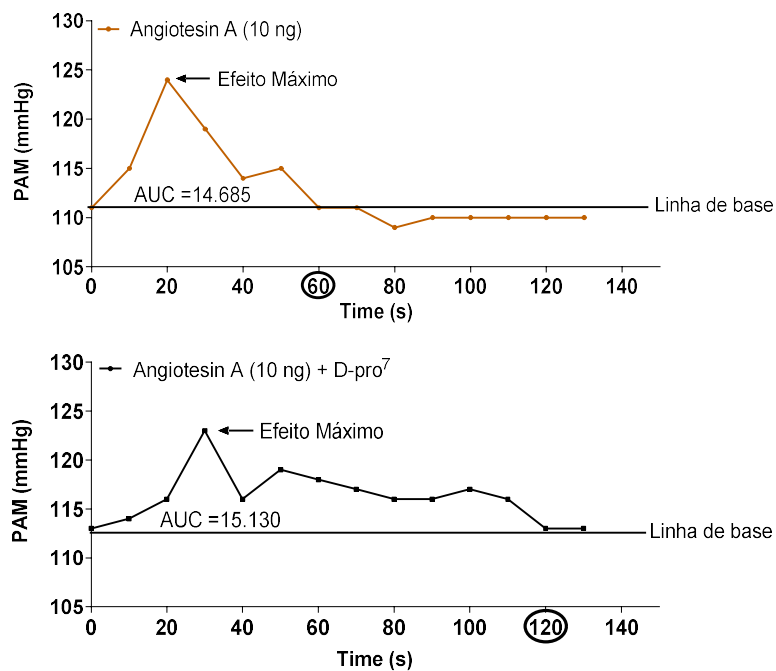


Figura 13- Efeito da Ang A ou Ang A após administração de Dpro7 sobre a pressão arterial ao longo do tempo. Aumento da duração do efeito promovido em ratos tratados com Dpro7, antagonista do receptor MrgD

5.3 Efeitos cardiovasculares da administração aguda do peptídeo Ala¹-Ang-(1-9) em ratos SD.

Na Figura 14, podemos observar que a administração *i.v.* em bolus de Ala¹-Ang-(1-9) em ratos SD acordados não produziu alteração significativa da PAM e FC, com exceção da maior dose, na qual observamos um aumento da PA (Δ PAM: $8,6 \pm 0,65$ mmHg, Ala¹-Ang-(1-9) vs. Δ PAM: $4 \pm 0,95$ mmHg, salina).

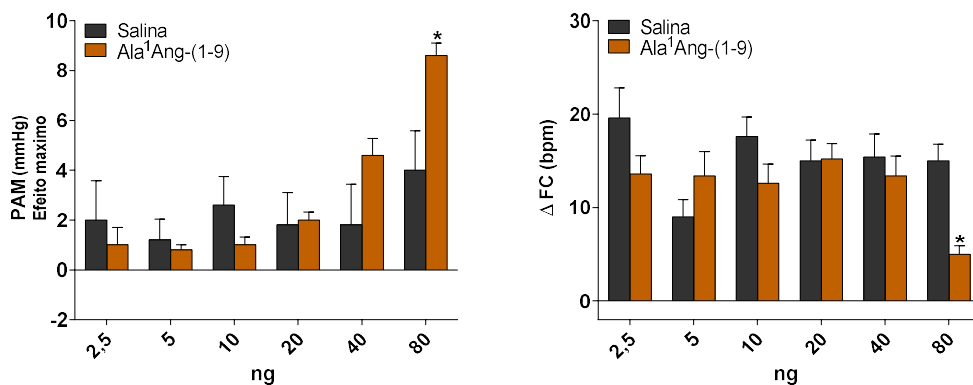


Figura 14- Alterações da PAM e da FC após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ala¹-Ang-(1-9).

* $p < 0,05$ vs salina (One-way ANOVA seguida por pós-teste de Tukey, $n = 5$)

Em um segundo momento, com a finalidade de investigar uma possível participação do receptor AT_1 na resposta pressora produzida pela $Ala^1-Ang-(1-9)$, avaliamos o efeito cardiovascular deste peptídeo em ratos pré-tratados com losartan. O uso deste antagonista bloqueou totalmente o efeito pressor anteriormente observado. Além disso, a $Ala^1-Ang-(1-9)$ também induziu diminuição da pressão arterial na dose de 5ng ($\Delta: -9,8 \pm 1,24$ mmHg, Figura 15).

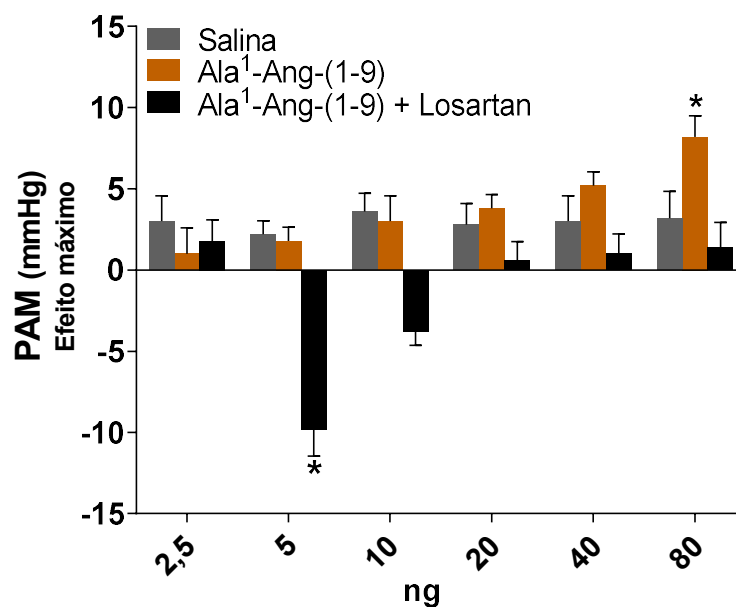


Figura 15- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de $Ala^1-Ang-(1-9)$ ou $Ala^1-Ang-(1-9)$ após administração de Losartan.

* $p < 0,05$ vs salina. (Two-way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni; $n=6$)

Na tentativa de entender melhor a redução da pressão arterial observada em animais pré-tratados com losartan, analisamos o efeito da administração da $Ala^1-Ang-(1-9)$ em ratos tratados concomitantemente com o losartan e $Dpro^7-Ang-(1-7)$. De forma interessante, o efeito hipotensor observado anteriormente na presença apenas de losartan foi completamente abolido (Figura 16), sugerindo, uma possível formação de alamandina a partir da $Ala^1-Ang-(1-9)$.

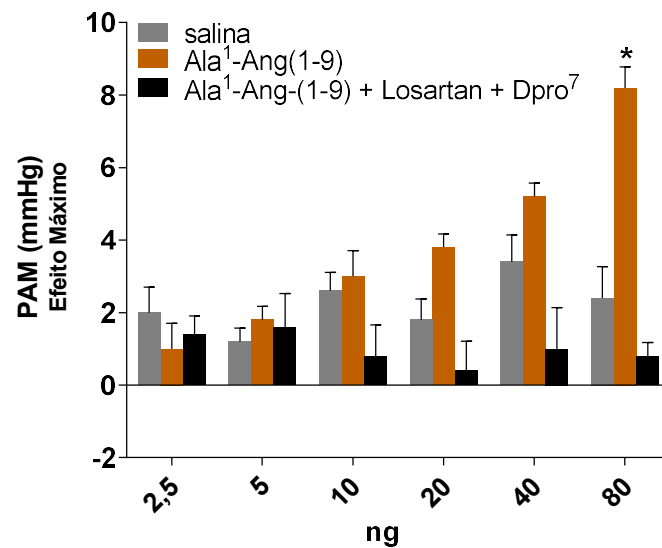


Figura 16- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de Ala¹-Ang-(1-9) ou Ala¹-Ang-(1-9) após administração de Losartan e D-pro⁷. *p<0,05 vs salina (Two-way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni; n=6)

Levando em consideração que não foi observado um efeito importante da Ala¹-Ang-(1-9) sistemicamente, investigamos a possível ação biológica do peptídeo *in vitro*, em anéis de aorta isolada de ratos SD. A Figura 17 mostra o efeito relaxante concentração-dependente induzido pela Ala¹-Ang-(1-9) em anéis de aorta torácica com endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina. Como observado, a Ala¹-Ang-(1-9) apresentou um pequeno efeito vasodilatador (Emax: 9,8% ± 0,84, Ala¹-Ang-(1-9)).

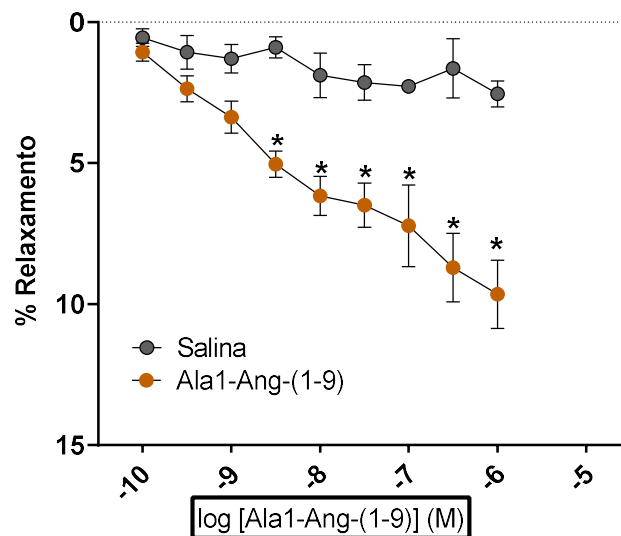


Figura 17- Efeito induzido pelo peptídeo Ala¹-Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD. *p<0,05 em comparação ao controle (salina), (T teste, n=6)

5.4 Efeitos cardiovasculares da administração aguda do peptídeo alamandina em ratos SD.

A Figura 18 mostra o efeito de diminuição da pressão arterial induzido pela alamandina em ratos SD. Este efeito foi observado nas doses intermediárias (0.01, 0.02, 0.2, 1 e 5 ng), com menor valor absoluto na dose de 0,02 ng (Δ PAM: $-9,62 \pm 1,3$ mmHg vs salina). À medida que se afasta das doses intermediárias o efeito observado é proporcionalmente menor, formando assim um padrão de curva em “U”.

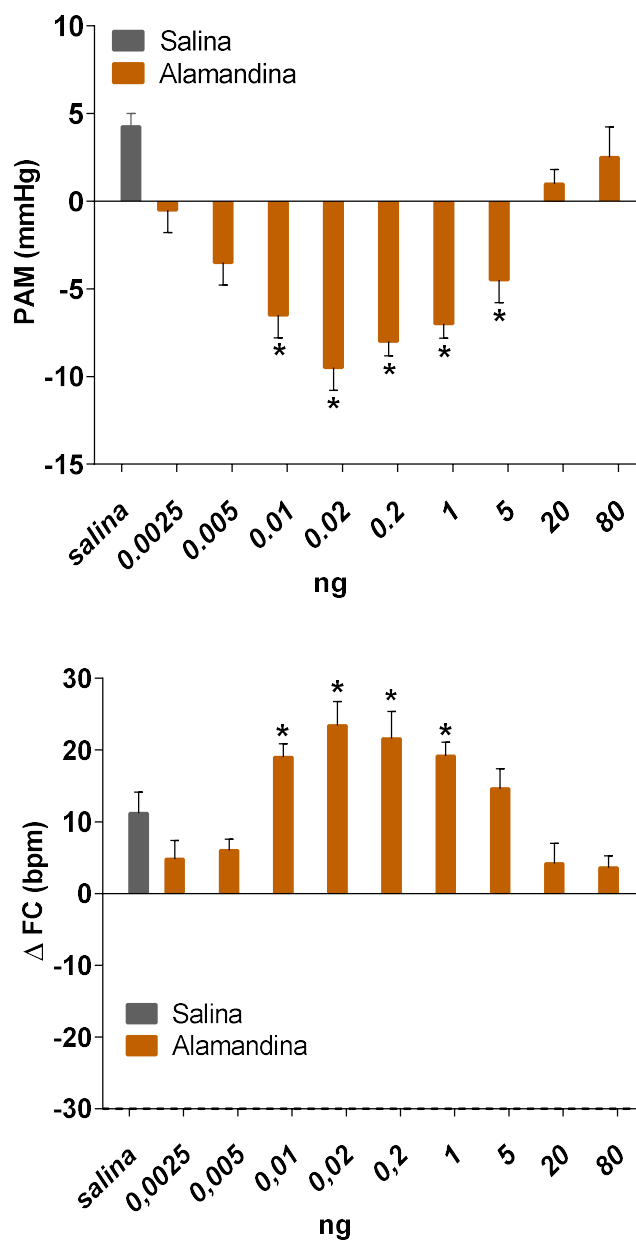


Figura 18- Alterações da PAM e da FC após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de alamandina.

* $p < 0,05$ vs salina. (One-way ANOVA seguida por pós-teste de Tukey, $n=6$)

Como esperado, na presença de D-pro⁷, o efeito de diminuição da pressão arterial foi abolido. Entretanto, no mesmo gráfico, é possível observar também que nas doses mais altas (20 e 80ng), ocorreu um aumento da PAM, com maior valor absoluto na dose de 80 ng (Δ : $2,5 \pm 1,39$ mmHg, salina vs. Δ : $9,7 \pm 0,98$ mmHg, alamandina + D-pro⁷, Figura 19).

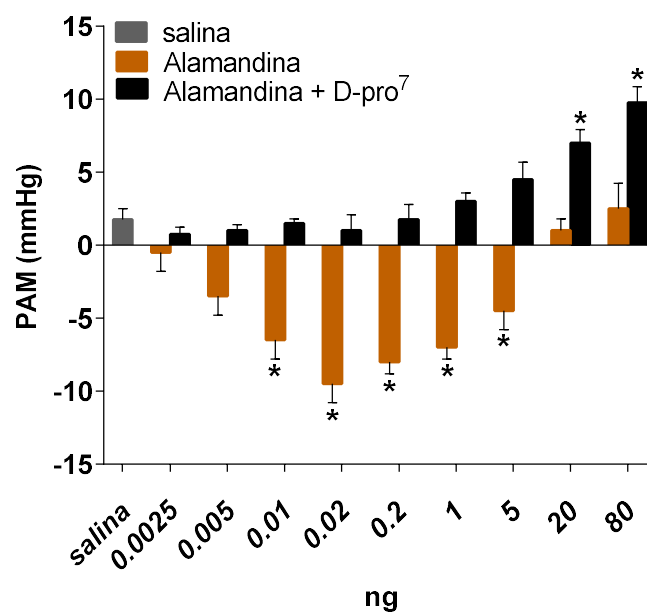


Figura 19- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de alamandina ou alamandina após administração de Dpro⁷. *p<0,05 vs salina. (Two-way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni; n=6)

Em seguida, com o objetivo de avaliar a possível participação do receptor AT₁ no efeito pressor da alamandina em ratos tratados com D-pro⁷, repetimos o experimento em animais pré-tratados com o losartan. A figura 20 demonstra a potencialização do efeito da alamandina, principalmente na dose de 0,2 ng (Δ : $-9,62 \pm 1,28$ mmHg, alamandina vs. Δ : $-15,8 \pm 1,12$ mmHg, alamandina + losartan). Além disso, nem um efeito pressor foi observado nas doses testadas. Estes achados sugerem a participação do receptor AT₁ nas ações mediadas pela alamandina.

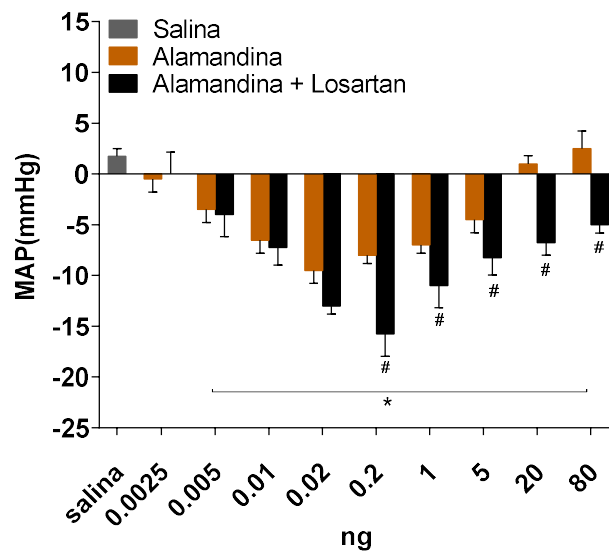


Figura 20- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de alamandina ou alamandina após administração de losartan.

* $p < 0,05$ vs salina; # $p < 0,05$ vs alamandina. (Two-way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni; $n=6$)

Na tentativa de entender melhor o padrão de curva em “U” observado com a administração de alamandina, e presente até mesmo nos animais pré-tratados com losartan, decidimos investigar o efeito da administração do peptídeo em ratos tratados concomitantemente com o losartan e o D-pro⁷. Como pode ser observado na figura 21, os efeitos anteriormente observados sobre a pressão arterial foram abolidos.

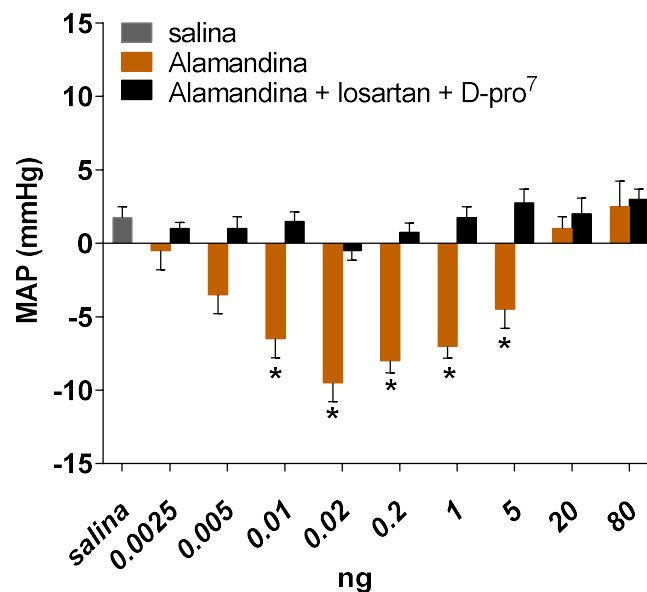


Figura 21- Alterações da PAM após administração intravenosa, in bolus, de doses crescentes de alamandina ou alamandina após administração de losartan e Dpro⁷.

* $p < 0,05$ vs salina. (Two-way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni; $n=6$)

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que uma nova família de peptídeos do SRA, nomeados, pelo nosso grupo, de alatensinas [Ala¹-Ang-(1-10) / Ala¹-Ang-(1-9) / Ala¹-Ang-(1-8) / Ala¹-Ang-(1-7)], produzem efeito no sistema cardiovascular. Com exceção da Ang A e da alamandina, os efeitos dos demais peptídeos analisados, até então, não haviam sido descritos.

A primeira etapa deste trabalho consistiu na avaliação do efeito cardiovascular do peptídeo Ala¹-Ang I. Como esperado, o peptídeo induziu um aumento dose-dependente na PAM. Entretanto, a Ala¹-Ang I apresentou menor efeito sobre a PA quando comparada a Ang I, sendo a diferença entre os dois peptídeos marcante especialmente na dose de 10 ng.

Trabalhos clássicos já haviam demonstrado aumentos na PA induzidos pela infusão intravenosa de Ang I (SKEGGS, L. T. *et al.*, 1954). Entretanto, outros trabalhos confirmaram que a ação da Ang I é, na realidade, devido a sua conversão à Ang II pela ECA (HELMER, 1957; NG; VANE, 1967).

Levando em consideração a similaridade estrutural entre a Ala¹-Ang I e a Ang I, hipotetizamos que o peptídeo poderia ser igualmente um substrato para ECA, formando assim, a Ang A. Portanto, a seguir avaliamos se o aumento dos níveis pressóricos observados pela administração *i.v.* de Ala¹-Ang I poderia ser explicado pela formação de Ang A. De fato, a inibição da ECA aboliu completamente o efeito pressor observado com a administração de Ala¹-Ang I, o que sugere que Ala¹-Ang I pode ser metabolizada pela ECA, formando a Ang A. Os resultados deste estudo são corroborados por trabalhos anteriores que mostraram que a Ang A tem ação pressora (COUTINHO *et al.*, 2014; YANG, RUI *et al.*, 2011). O menor efeito pressor observado após a injeção *i.v.* de Ala¹-Ang I poderia, então, ser explicado por menor afinidade da ECA por esse peptídeo, o que levaria à menor formação de Ang A.

Jankowski e colaboradores (2007) avaliaram a possibilidade da Ang A ser formada a partir da Ang II pela descarboxilação do resíduo de Asp¹. Embora vários tecidos possam ser prováveis candidatos para essa conversão, os autores avaliaram se ela ocorreria em leucócitos mononucleares. Após a incubação dos leucócitos na presença de angiotensinogênio, observaram aumentos significativos dos níveis de Ang I, Ang II, e também Ang A, mas nenhum sinal foi obtido para des-[Asp¹]-[Ala¹]-Angiotensina ou Ala¹-Ang I. Deste modo, os autores sugeriram que a Ang A não

poderia ser derivada do suposto peptídeo Ala¹-Ang I. Apesar disso, a natureza dessa possível descarboxilase presente nos leucócitos mononucleares, sua especificidade quanto ao substrato e sua distribuição tecidual são atualmente desconhecidos. Assim, apesar de existirem dados *in vitro* que descartam a formação de Ang A a partir de Ala¹-Ang I, os resultados do nosso trabalho *in vivo* sustentam a hipótese de que outras células ou tecidos podem contribuir para esse processo.

No mesmo protocolo experimental em que confirmamos a hipótese da Ala¹-(Ang I) ser um substrato da ECA, observamos, também, uma redução significativa da PAM na dose de 10 ng após a injeção de Ala¹-Ang I em ratos pré-tratados com Captopril. Partindo-se do pressuposto que seu análogo, a Ang I, pode ser metabolizado em Ang-(1-7), peptídeo similar à alamandina, decidimos avaliar se o efeito hipotensor observado na presença do inibidor da ECA seria causado pela formação da alamandina. Observamos, então, que a adição de D-pro⁷, antagonista do receptor MrgD, ao qual alamandina se liga (LAUTNER *et al.*, 2013), resultou na abolição do efeito hipotensor, confirmando, assim, a nossa suspeita.

Sendo assim, questionamos se o menor efeito pressor da Ala¹-Ang I quando comparado a Ang I poderia ser explicado pela formação de alamandina. Assim, administramos o peptídeo Ala¹-Ang I na presença do antagonista do receptor MrgD. Observamos que em todas as doses testadas houve significativa potencialização do efeito pressor deste peptídeo, especialmente na dose de 10 ng. Esses resultados sugerem uma possível formação de alamandina a partir da Ala¹-Ang I, de modo que suas ações parecem, inclusive, contrarregular o efeito pressor promovido pelo aumento agudo dos níveis de Ala¹-Ang I em ratos SD. Essa possibilidade é corroborada, inclusive, por estudos anteriores que mostram que a alamandina apresenta efeito hipotensor e vasorelaxante (LAUTNER *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2018).

A Ang-(1-7), análogo da alamandina, pode ser formada diretamente a partir da Ang I pela hidrólise da ligação peptídica Pro⁷-Phe⁸ na porção C-terminal por algumas peptidases. Além disso, a ação da ECA sobre o peptídeo Ang I produz Ang II que, posteriormente, sofre ação enzimática da ECA2 no resíduo de Phe⁸ em sua porção C-terminal para dar origem a Ang-(1-7). A ECA2 também pode agir na Ang I para formar Ang-(1-9), que por sua vez é convertida em Ang-(1-7) pela ECA (BASU *et al.*, 2017; YE *et al.*, 2012).

Levando em consideração as vias de formação da Ang-(1-7) e, tendo em vista a similaridade estrutural existente entre os peptídeos do eixo clássico e as alateninas, podemos sugerir as seguintes rotas para a formação da alamandina a partir da Ala¹-Ang I: i) diretamente, a partir da ação de endopeptidases sobre a própria Ala¹-Ang I; ii) indiretamente, através da formação de Ala¹-Ang-(1-9) e sua subsequente metabolização em alamandina ; iii) via formação de Ang A, que é posteriormente metabolizada em alamandina pela ECA2. As possíveis rotas enzimáticas são ilustradas na figura abaixo:

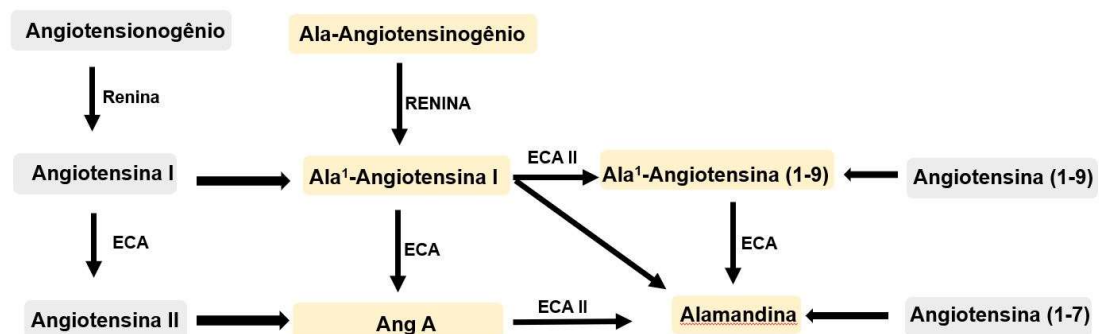


Figura 22- Visão hipotética do novo eixo paralelo ao Sistema Renina-Angiotensina clássico. Neste esquema é possível apreciar as diferentes rotas que levam a formação de alamandina. Fonte: (Elaborada pelo autor)

Como os nossos primeiros resultados sugerem que a Ang A é o principal produto da metabolização da Ala¹-Ang I pela ECA, sendo inclusive, responsável pelos efeitos pressores observados, decidimos avaliar os efeitos da Ang A sobre a pressão arterial. Sua ação vasoconstritora já havia sido mostrada por diferentes autores (COUTINHO *et al.*, 2014; JANKOWSKI *et al.*, 2007; JR *et al.*, 2009; YANG, RUI *et al.*, 2011). De fato, em nosso protocolo experimental, o peptídeo Ang A induziu, assim como seu análogo Ang II, aumentos dose-dependentes na pressão arterial. De forma interessante, os efeitos pressóricos observados pela injeção da Ang A foram de menor intensidade quando comparados aos da Ang II. Jankowski e colaboradores (2007) já haviam mostrado que a Ang A é menos potente que a Ang II. O mesmo grupo reconhece que, apesar de Ang A e a Ang II apresentarem afinidades semelhantes pelo receptor AT₁, a Ang A apresenta atividade intrínseca menor, exercendo ação como agonista parcial. Entretanto, um outro trabalho demonstra que, na realidade, a Ang A age como agonista pleno e que, portanto, a menor potência desse peptídeo poderia ser explicada por razões farmacocinéticas, tais como menor meia-vida plasmática por processos de metabolização (YANG, RUI *et al.*, 2011). Isto nos levou

a supor que o menor efeito biológico da Ang A, poderia ser devido à formação de um peptídeo capaz de atenuar suas ações pressóricas. Sendo assim, decidimos avaliar se o menor efeito pressor obtido pela injeção de Ang A poderia ser explicado pela formação de alamandina.

De forma intrigante, não foi observada diferença na resposta pressora máxima ao administrarmos Ang A em animais pré-tratados com Dpro⁷. Decidimos, então, analisar a área sob a curva para avaliar a hipótese de um eventual efeito cumulativo produzido pelo bloqueio do receptor MrgD. De fato, diferenças significativas foram observadas entre as diferentes doses testadas, que podem ser reflexo da maior duração do efeito da Ang A na presença de Dpro⁷. Os dados descritos nesse experimento *in vivo* sugerem que Ang A pode ser convertida em alamandina, corroborando, assim, os achados de Lautner e colaboradores que demonstram, *in vitro*, a formação de alamandina a partir de Ang A. Oliveira, Bader e Santos (dados não publicados), utilizando camundongo KO para ECA2, obtiveram evidências semelhantes.

Em um terceiro momento deste trabalho, avaliamos também o possível efeito cardiovascular do metabólito intermediário Ala¹-Ang-(1-9). Evidências crescentes demonstram que seu análogo, a Ang-(1-9), tem efeitos *in vivo* e *in vitro*, agindo a partir do receptor AT₂ (FLORES-MUÑOZ *et al.*, 2011; FLORES-MUNOZ *et al.*, 2012; OCARANZA, MARÍA PAZ; JALIL, 2012). Em um trabalho envolvendo modelos de hipertensão, a administração crônica de Ang-(1-9) preveniu significativamente os aumentos da PA (OCARANZA, MARIA PAZ *et al.*, 2014).

Em nosso trabalho, a administração aguda de Ala¹-Ang-(1-9) em ratos normotensos não induziu alterações importantes da PA. Nossos resultados são similares aos obtidos por Sanglard (2014), que injetou agudamente doses crescentes do peptídeo em ratos Sprague-Dawley (SD) normotensos. Além disso, de forma interessante, observamos, nas doses mais altas, aumento significativo da PA.

Em um trabalho utilizando a técnica de *binding*, foi demonstrado que a Ang-(1-9) pode se ligar ao receptor AT₁ (FLORES-MUÑOZ *et al.*, 2011). Levando em consideração as similaridades estruturais, testamos os efeitos do peptídeo Ala¹-Ang-(1-9) na presença do Losartan, antagonista do receptor AT₁. De fato, o efeito pressor mediado pelo peptídeo Ala¹-Ang-(1-9) foi completamente abolido. Este resultado sugere o envolvimento do receptor AT₁, nos efeitos observados. Além disso, neste mesmo experimento, observamos uma redução significativa da PA na dose de 10ng.

A associação de Losartan com o antagonista do receptor MrgD, por outro lado, aboliu o referido efeito hipotensor, sugerindo que, a alamandina pode ser formada a partir da Ala¹-Ang-(1-9).

De forma interessante, os efeitos mediados pelo análogo, Ang-(1-9), são em sua maior parte atribuídos ao receptor AT₂. Contudo, a ferramenta farmacológica que vem sendo utilizada para avaliar a interação Ang-(1-9)/AT₂, é o antagonista do receptor AT₂, PD123319, o qual recentemente foi demonstrado ser também antagonista do receptor MrgD (Lautner *et al.*, 2013). Estes dados, sustentam ainda mais nossa suspeita de que a Ang-(1-9) pode ser descarboxilada em sua porção N terminal, formando Ala¹-Ang-(1-9) que, subseqüentemente, pode levar a formação de alamandina.

Além disso, muitos achados interessantes indicam que a Ang-(1-9) pode ser convertida em Ang II em alguns tecidos, mas as enzimas responsáveis por esse processo são desconhecidas até agora (KRAMKOWSKI; MOGIELNICKI; BUCZKO, 2006). Em um trabalho utilizando homogenatos de rim de rato, e em menor extensão de pulmão, os autores demonstraram a conversão de Ang-(1-9) em Ang II, provavelmente através da carboxipeptidase tipo N (DRUMMER; KOURTIS; JOHNSON, 1988). Sabe-se que a Ang-(1-9) é metabolizada pela ECA em Ang-(1-7), e ainda em Ang-(1-5) e Ang-(1-4). No entanto, Drummer e colaboradores (1988) mostraram que, no rim, o principal produto (71%) da conversão de Ang-(1-9) é a Ang II, acompanhado por pequenas quantidades de Ang III e Ang-(2-9). Além disso, em um trabalho realizado em 2005, os autores confirmaram que a via Ang I-Ang-(1-9)-Ang II realmente existe em glomérulos de ratos (SINGH; SINGH; LEEHEY, 2005).

Levando em consideração a já citada similaridade estrutural entre a Ala¹-Ang-(1-9) e a Ang-(1-9), podemos sugerir, então, que o peptídeo Ang A seja um possível produto da metabolização da Ala¹-Ang-(1-9), o que pode explicar nossos achados anteriores, no qual, a administração de doses mais altas de Ala¹-Ang-(1-9) em ratos normotensos promoveu aumentos da PA, que foram, posteriormente, revertidos pela presença do antagonista do receptor AT₁. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de que possa haver uma interação com o receptor AT₁ por algum outro produto secundário e biologicamente ativo derivado da Ala¹-Ang-(1-9). Um possível candidato é o já caracterizado peptídeo alamandina, o qual, como será discutido a seguir, poderia desencadear tais efeitos em maiores doses.

Apesar de aparentemente a Ala¹-Ang-(1-9) não apresentar efeitos fisiológicos importantes na PA decidimos avaliar sua ação *in vitro*. Utilizando a técnica de reatividade vascular, mostramos que o peptídeo promove pequeno efeito vasodilatador concentração-dependente em anéis de aorta de ratos. Este resultado é corroborado por trabalhos anteriores, no qual, a administração de Ang-(1-9) induziu efeito de relaxamento vascular tanto em ratos quanto em camundongos. Nossos achados demonstram, então, que apesar da Ala¹-Ang-(1-9) induzir efeito vasodilatador, o mesmo não foi suficiente para induzir alterações da PA.

Como a alamandina parece, até o momento, ser o último peptídeo da rota de síntese das alatensinas, podendo ser formada pela Ala¹-Ang I, Ala¹-Ang-(1-9) e Ang A, resolvemos, então, verificar seus efeitos no sistema cardiovascular. Para isso, primeiramente, testamos o efeito da injeção i.v. de doses crescentes (0,0025; 0,005; 0,01; 0,02; 0,2; 1; 5; 20; 40; 80 ng) de alamandina em ratos normotensos SD. Observamos que houve diminuição significativa da PA, sendo que esses efeitos hemodinâmicos se iniciam apenas em uma dose intermediária e relativamente baixa (0,02 ng), produzindo, assim, uma curva dose-resposta em forma de U. Esse resultado é parcialmente corroborado por trabalhos que já haviam demonstrado efeito hipotensor da alamandina (LAUTNER *et al.*, 2013). Como esperado, a diminuição da PA foi completamente abolida na presença de Dpro⁷, confirmando os dados de Lautner e colaboradores, que indicaram a alamandina como o ligante endógeno para o receptor MrgD.

Nas maiores doses testadas, foi observado um pequeno aumento da PA nos animais pré-tratados com o antagonista do MrgD. Com a finalidade de testar se o padrão de resposta em U e o próprio efeito pressor se deviam à estimulação do receptor AT₁, estudamos o envolvimento do receptor AT₁ na modulação da resposta cardiovascular promovida pela administração de alamandina em ratos pré-tratando com o antagonista losartan na dose de 5 mg/kg. Nessa condição, observamos o aumento da resposta hipotensora. Além disso, o efeito pressor observado nas doses maiores, foi abolido. No entanto, o padrão em U da curva dose resposta se manteve. Nesta circunstância, esperávamos, entretanto, que a administração de maiores doses de alamandina associada ao antagonismo do receptor AT₁ induzisse maiores efeitos na PA, levando a um padrão de curva dose-resposta linear. Uma possível explicação para este achado pode se dever ao fato da dose de losartan utilizada não ser suficiente

para bloquear o efeito das doses mais elevadas da alamandina, na qual, passaria novamente a se ligar ao receptor AT₁.

Trabalhos anteriores já haviam relatado que doses intravenosas de 1 a 15mg/kg de losartan promovem bloqueio significativo do receptor AT₁. A dose utilizada neste trabalho foi, inclusive escolhida considerando relatos prévios na literatura (Kauffman et al., 1991; Levine e outros, 1996; Wang e outros, 1997), incluindo um estudo farmacocinético sobre o losartan (Moon et al., 1998). Entretanto, em um trabalho em que foi utilizado o losartan na dose de 1 a 3 mg/kg, observou-se uma inibição bifásica na resposta pressora produzida pela administração da Ang II (WONG *et al.*, 1990). Além disso, o tempo de meia vida plasmática (T_{1/2}) do losartan foram avaliados por pelo menos dois trabalhos farmacocinéticos. Yang e colaboradores relataram que o T_{1/2} do losartan foi entre seis e nove horas (YANG, SI-HYUNG; CHO; CHOI, 2011). Em um segundo trabalho, os autores demonstram ser entre, uma hora e trinta minutos e quatro horas (YOSHITANI *et al.*, 2002). Em razão do tempo total que foi necessário para realização do nosso protocolo experimental (3h), o T_{1/2} do antagonista poderia, neste caso, ser relevante. Estudos posteriores são necessários a fim de excluir esta hipótese.

Em conjunto, nossos achados sugerem o envolvimento do receptor AT₁ nos efeitos observados, conclusão semelhante à obtida por Hekmat e colaboradores (2017) em ratos com hipertensão renovascular anestesiados. Entretanto, Leão e colaboradores (2018), utilizando outras linhagens de ratos (Wistar, SHR-SP) observaram que o losartan aboliu, ao invés de aumentar a ação vasorelaxante da alamandina. Além disso, o bloqueio do receptor AT₁ no CVLM não alterou o efeito hipotensor da alamandina (SOARES *et al.*, 2017). Ademais, em um trabalho preliminar realizado em nosso laboratório, o Losartan reduziu o efeito vasodilatador da alamandina em aorta isolada de ratos (Sanglard., 2018). Em um outro estudo, envolvendo o seu análogo, Neves e colaboradores demonstraram que o efeito vasorelaxante mediado pela Ang-(1-7) em artéria mesentérica de ratos Sprague-Dawley é bloqueado pelo uso de Losartan. Corroborando esses estudos, Velkoska e colaboradores demonstraram que a infusão de Ang-(1-7) em ratos foi associada a aumentos na pressão arterial e aceleração da hipertrofia e fibrose cardíaca, sugerindo o envolvimento do receptor AT₁ nas ações da Ang-(1-7).

Em conjunto, esses estudos reforçam claramente a complexidade envolvida na interação ligante-receptor e as suas repercussões no sistema cardiovascular.

Apesar de atualmente se conhecer os sítios específicos de ligação das principais angiotensinas não é incomum encontrarmos a interação de um peptídeo com dois ou mais sítios de ligação. Nesse sentido, foi demonstrado que o agonista seletivo para o receptor AT_2 , CGP42112A, em altas concentrações, pode exercer efeito nos receptores AT_1 (HINES *et al.*, 2001).

Estudos utilizando técnicas como o binding e animais com deleção genética do receptor AT_1 ou MrgD precisam ser realizados com o objetivo de esclarecer o papel modulatório destes receptores nos efeitos cardiovasculares da alamandina. Além disso, é importante destacar que os efeitos hipotensores da alamandina são mais evidentes quando o peptídeo é administrado em doses intermediárias. Inclusive, os efeitos relacionados às outras angiotensinas e, atribuídos neste estudo, à formação de alamandina são, de forma interessante, observados apenas a partir da injeção das doses intermediárias de 5 ou 10 ng desses peptídeos. Isso reforça o padrão de curva em U formado pela administração de diferentes doses de alamandina. Além de nossas evidências da participação do receptor AT_1 nos efeitos mediados pela alamandina, uma outra hipótese para explicar o padrão de resposta em U seria que a alamandina, em altas concentrações, poderia estimular outras vias de sinalização via seu receptor MrgD que levassem a vasoconstrição.

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que os peptídeos que compõem o eixo das angiotensinas, Ala¹-Ang I, Ang A e Ala¹-Ang-(1-9) são biologicamente ativos e, de forma direta ou indireta, são metabolizados, levando à subsequente formação de alamandina. Além disso, os efeitos cardiovasculares observados neste estudo, são similares aos descritos previamente para os peptídeos análogos que compõem o eixo clássico do SRA. Nosso trabalho inicia uma nova era na pesquisa do SRA a partir da descrição e caracterização de uma nova via paralela ao eixo clássico.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P. *et al.* Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, v. 33, n. 6, p. 709–713, jun. 2000.
- BADER, Michael. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 50, p. 439–465, 2010.
- BASU, Ratnadeep *et al.* Roles of Angiotensin Peptides and Recombinant Human ACE2 in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 69, n. 7, p. 805–819, 21 fev. 2017.
- BRAUN-MENENDEZ, E. *et al.* The substance causing renal hypertension. *The Journal of Physiology*, v. 98, n. 3, p. 283–298, 24 jul. 1940.
- BRAUN-MENENDEZ, E.; PAGE, I. H. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. *Science (New York, N.Y.)*, v. 127, n. 3292, p. 242, 31 jan. 1958.
- BRUNNER, H. R. *et al.* Angiotensin II antagonists DuP 753 and TCV 116. *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*, v. 12, n. 9, p. S29-34, nov. 1994.
- BUMPUS, F. Merlin; SCHWARZ, Hans; PAGE, Irvine H. Synthesis and Pharmacology of the Octapeptide Angiotonin. *Science*, v. 125, n. 3253, p. 886–887, 3 maio 1957.
- CAREY, Robert M. Newly Discovered Components and Actions of the Renin–Angiotensin System. *Hypertension*, v. 62, n. 5, p. 818–822, 11 jan. 2013.
- CASSIS, L. A.; LYNCH, K. R.; PEACH, M. J. Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta. *Circulation Research*, v. 62, n. 6, p. 1259–1262, jun. 1988.
- CHAPPELL, M. C. *et al.* Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, v. 31, n. 1 Pt 2, p. 362–367, jan. 1998.
- COUTINHO, Danielle CO *et al.* Cardiovascular effects of angiotensin A: A novel peptide of the renin–angiotensin system. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, v. 15, n. 4, p. 480–486, 1 dez. 2014.
- CUSHMAN, D. W. *et al.* Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*, v. 16, n. 25, p. 5484–5491, 13 dez. 1977.
- DA SILVA, Analina R. *et al.* Alamandine abrogates neutrophil degranulation in atherosclerotic mice. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 47, n. 2, p. 117–128, fev. 2017.

DE JESUS, Itamar Couto Guedes *et al.* Alamandine acts via MrgD to induce AMPK/NO activation against Ang II hypertrophy in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 14 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpcell.00153.2017>>. Acesso em: 21 maio 2018.

DONG, Xinzhong *et al.* A Diverse Family of GPCRs Expressed in Specific Subsets of Nociceptive Sensory Neurons. *Cell*, v. 106, n. 5, p. 619–632, 7 set. 2001.

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

DRUMMER, O. H.; KOURTIS, S.; JOHNSON, H. Formation of angiotensin II and other angiotensin peptides from des-leu 10-angiotensin I in rat lung and kidney. *Biochemical Pharmacology*, v. 37, n. 22, p. 4327–4333, 15 nov. 1988.

DZAU, V. J. Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: emphasis on cardiovascular control. *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*, v. 6, n. 3, p. S7-12, dez. 1988.

ERDOS, E. G.; YANG, H. Y. An enzyme in microsomal fraction of kidney that inactivates bradykinin. *Life Sciences*, v. 6, n. 6, p. 569–574, 15 mar. 1967.

FERRARIO, C. M. *et al.* Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 535–541, set. 1997.

FERRARIO, Carlos M. *et al.* Advances in the renin angiotensin system focus on angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7). *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, v. 59, p. 197–233, 2010.

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

FERREIRA, S. H. *et al.* Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. *Nature*, v. 225, n. 5230, p. 379–380, 24 jan. 1970.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. *Biochemistry*, v. 9, n. 13, p. 2583–2593, 23 jun. 1970.

FLORES-MUÑOZ, M *et al.* Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *The Journal of Physiology*, v. 589, n. Pt 4, p. 939–951, 15 fev. 2011.

FLORES-MUNOZ, Monica *et al.* Angiotensin-(1-9) Attenuates Cardiac Fibrosis in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat via the Angiotensin Type 2 Receptor. *Hypertension*, v. 59, n. 2, p. 300–307, 1 fev. 2012.

FREEMAN, Norman E.; PAGE, Irvine H. Hypertension produced by constriction of the renal artery in sympathectomized dogs. *American Heart Journal*, v. 14, n. 4, p. 405–414, 1 out. 1937.

FUNKE-KAISER, Heiko *et al.* Adapter proteins and promoter regulation of the angiotensin AT2 receptor--implications for cardiac pathophysiology. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS*, v. 11, n. 1, p. 7–17, mar. 2010.

GANTEN, D.; SPECK, G. The brain renin-angiotensin system: a model for the synthesis of peptides in the brain. *Biochemical Pharmacology*, v. 27, n. 20, p. 2379–2389, 1978.

GOLDBLATT, H. *et al.* STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION : I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 59, n. 3, p. 347–379, 28 fev. 1934.

HABIYAKARE, Belthrand *et al.* Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). *International Journal of Experimental Pathology*, v. 95, n. 4, p. 290–295, ago. 2014.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C.; MIZELLE, H. L. Role of the renin-angiotensin system in control of sodium excretion and arterial pressure. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, v. 591, p. 48–62, 1990.

HALL, John E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Molecular Biotechnology*, v. 24, n. 1, p. 27–39, [S.d.].

HELMER, O. M. Differentiation between two forms of angiotonin by means of spirally cut strips of rabbit aorta. *The American Journal of Physiology*, v. 188, n. 3, p. 571–577, mar. 1957.

HENRION, D.; KUBIS, N.; LÉVY, B. I. Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension*, v. 38, n. 5, p. 1150–1157, nov. 2001.

HINES, J. *et al.* Identification of angiotensin II type 2 (AT2) receptor domains mediating high-affinity CGP 42112A binding and receptor activation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 298, n. 2, p. 665–673, ago. 2001.

HRENAK, Jaroslav; PAULIS, Ludovit; SIMKO, Fedor. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 7, 20 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4964474/>>. Acesso em: 22 fev. 2017.

INAGAMI, Tadashi. A Memorial to Robert Tiegerstedt The Centennial of Renin Discovery. *Hypertension*, v. 32, n. 6, p. 953–957, 12 jan. 1998.

JANEWAY, Theodore C. Note on the blood-pressure changes following reduction of the renal arterial circulation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 6, n. 4, p. 109–111, 1 abr. 1909.

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

JR, Adeleke Badejo *et al.* Analysis of hemodynamic responses and the proliferative effect of the novel angiotensin peptide Angiotensin A. *The FASEB Journal*, v. 23, n. 1 Supplement, p. 935.2-935.2, 4 jan. 2009.

KASCHINA, Elena; UNGER, Thomas. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Pressure*, v. 12, n. 2, p. 70–88, 2003.

KIM, S.; IWAO, H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Reviews*, v. 52, n. 1, p. 11–34, mar. 2000.

KRAMKOWSKI, K.; MOGIELNICKI, A.; BUCZKO, W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, v. 57, n. 4, p. 529–539, dez. 2006.

LARAGH, J. H. *et al.* Hypotensive agents and pressor substances. The effect of epinephrine, norepinephrine, angiotensin II, and others on the secretory rate of aldosterone in man. *JAMA*, v. 174, p. 234–240, 17 set. 1960.

LAUTNER, Roberto Queiroga *et al.* Discovery and Characterization of Alamandine A Novel Component of the Renin–Angiotensin System. *Circulation Research*, v. 112, n. 8, p. 1104–1111, 4 dez. 2013.

LEMOS, Virgínia S. *et al.* Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of phenylephrine-induced contraction in the aorta of mRen-2 transgenic rats. *British Journal of Pharmacology*, v. 135, n. 7, p. 1743–1748, abr. 2002.

LEMOS, Virginia S. *et al.* The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 46, n. 3, p. 274–279, set. 2005.

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

LIU, Chi *et al.* Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Amino Acids*, 12 maio 2018.

MARINS FR *et al.* *Alamandine but not angiotensin-(1-7) produces cardiovascular effects in the Insular Cortex.* . San Francisco, CA: [s.n.] , 2014

MEHTA, Puja K.; GRIENGLING, Kathy K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, v. 292, n. 1, p. C82-97, jan. 2007.

- MENDOZA-TORRES, Evelyn *et al.* ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, v. 9, n. 4, p. 217–237, 1 ago. 2015.
- NAGATA, Sayaka *et al.* Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 350, n. 4, p. 1026–1031, 1 dez. 2006.
- NG, K. K.; VANE, J. R. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature*, v. 216, n. 5117, p. 762–766, 25 nov. 1967.
- OCARANZA, Maria Paz *et al.* Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *Journal of Hypertension*, v. 32, n. 4, p. 771–783, abr. 2014.
- OCARANZA, María Paz; JALIL, Jorge E. Protective Role of the ACE2/Ang-(1-9) Axis in Cardiovascular Remodeling. *International Journal of Hypertension*, v. 2012, p. 594361, 2012.
- OLIVEIRA A *et al.* *Mas-Related G-Protein Coupled Receptor D deficiency leads to a marked dilated cardiomyopathy in mice.* . San Francisco, CA: [s.n.] . , 2017
- OLIVEIRA AC *et al.* *Immunofluorescence detection of MrgD expression in rodents.* . Salvador, brazil: [s.n.]. , 2014
- ONDETTI, M. A. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry*, v. 10, n. 22, p. 4033–4039, 26 out. 1971.
- SAMPAIO, Walkyria Oliveira *et al.* Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, v. 49, n. 1, p. 185–192, jan. 2007.
- SANTOS, R. A. *et al.* Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 1153-157, fev. 1988.
- SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides*, v. 91, n. 1–3, p. 45–62, 28 jul. 2000.
- SANTOS, Robson Augusto Souza *et al.* The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiological Reviews*, v. 98, n. 1, p. 505–553, 1 jan. 2018.
- SCHIAVONE, M. T. *et al.* Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 85, n. 11, p. 4095–4098, jun. 1988.
- SCHLING, P. *et al.* Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, v. 23, n. 4, p. 336–341, abr. 1999.

SHEN, Yi-Hui *et al.* Alamandine injected into the paraventricular nucleus increases blood pressure and sympathetic activation in spontaneously hypertensive rats. *Peptides*, v. 103, p. 98–102, 1 maio 2018.

SINGH, Rekha; SINGH, Ashok K.; LEEHEY, David J. A novel mechanism for angiotensin II formation in streptozotocin-diabetic rat glomeruli. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, v. 288, n. 6, p. F1183-1190, jun. 2005.

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

SKEGGS, Leonard T.; KAHN, Joseph R.; SHUMWAY, Norman P. THE PREPARATION AND FUNCTION OF THE HYPERTENSIN-CONVERTING ENZYME. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 103, n. 3, p. 295–299, 29 fev. 1956.

SNYDER, R. A.; WATT, K. W.; WINTROUB, B. U. A human platelet angiotensin I-processing system. Identification of components and inhibition of angiotensin-converting enzyme by product. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 260, n. 13, p. 7857–7860, 5 jul. 1985.

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

SOFFER, R. L. Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annual Review of Biochemistry*, v. 45, p. 73–94, 1976.

TAUGNER, R. *et al.* The intrarenal renin-angiotensin-system. An immunocytochemical study on the localization of renin, angiotensinogen, converting enzyme and the angiotensins in the kidney of mouse and rat. *Klinische Wochenschrift*, v. 60, n. 19, p. 1218–1222, 1 out. 1982.

TIEGERSTEDT R, Bergman PG. Niere und Kreislauf. *Skandinavisches Archiv für Physiologie.*, 1898. 8, p. 223–271.

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

TIMMERMANS, P. B. *et al.* Angiotensin II receptors and functional correlates. *American Journal of Hypertension*, v. 5, n. 12 Pt 2, p. 221S-235S, dez. 1992.

TURNER, Anthony J.; HOOPER, Nigel M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 23, n. 4, p. 177–183, 1 abr. 2002.

UCHIYAMA, Tsuyoshi *et al.* Alamandine reduces leptin expression through the c-Src/p38 MAP kinase pathway in adipose tissue. *PLoS ONE*, v. 12, n. 6, 7 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5462406/>>. Acesso em: 21 maio 2018.

VICKERS, Chad *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 17, p. 14838–14843, 26 abr. 2002.

WONG, P. C. *et al.* Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VIII. Characterization of functional antagonism displayed by DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 252, n. 2, p. 719–725, fev. 1990.

YANG, Rui *et al.* Pressor and Renal Hemodynamic Effects of the Novel Angiotensin A Peptide Are Angiotensin II Type 1A Receptor Dependent. *Hypertension*, v. 57, n. 5, p. 956–964, 5 jan. 2011.

YANG, Si-hyung; CHO, Young-ah; CHOI, Jun-shik. Effects of ticlopidine on pharmacokinetics of losartan and its main metabolite EXP-3174 in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 32, n. 7, p. 967–972, jul. 2011.

YE, Minghao *et al.* Murine recombinant angiotensin-converting enzyme 2: effect on angiotensin II-dependent hypertension and distinctive angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor characteristics on rodent and human angiotensin-converting enzyme 2. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, v. 60, n. 3, p. 730–740, set. 2012.

YOSHITANI, Takashi *et al.* Effect of experimental renal failure on the pharmacokinetics of losartan in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 25, n. 8, p. 1077–1083, ago. 2002.