

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia –**  
**Mestrado**

Júlia Rezende Ribeiro

**QUANTIFICAÇÃO TEMPORAL DE COMPONENTES DO SISTEMA RENINA**  
**ANGIOTENSINA NO PERÍODO CLARO/ESCURO**

Belo Horizonte

2023

Júlia Rezende Ribeiro

**QUANTIFICAÇÃO TEMPORAL DE COMPONENTES DO SISTEMA RENINA  
ANGIOTENSINA NO PERÍODO CLARO/ESCURO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Biofísica e do Departamento de Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Verano-Braga

Belo Horizonte, 2023.

043

Ribeiro, Júlia Rezende.

Quantificação temporal de componentes do Sistema Renina Angiotensina no período claro/escuro [manuscrito] / Júlia Rezende Ribeiro. – 2023.  
60 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Verano-Braga.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Sistema Renina-Angiotensina. 3. Relógios Biológicos. I. Braga, Thiago Verano. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



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

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 573 DE JÚLIA REZENDE RIBEIRO**

Às 14:00 horas do dia 07 do mês de agosto de 2023, na Sala de Seminários I3 - 236 - Genética e Ecologia, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Júlia Rezende Ribeiro**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Thiago Verano Braga**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Daniella Bonaventura**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra Cibele Rocha Resende**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Prof. Dr. Thiago Verano Braga**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Quantificação Temporal de Componentes do Sistema Renina Angiotensina no Período Claro/escuro**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, será assinada pela Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 07 de agosto de 2023.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Cibele Rocha Resende, Professora do Magistério Superior**, em 08/08/2023, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura, Professora do Magistério Superior**, em 08/08/2023, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Verano Braga, Professor do Magistério Superior**, em 08/08/2023, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2529545** e o código CRC **E40ED524**.

## APOIO INSTITUCIONAL

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hipertensão, no Núcleo de Proteômica Funcional (NPF) do Departamento de Fisiologia e Biofísica e no Laboratório Multiusuário de Proteômica (LMProt) do Centro de Laboratórios Multiusuários (CELAM), do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais

Recebemos o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## AGRADECIMENTOS

A minha família, meu orientador, colegas de laboratório e amigos que estiveram comigo nos melhores e piores momentos, sem vocês eu não seria capaz de concluir esse trabalho.

## Resumo

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é um componente neuroendócrino do organismo, podendo ser circulante ou tecidual, e um importante modulador da homeostase. Ele pode ser dividido em dois eixos funcionais: o canônico, com efeito hipertensivo, fibrótico e proliferativo e o não-canônico, que o antagoniza, induzindo efeitos geralmente protetores. Já foi observado que diversos processos fisiológicos possuem um padrão de oscilação ao longo do tempo, influenciados principalmente pela exposição à luz e pela expressão dos “genes do relógio” ao longo do dia. Essas alterações cíclicas são um importante fator na homeostase dos sistemas. As oscilações dos componentes do SRA ainda não foram completamente elucidadas, no entanto, há fortes indícios de que esse sistema apresenta mudanças temporais. Por exemplo, é observada uma maior incidência de acidentes vasculares no período da manhã, alterações na pressão arterial ao longo do dia e mudanças na atividade da enzima Renina e nas concentrações da Angiotensina II, quantificada através da técnica de radioimunoensaio. Dessa forma, esse trabalho buscou avaliar se os componentes peptídicos circulantes do SRA realmente sofrem alterações temporais nas suas concentrações, utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa direcionada (LC-MRM). Nossos resultados mostraram que, com exceção da Ang A, todos os peptídeos quantificados apresentaram algum grau de variação em suas concentrações nos diferentes tempos (ZTs) testados, demonstrando que os componentes circulantes tanto do eixo canônico quanto do não canônico possuem variação temporal. Contudo, o mecanismo pelo qual a concentração plasmática de tais peptídeos é regulada ao longo do dia ainda precisa ser elucidado.

**Palavras chave:** Ritmo Biológico, Sistema Renina-Angiotensina, Espectrometria de massa

## Abstract

The Renin-Angiotensin System (RAS) is a neuroendocrine component of the organism, which can be circulating or local - expressed in tissues -, and it plays a crucial role as a modulator of homeostasis. It can be divided into two functional axes: the canonical axis, with hypertensive, fibrotic, and proliferative effects, and the non-canonical axis, which counteracts these effects, inducing generally protective responses. It has been observed that several physiological processes have a pattern of oscillation over time, influenced mainly by exposure to light and the expression of “clock genes” throughout the day. These cyclic changes are essential for the homeostasis of the systems. However, the oscillations of the components of the RAS have not been fully elucidated, although there are strong indications that this system undergoes temporal changes. For instance, a higher incidence of vascular accidents is observed in the morning, fluctuations in blood pressure throughout the day, changes in the activity of the enzyme Renin and in the concentrations of Angiotensin II, quantified through the radioimmunoassay technique. Therefore, this study aimed to evaluate whether the circulating peptide components of RAS indeed undergo temporal alterations in their concentrations using liquid chromatography coupled with targeted mass spectrometry (LC-MRM). Our results showed that, with the exception of Ang A all quantified peptides showed some degree of variation in their concentrations at different time points (ZTs) tested, demonstrating that the circulating peptides of both the canonical and non-canonical axis have temporal variations. However, the mechanism by which the plasma concentration of such peptides is regulated throughout the day still needs to be elucidated.

**Keywords:** Biological Rhythm, Renin-Angiotensin System, Mass spectrometry

## Lista de figuras

Figura 1 : Exemplos de diferentes ritmos biológicos .....	13
Figura 2: Cascata de regulação mediada pelo SCN nos relógios locais em mamíferos	16
Figura 3: Acoplamento circadiano entre loops de feedback molecular e sinalização neural....	18
Figura 4: Cascata de formação dos peptídeos do sistema renina-angiotensina: visão simplificada dos eixos .....	20
Figura 5: Alguns efeitos desencadeados pela ligação dos peptídeos do eixo pressor aos receptores AT1 .....	22
Figura 6: Alguns efeitos desencadeados pela ligação dos peptídeos do eixo protetor aos receptores AT2, MAS e MrgD .....	24
Figura 7: Esquema do método utilizado para a quantificação dos componentes do SRA35	
Figura 8: Concentração plasmática do peptídeo Ang I nos quatro diferentes ZTs avaliados	36
Figura 9: Concentrações plasmáticas do peptídeo Ang II nos quatro diferentes ZTs avaliados .....	37
Figura 10: Concentrações plasmáticas do peptídeo Ang A nos quatro diferentes ZTs avaliados .....	38
Figura 11: Concentrações plasmáticas do peptídeo Ang-(1-7) nos quatro diferentes ZTs avaliados .....	39
Figura 12: Concentrações plasmáticas do peptídeo Ang-(1-5) nos quatro diferentes ZTs avaliados .....	40
Figura 13: Concentrações plasmáticas do peptídeo Alamandina nos quatro diferentes ZTs avaliados .....	41
Figura 14: Oscilação do peptídeo Angiotensina I .....	42
Figura 15: Oscilação do peptídeo Angiotensina II .....	43
Figura 16: Oscilação do peptídeo Angiotensina A .....	43
Figura 17: Oscilação do peptídeo Angiotensina-(1-7) .....	44
Figura 18: Oscilação do peptídeo Angiotensina-(1-5) .....	44
Figura 19: Oscilação do peptídeo Alamandina.....	45
Figura 20: Relação entre as concentrações dos peptídeos nos diferentes ZTs .....	46



## Lista de Tabelas

Tabela 1: Gradiente cromatográfico utilizado .....	32
Tabela 2: parâmetros dos peptídeos analisados no equipamento XEVO-TQS. ....	33

## Lista de Abreviaturas

\* Abreviações de palavras em inglês estão em itálico.

Ácido fórmico (AF)

Angiotensina 1-7 (Ang-(1-7))

Angiotensina 1-9 (Ang-(1-9))

Angiotensina A (Ang A)

Angiotensina I (Ang I)

Angiotensina II (Ang II)

Concentração intracelular de cálcio ( $[Ca^{2+}]$ )

Cromatografia líquida (*LC*)

Dissociação induzida por colisão (*CID*)

Enzima conversora de angiotensina I (ECA)

Enzima conversora de Angiotensina II (ECA 2)

Espécies reativas de oxigênio (*ROS*)

Espectrometria de massa (*MS*)

Genes controlados pelo relógio (*CCGs*)

Genes do período (PER)

Horários do dia (ZTs)

Infarto agudo do miocárdio (IAM)

Ionização por electrospray (*ESI*)

Íons potássio ( $K^{+}$ )

Íons sódio ( $\text{Na}^+$ )

Loops de feedback transcricional-translacional (*TTFLs*)

Massa/Carga ( $m/z$ )

Multiple reaction monitoring (*MRM*)

Núcleo paraventricular (*PVN*)

Núcleo supraquiasmático (*SCN*)

Óxido nítrico ( $\text{NO}$ )

Pressão arterial ( $\text{PA}$ )

Quadrupolo ( $Q$ )

Receptores acoplados à proteína G (*GPCRs*)

Sistema Renina-Angiotensina (*SRA*)

## Sumário

1. Introdução.....	12
1.1 Ritmo Biológico .....	12
1.1.1. Núcleo supraquiasmático.....	14
1.1.2. Relógio Celular.....	16
1.2. O Sistema Renina-Angiotensina.....	19
1.2.1. Eixo canônico / pressor.....	20
1.2.2. Eixo Protetor.....	22
1.3. Variações no sistema cardiovascular ao longo do dia .....	24
1.4. Métodos bioquímicos para quantificação de peptídeos .....	26
2. Objetivos.....	28
2.1. Objetivo Geral .....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. Materiais e Métodos .....	29
3.1. Animais.....	29
3.2. Reagentes Utilizados .....	29
3.3. Coleta do sangue.....	29
3.4. Extração de peptídeos plasmáticos .....	30
3.5. Análise de LC-MRM.....	31
3.5.1 Otimização do método MRM.....	31
3.5.2 Parâmetros Utilizados.....	32
3.6. Análise estatística .....	33
4. Resultados.....	36
4.1. Diferença na concentração plasmática .....	36
4.1.1. Eixo Canônico / Pressor .....	37
4.1.2. Eixo Não Canônico / Protetor.....	39
4.2. Testes de ritmicidade .....	41
4.2.1. Eixo Canônico / Pressor .....	43
4.2.2. Eixo Não Canônico / Protetor.....	44
4.3 Taxa de conversão relativa entre os peptídeos avaliados em diferentes ZTs .....	45
5. Discussão .....	47
6. Conclusão .....	52
7. Referências .....	54

# 1. Introdução

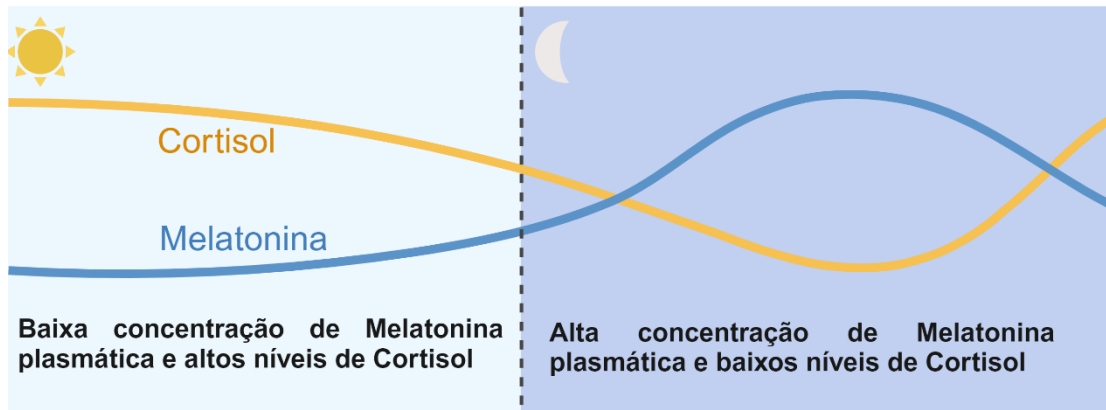
## 1.1 Ritmo Biológico

Os ritmos biológicos estão presentes em todos os organismos vivos e funcionam como uma adaptação para lidar com desafios ambientais previsíveis. Esses ritmos são caracterizados por eventos cíclicos que se repetem dentro de um período de tempo definido e podem ser divididos em três tipos principais: infradianos, que se repetem em intervalos maiores que 24 horas, como o ciclo menstrual, migração e hibernação de alguns animais; ultradianos, que se repetem em intervalos menores que 24 horas, como o ciclo cardíaco e respiratório; e os circadianos, que se repetem aproximadamente a cada 24 horas, como o sono/vigília em seres humanos (RENSING et al., 2001), como pode ser observado na Figura 1.

Os ritmos estão envolvidos em processos fisiológicos e comportamentais, podendo ser influenciados e controlados por fatores internos, como os relógios biológicos (central e periféricos), ou fatores externos, como a mudança das estações do ano (PITTENDRIGH et al., 1991 ; ALBRECHT et al., 2001 ; KENDALL et al., 2009). As adaptações dos indivíduos ao ambiente em que estão inseridos requer uma organização espacial e temporal de seus processos fisiológicos, a fim de manter a homeostase. Dentre esses ritmos, o ciclo circadiano é o mais conhecido e estudado. Sendo influenciado principalmente pelo ciclo claro-escuro do ambiente, determinado pela rotação da Terra. Dessa forma, em condições de luz ou escuridão constantes, o “relógio central” ou “marca-passo circadiano”, conhecido como núcleo supraquiasmático, pode se desregular ligeiramente, modificando a duração do ciclo (BURGESS et al., 2002 ; ZHANG et al., 2006 ; WU et al., 2008).

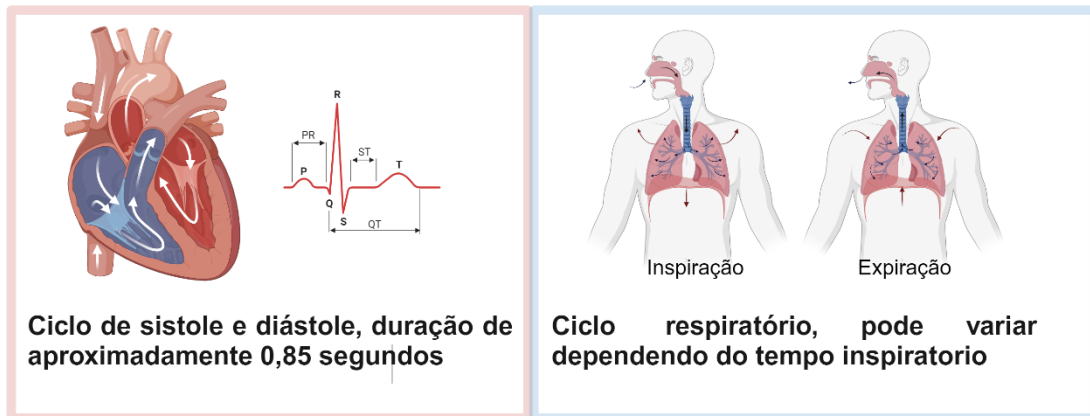
### A Ritmo Circadiano

Ciclo dos hormônios Melatonina e Cortisol no período claro/escuro em humanos



### B Ritmo Ultradiano

Ciclo cardíaco e respiratório em humanos



### C Ritmo Infradiano

Ciclo menstrual em humanos

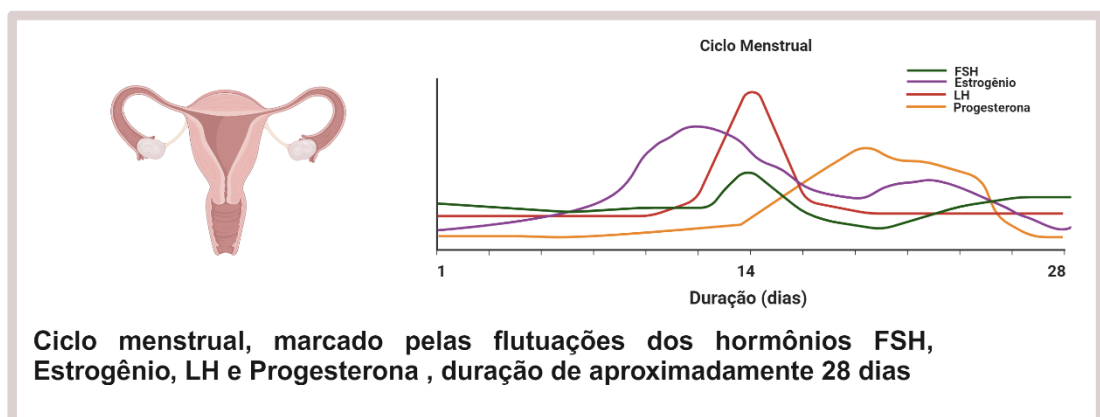


Figura 1 : Exemplos de diferentes ritmos biológicos; (a) Ritmo circadiano da Melatonina e do cortisol, oscilação aproximada de 24h. Essa ritmicidade está principalmente relacionada a resposta do SCN a luz, que irá estimular o hipotálamo durante a fase clara resultando na liberação de cortisol, por outro lado durante a fase escura a glândula

pineal será estimulada resultando na produção de melatonina. (b) Ritmo ultradiano do ciclo cardíaco e do ritmo respiratório, a duração dessas oscilações podem variar dependendo do nível de estresse do organismo. (c) Ritmo infradiano do ciclo menstrual, oscilação aproximada de 28 dias. O período de duração desse ciclo pode sofrer alterações entre os indivíduos e é influenciado pela ovulação, maturação do ovócito e consequentes níveis de liberação dos hormônios FSH, estrógeno, LH e Progesterona. (Imagem criada utilizando BioRender.com)

### 1.1.1. Núcleo supraquiasmático

O núcleo supraquiasmático (SCN, sigla em inglês), conhecido como “relógio central” (Figura 2), é formado por um conjunto de células neuronais localizadas no hipotálamo, conhecidas por impor e regular um ritmo diário no cérebro dos mamíferos, que pode ser interrompido quando há uma lesão nessa região (MOORE & EICHLER, 1972; STEPHAN & ZUCKER, 1972). Sua estrutura é altamente conservada nos animais e pode ser dividida em duas partes distintas, tanto molecularmente quanto morfológicamente, que são capazes de gerar ritmicidade de forma independente uma da outra (VAN DEN POL, 1980 ; VAN DEN POL & TSUJIMOTO, 1985 ; SHINOHARA et al., 1995). Esses neurônios possuem um relógio circadiano intrínseco e demonstram picos espontâneos de atividade elétrica que se repetem a cada 24h, aproximadamente, afetando a secreção de hormônios hipotalâmicos e, por consequência, os eixos endócrinos relacionados (HASTINGS et al., 2007 ; KALSBECK et al., 2012 ; TONSFELDT et al., 2012).

Por influenciar diretamente a atividade do hipotálamo, o SCN é fundamental para a regulação endócrina, pois ele é peça crucial nos três principais eixos do corpo: Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, Hipotálamo-Hipófise-Gônada e Hipotálamo-Hipófise-Tireóide, e uma vez que todos sofrem regulação pelo hipotálamo, também sofrem influência do relógio central (GUILDING et al., 2009). Os neurônios do SCN são regulados pela luz por meio do trato retino-hipotalâmico. Os fótons atingem a retina e estimulam os fotorreceptores, que enviam potenciais de ação para o SCN (Figura 2). Os neurônios pré-autonômicos do núcleo paraventricular (PVN) são um dos principais alvos do SCN, o que permite que ele influencie as eferências parassimpática e simpática para os órgãos. Essas projeções para o PVN aumentam durante a fase clara, afetando, por exemplo, a estimulação simpática eferente que inerva o fígado e a glândula adrenal, pouco antes do período ativo, resultando em uma maior produção de glicose (FLEUR et al., 1999) e aumentando os níveis de corticosterona, precursor do cortisol (BUIJS et al., 1999).

Os glicocorticóides são um dos principais hormônios relacionados ao período de atividade. Antes do despertar, ocorre um aumento significativo na liberação dos hormônios esteróides pelo córtex da adrenal e, conseqüentemente, em sua concentração plasmática. Isso afeta o metabolismo energético e o comportamento dos animais (DALLMAN et al., 1993), aumentando, por exemplo, a produção de energia e elevando a pressão arterial (CHUNG et al., 2011). Animais diurnos, como os seres humanos, apresentam um pico de glicocorticóides pela manhã, enquanto animais noturnos, como a maioria dos roedores, apresentam esse pico no início da noite. Além disso, podem ocorrer algumas alterações fisiológicas entre espécies, por exemplo, diferentemente dos humanos, em ratos, a corticosterona é o esteróide adrenal predominante, e não o cortisol (OGUNSUA et al., 1971).

Por outro lado, durante a fase escura, as projeções para os neurônios pré-sinápticos estimulam a glândula pineal, que sintetiza a melatonina. Esse hormônio é conhecido como o "hormônio do sono", pois é produzido em condições de escuridão constante, quando normalmente estamos dormindo. A melatonina é sintetizada a partir do neurotransmissor serotonina, através da ação catalítica de duas enzimas: a arilalquilamina-N-acetiltransferase e a hidroxindole-O-metiltransferase. A regulação das alterações na concentração desse hormônio, porém, parece estar mais relacionada à serotonina-N-acetiltransferase, uma vez que seus níveis também variam em paralelo com os da melatonina. Além disso, a exposição à luz durante a noite resulta em uma rápida queda nos níveis dessa enzima (KLEIN et al., 1972; GASTEL et al., 1998; HICKMAN et al., 1999). Na presença de luz, no entanto esses neurônios são inibidos pelos neurotransmissores GABA, interrompendo a produção de melatonina (PERREAU-LENZ et al., 2003). Esses processos são observados não apenas em animais diurnos; estudos demonstraram que roedores noturnos também apresentam um aumento significativo nos níveis de melatonina durante o período escuro (KENNAWAY et al., 2002).

Tanto os glicocorticóides quanto a melatonina desempenham um papel essencial na transmissão de informações do ambiente externo para o corpo, regulando suas funções de acordo com diferentes estímulos. No entanto, eles não são os únicos responsáveis pela ciclagem dos processos fisiológicos. Anteriormente, acreditava-se que os eventos cíclicos ocorriam apenas como resposta a alterações nos fatores ambientais, mas estudos demonstraram que os organismos não respondem de forma passiva ao ambiente, pois também possuem um relógio intrínseco que permite a percepção do tempo e a manutenção de um ritmo biológico (PARANJPE et al., 2003; GOLOMBEK et al., 2010).



Embora a luz desempenhe um papel importante na regulação do ritmo, ela atua principalmente como um componente modulador, auxiliando na sincronização para um período circadiano. O ritmo intrínseco é coordenado por fatores moleculares, conhecidos como genes do relógio, que estão presentes tanto nas células do SCN (relógio central) quanto em outros tecidos, os chamados relógios periféricos. No SCN, porém esse ritmo consegue se manter mesmo quando os neurônios são isolados *in vitro* (WEBB et al., 2009).

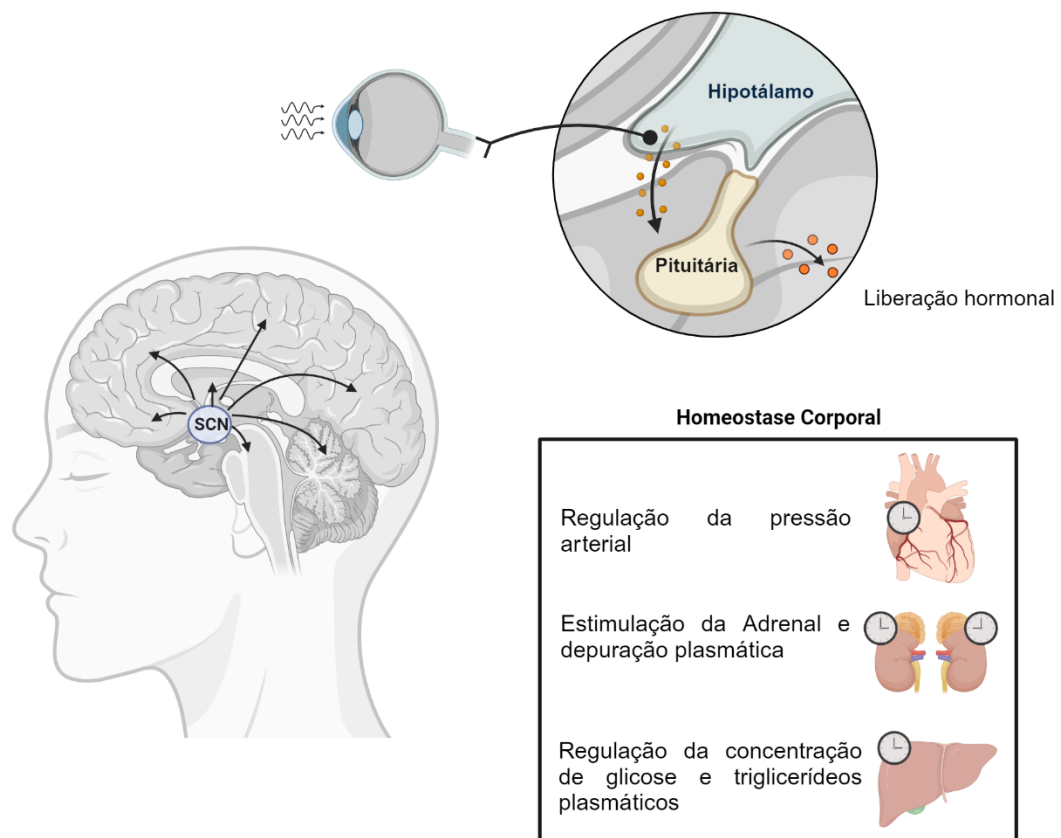


Figura 2: Cascata de regulação mediada pelo SCN nos relógios locais em mamíferos. Ao serem estimuladas por um estímulo luminoso as células da retina enviarão um sinal até o SCN, este por sua vez irá emitir diversos potenciais secundários que resultarão na estimulação circadiana dos relógios locais, levando ao controle da homeostase cerebral, humor e cognição. Além disso também estimulará os relógios periféricos resultando em uma regulação do sistema endócrino, da temperatura corporal, do comportamento alimentar, entre outros. (Imagem criada utilizando BioRender.com)

### 1.1.2. Relógio Celular

O relógio interno é composto por um ciclo de feedback negativo transcricional-traducional formado pelos genes centrais do relógio: CLOCK, Npas2, Bmal1/2, Cry1/2 e Per1/2/3 (WILSBACHER et al., 1998 ; DUNLAP et al., 1999 ; WAGER-SMITH et al., 2000). Esses genes pertencem a um grupo de fatores de transcrição com o domínio helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim, sendo Bmal, Npas2 e CLOCK ativadores transcricionais que regulam a expressão de Per e Cry ao se ligarem ao promotor conhecido como E-box (TAHARA et al., 2014).

CLOCK/Npas2 forma um heterodímero com Bmal1/2, e esse heterodímero CLOCK/Bmal se liga à E-box upstream de Per1/2/3 e Cry1/2. As proteínas PER1/2/3 e CRY1/2 são fosforiladas pela caseína quinase (CK)-1 $\epsilon$  e degradadas por meio de uma via proteossômica mediada por ubiquitina (TAKEDA et al., 2016). Em condições circadianas normais, PER1/2/3 e CRY1/2 se acumulam gradualmente no citoplasma e, ao serem direcionadas para o núcleo, elas se ligam ao heterodímero, inibindo CLOCK/Bmal. Quando seus níveis celulares diminuem novamente, o complexo CLOCK/Bmal volta a estimular a transcrição dessas proteínas, estabelecendo assim um ciclo de feedback negativo. Esse ciclo de feedback tem uma duração aproximada de 24 horas, marcando o ritmo diurno (FELDMAN et al., 1967; DRIESSCHE et al., 1966). Um exemplo da importância da ação conjunta de todos esses genes é evidenciado pela completa perda de ritmo circadiano, observada em camundongos deficientes em Bmal1 quando submetidos ao escuro contínuo ou por alterações comportamentais em períodos normais de claro/escuro (BUNGER et al., 2000).

A identificação e caracterização dos genes do relógio dos mamíferos revelaram que eles são expressos de maneira circadiana em quase todos os tecidos do corpo (DALLMANN et al., 2014). Esses genes, expressos em cada órgão, também exibem variação periódica constituindo os chamados relógios periféricos (BALSALOBRE et al., 1998). Com exceção de algumas diferenças específicas, a maior parte do sistema dos relógios periféricos parece ser semelhante ao do relógio central. Uma dessas pequenas diferenças que podemos citar inclui os genes Clif/Bmal2, que desempenham um papel predominante no relógio das células endoteliais vasculares e no fígado (MAEMURA et al., 2000), mas não são encontrados nas células do cólon, por exemplo (POLIDAROVÁ et al., 2013).

Os genes transcritos via as proteínas do relógio são denominados genes controlados pelo relógio (CCGs), e tanto o relógio central quanto os periféricos possuem CCGs que são regulados de forma independente dos demais tecidos. Além disso, os relógios periféricos desempenham um papel fundamental nas adaptações específicas necessárias para cada órgão

ou tecido. Como mencionado anteriormente, esses genes são peças fundamentais para a homeostase fisiológica e perturbações na sua ritmicidade estão associadas a diversas doenças metabólicas, neurológicas, entre outras (FRANK et al., 2014; PANDA, 2016). A Figura 3 ilustra o mecanismo de regulação dos genes do relógio ao longo do dia.

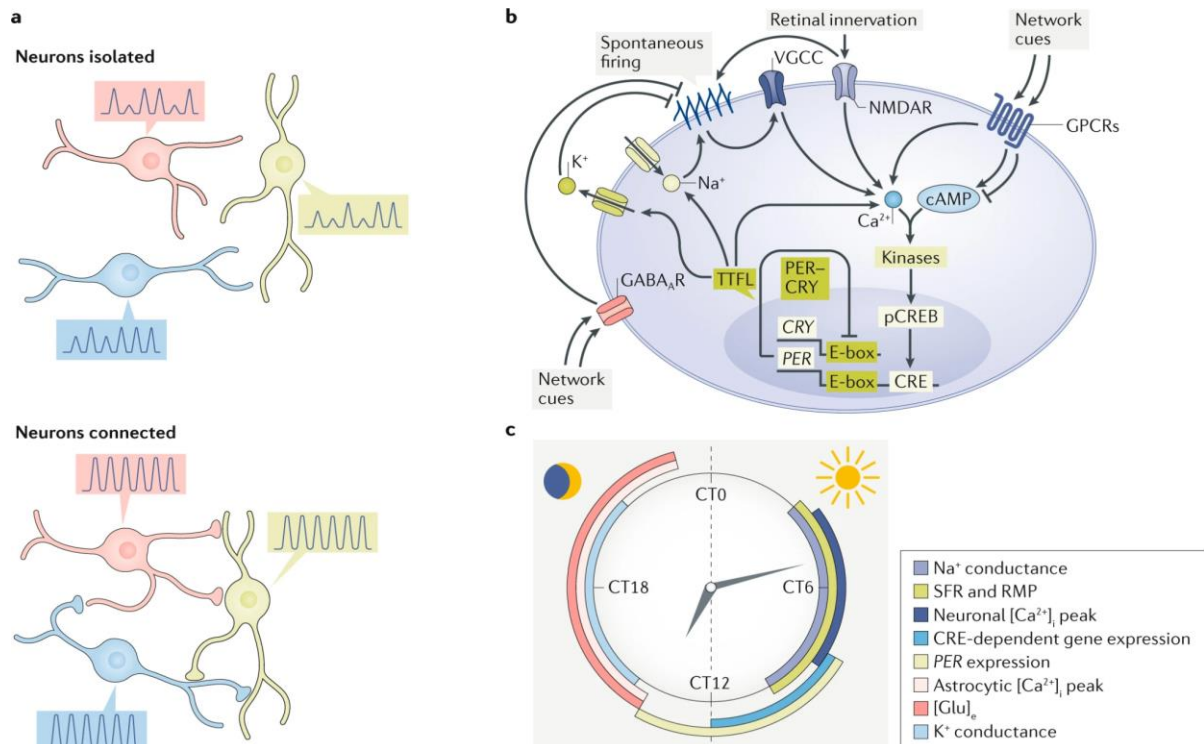


Figura 3: Acoplamento circadiano entre loops de feedback molecular e sinalização neural. A manutenção autônoma do ritmo circadiano das células no SCN é um processo dinâmico que envolve uma intrincada interação entre atividade elétrica e oscilação molecular dos loops de feedback transcricional-translacional (TTFLs). (a) Quando os neurônios do SCN são isolados em cultura, o TTFL celular autônomo mostra pouca organização e baixa amplitude, o que se reflete nos ritmos circadianos de expressão gênica e concentração intracelular de cálcio ([Ca<sup>2+</sup>]). No entanto, no circuito intacto, as interações celulares aumentam a estabilidade, coerência e amplitude dos TTFLs, sincronizando as células do relógio individualmente e resultando em ritmos precisamente organizados de expressão gênica e atividade neural. (b) Visão esquemática das vias intracelulares nos neurônios do SCN. Os TTFLs coordenam mudanças nas condutâncias de íons sódio (Na<sup>+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>) e na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, regulando a transição entre atividade elétrica diurna e quiescência noturna. O perfil circadiano de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> é controlado por vários mecanismos, incluindo canais ativados por disparo elétrico, liberação de Ca<sup>2+</sup> a partir de estoques intracelulares e sinalização de neuropeptídeos por meio de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e receptores de glutamato do tipo NMDA (NMDARs) ativados pelo trato retino-hipotalâmico. Mudanças em [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fornecem acesso ao TTFL através de elementos de resposta Ca<sup>2+</sup>/cAMP (CREs) nos genes do período (PER). (c) Visão esquemática de alterações no SCN durante 24h. CRY, criptocromo; CT, tempo circadiano; E-box, caixa de intensificador;

GABA<sub>A</sub>R, receptor GABA<sub>A</sub>; [Glu]<sub>e</sub>, concentração extracelular de glutamato; pCREB, proteína de ligação ao elemento responsivo ao cAMP fosforilado; RMP, potencial de membrana em repouso; SFR, taxa de disparo espontâneo; VGCC, canal de cálcio dependente de voltagem. Figura retirada de HASTINGS et al., 2018.

## 1.2. O Sistema Renina-Angiotensina

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) ou Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) é um sistema neuroendócrino conhecido por regular os fluidos e eletrólitos, a pressão arterial e o débito cardíaco. O SRA realiza essa regulação de diferentes formas e em diferentes tecidos, desde o aumento da atividade do sistema nervoso simpático até alteração da estrutura dos vasos sanguíneos. A primeira descoberta relacionada ao SRA foi feita por Tigerstedt e Bergman, no ano de 1898, quando eles obtiveram uma substância com efeito pressor a partir do extrato de córtex renal de coelhos, a essa substância deram o nome de Renina (TIGERSTEDT e BERGMAN, 1898; MARKS e MAXWELL, 1979). Muitos anos depois, no final da década de 1930, a Angiotensina II foi descoberta, por dois grupos científicos independentes, um na Argentina, liderado por Eduardo Braun-Menendez e que a chamava de “Hipertensina” ou, em inglês, “Hipertensin”, devido a sua atividade pressora, e por outro grupo nos Estados Unidos, chefiado por Irvin Page e que a denominou “Angiotonina” ou, em inglês, “Angiotonin” (BASSO e TERRAGNO, 2001). O nome Angiotensina é a junção dos nomes cunhados por Irvin e Braun-Menendez. Posteriormente, muitos estudos foram e vêm sendo feitos para elucidar os elementos que compõem o SRA e seus respectivos papéis fisiológicos, além das patologias que podem estar associadas a eles.

Diversos processos podem desencadear a ativação do SRA, um deles se dá quando há diminuição na volemia do corpo. Quando isso ocorre, as células da mácula densa liberam a enzima Renina na circulação. A Renina cliva a glicoproteína Angiotensinogênio, produzida majoritariamente pelo fígado, na porção amino-terminal, produzindo o decapeptídeo Angiotensina I (Ang I) (WEIR et al., 1999; ETELVINO et al., 2014). Ao que se sabe, esse peptídeo não possui efeito fisiológico direto, mas a partir da Ang I, o SRA poderá ser dividido em dois eixos diferentes, dependendo de qual(is) enzima(s) agirá(ão) sobre esse decapeptídeo. Esses eixos são contrarregulatórios e possuem vias de ação que se opõem para gerar a homeostase, cada um composto por uma gama de peptídeos efetores, que se diferem pouco estruturalmente, mas geram efeitos muito distintos ao se ligarem aos seus respectivos receptores. O sistema é dividido entre o eixo pressor ou canônico, conhecido por seu efeito

hipertensivo, fibrótico e proliferativo (VAAJANEN et al., 2008), e o que o antagoniza, chamado eixo não canônico ou protetor, com caráter anti-hipertensivos, anti-fibrótico e anti-proliferativo (SANTOS et al., 2017). A Figura 4 ilustra a cascata de formação dos peptídeos dos dois eixos funcionais do SRA.

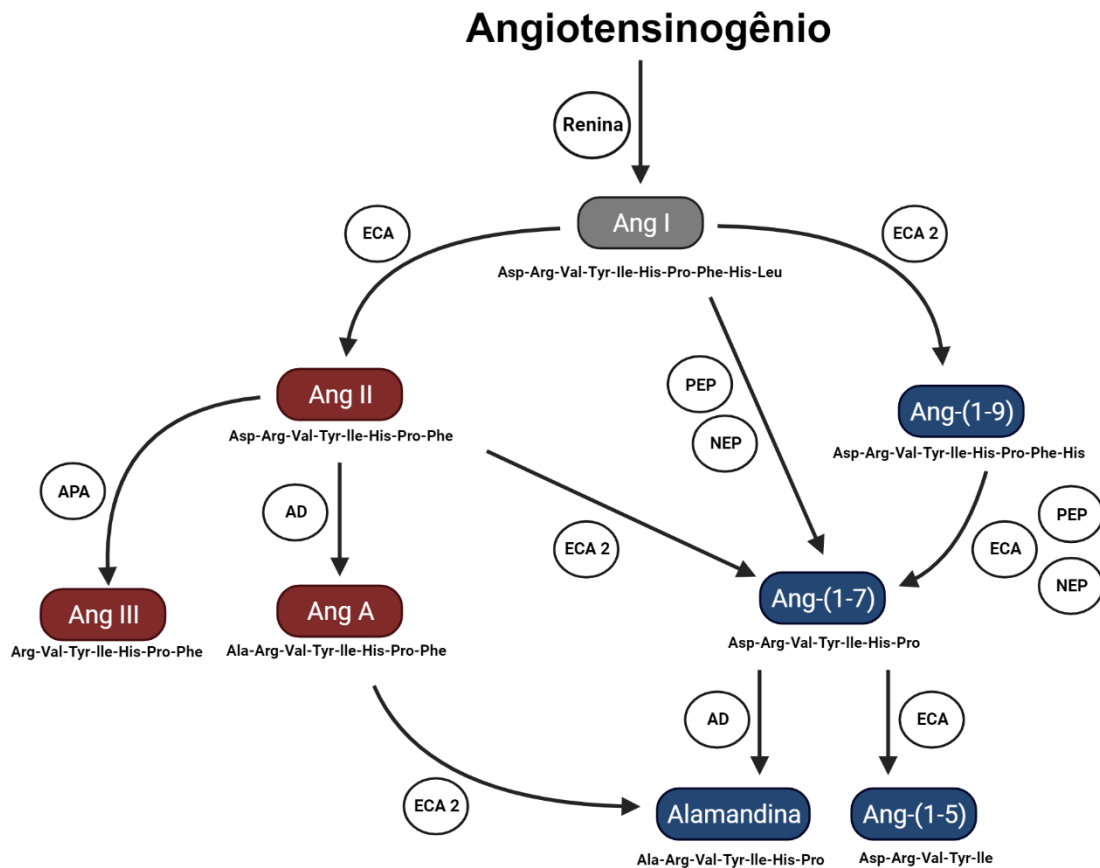


Figura 4: Cascata de formação dos peptídeos do sistema renina-angiotensina: visão simplificada dos eixos canônico/pressor (vermelho) e não canônico/protetor (azul). ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; NEP, endopeptidase neutra; AD, descarboxilase; PEP, prolyl-endopeptidase. (Imagem criada utilizando BioRender.com)

### 1.2.1. Eixo canônico / pressor

A Ang I é ativada após a clivagem do seu dipeptídeo C-terminal (His-Leu) pela enzima conversora de angiotensina I (ECA), descrita pela primeira vez por Skeggs et al. (SKEGGS et al., 1954) e presente principalmente no endotélio vascular. A Ang I forma o principal peptídeo biologicamente ativo do eixo pressor, a Angiotensina II (Ang II), que atua via dois receptores encontrados em diferentes tecidos, o AT1 e o AT2. Quando ativado pela Ang II, o receptor AT2 induz efeitos vasodilatadores, por outro lado, o receptor responsável pelos efeitos mais conhecidos da Ang II é o receptor AT1, como, por exemplo, o efeito pressor (vasoconstritor). A sua ligação ao AT1 diminui a liberação de óxido nítrico (NO), aumenta a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a um estado inflamatório, podendo gerar morte celular e deposição de colágeno (FORRESTER et al., 2018; FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008), além da liberação de Aldosterona pelas glândulas adrenais e a liberação do hormônio anti-diurético (ADH, sigla em inglês) pela neurohipófise ou hipófise posterior (FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008).

A Ang II apresenta ação sobre o crescimento celular e o remodelamento cardíaco (WILLIAMS, 2001). No rim, ela provoca vasoconstrição pós-glomerular ao se ligar aos receptores AT1, aumentando a pressão coloidosmótica capilar peritubular e diminuindo a pressão hidrostática capilar peritubular. Essas alterações hemodinâmicas levam à reabsorção de sódio e, conseqüentemente, de água na região do túbulo proximal dos néfrons, além da liberação de Aldosterona pela glândula adrenal. A Aldosterona, por sua vez, promove a reabsorção de sódio na porção do túbulo contorcido distal do néfron, resultando no aumento da volemia e da pressão arterial (WOLF et al., 1996). Outro efeito da Ang II é a liberação de catecolaminas pelo sistema nervoso simpático, o que leva ao aumento da contratilidade do miocárdio (WEIR et al., 1999).

Um peptídeo muito similar à Ang II foi descoberto em 2007, por Jankowski e colaboradores: a Angiotensina A (Ang A), sendo que "A" se refere ao resíduo de aminoácido alanina (Ala), que surge pela descarboxilação do aspartato (Asp) na porção N-terminal da Ang II, sendo a única diferença estrutural entre eles. Esse peptídeo leva fundamentalmente às mesmas alterações fisiológicas que o seu peptídeo precursor, se ligando aos receptores AT1 (JANKOWSKI et al., 2007; HRENAK et al., 2016). No entanto, ela apresenta um efeito pressor menos relevante do que a Ang II (YANG et al., 2011). A Figura 5 ilustra os principais efeitos da Ang II e Ang A, quando ativam o receptor AT1.

Apesar do seu importante papel na manutenção da homeostase, esse braço do SRA pode induzir efeitos deletérios quando hiperativado, podendo resultar em diferentes patologias, incluindo

aterosclerose e envelhecimento vascular (FYHRQUIST e SAIJONMAA, 2008). No entanto, em condições normais, seus efeitos são regulados pelo outro eixo do sistema: o eixo protetor, que também pode ser ativado pela Ang II ao se ligar ao seu receptor AT2 (Figura 6).

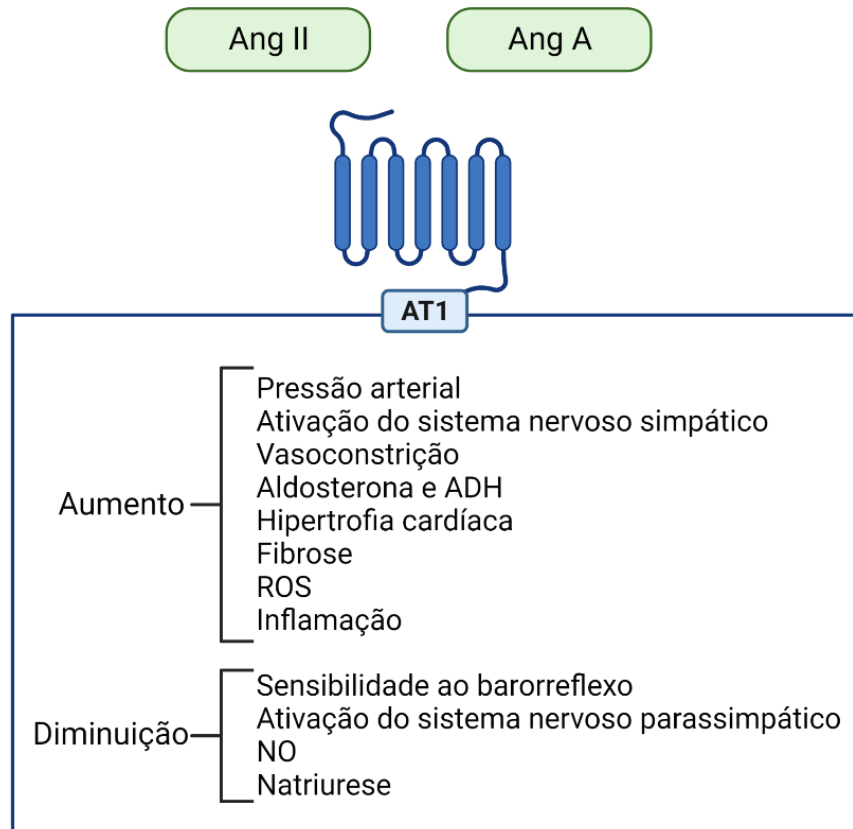


Figura 5: Alguns efeitos desencadeados pela ligação dos peptídeos do eixo pressor aos receptores AT1.

### 1.2.2. Eixo Protetor

Outras duas enzimas que podem clivar a Ang I são a neprilisina e a prolil-endopeptidase (WELCHES, et al., 1993 ; RICE et al., 2004), gerando o peptídeo Angiotensina 1-7 (Ang-(1-7)), considerado o peptídeo mais importante desse eixo. No entanto, essa não é a única forma que a Ang-(1-7) pode ser sintetizada. Em 2000, Tipnis e colaboradores descreveram pela primeira vez uma metaloprotease ancorada na membrana de 805 resíduos de aminoácidos, muito semelhante à ECA, que atuava como uma carboxipeptidase. A essa enzima deram o nome de enzima conversora de Angiotensina II (ECA 2) (TIPNIS et al., 2000 ; FRANCISCHETTI et al., 2005). A ECA 2 é considerada fundamental para a homeostase entre os eixos do SRA e a formação dos peptídeos que irão compor o eixo protetor, se tornando fundamental para a função

cardíaca, vasodilatação e equilíbrio eletrolítico. Entre suas ações, podemos citar a conversão de Angiotensina I em Angiotensina 1-9 (Ang-(1-9)) pela clivagem da leucina C-terminal (DONOGHUE et al., 2000) e a conversão direta de Ang II em Ang-(1-7) através da clivagem do resíduo de fenilalanina C-terminal. Além desses caminhos a Ang-(1-7) também é gerada pela hidrólise da Ang-(1-9) pela ECA (PAZ OCARANZA et al., 2020).

Em 1986 foi descrito um receptor acoplado à proteína G em células tumorais, e a esse receptor deram o nome de MAS (JACKSON et al., 1988). Porém, apenas em 2003 foi descoberto seu principal agonista endógeno, a Ang-(1-7) (SANTOS et al., 2003). Ao se ligar ao receptor MAS, esse age como um potente vasodilatador com efeito natriurético e anti-proliferativo, além de estimular o sistema bradicinina/óxido nítrico. Como a eficiência catalítica da ECA 2 é aproximadamente 400 vezes maior quando o substrato é a Ang II do que quando é a Ang I, isso nos leva a acreditar que este eixo atua como sistema contra-regulador do eixo pressor ECA/Ang II/AT1 (IWAI & HORIUCHI, 2009). Além disso já foi demonstrado um efeito cardioprotetor da Ang-(1-7) na ocorrência de isquemia e reperfusão, diminuindo as arritmias e a lesão tecidual (FERREIRA et al., 2001 ; Alguns estudos recentes também demonstraram que a Ang-(1-7) tem efeito antifibrótico, efeito no metabolismo lipídico, na regulação positiva da insulina, no processo de memória e aprendizado, além de parecer ter importante relação com o sistema reprodutor, principalmente em fêmeas (PASSOS-SILVA et al., 2013 ; SANTOS et al., 2017).

O componente mais recente do sistema e que também compõem o eixo protetor foi descoberto em 2013, a Alamandina (LAUTNER et al., 2013). Muito semelhante à Ang-(1-7), a Alamandina se difere por um resíduo de aminoácido na porção N-terminal e apresenta efeitos sistêmicos semelhantes à Ang-(1-7) (LAUTNER et al., 2013), porém o seu papel fisiológico ainda não foi totalmente elucidado. Até o momento, sabe-se de duas formas que esse novo peptídeo pode ser formado: por meio da hidrólise de Ang A pela ECA 2 ou através da Ang-(1-7), da mesma forma que acontece a conversão de Ang II para Ang A, ao sofrer ação de alguma descarboxilase, convertendo o resíduo de aspartato (Asp) na posição 1 da Ang-(1-7) em alanina (Ala) na Alamandina (ETELVINO et al., 2014). Esse componente age via receptor MrgD, que faz parte de família de receptores acoplados à proteína G relacionados ao MAS (LAUTNER et al., 2013). Entre seus efeitos conhecidos, podemos citar a produção de NO através da fosforilação da AMPK $\alpha$ , resultando em vasorelaxamento endotélio dependente, o que previne a hipertrofia causada por Ang II evitando a regulação positiva de Myh7 e canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L (FORRESTER et al., 2018 ; JESUS et al., 2018). Também apresenta efeito anti-hipertensivo e



anti-fibrótico em ratos tratados com um combinado de Alamandina e  $\beta$ -hidroxipropil ciclodextrina, e efeitos pressor ou depressor através da sua microinjeção no bulbo ventrolateral rostral ou na medula ventrolateral caudal de ratos, respectivamente (LAUTNER et al., 2013).

Além disso, em 2018, Oliveira e colaboradores observaram que a deleção do receptor MrgD em camundongos levava ao desenvolvimento de uma pronunciada cardiomiopatia dilatada, com diminuição considerável do débito cardíaco e hipertrofia dos cardiomiócitos (OLIVEIRA et al., 2018). Contudo, ainda não se sabe qual ou quais alterações ocorrem na estrutura cardíaca do coração de animais com essa deleção que podem ser determinantes para um prejuízo na função cardíaca descrita. A Figura 6 ilustra alguns dos principais efeitos dos peptídeos do eixo protetor.

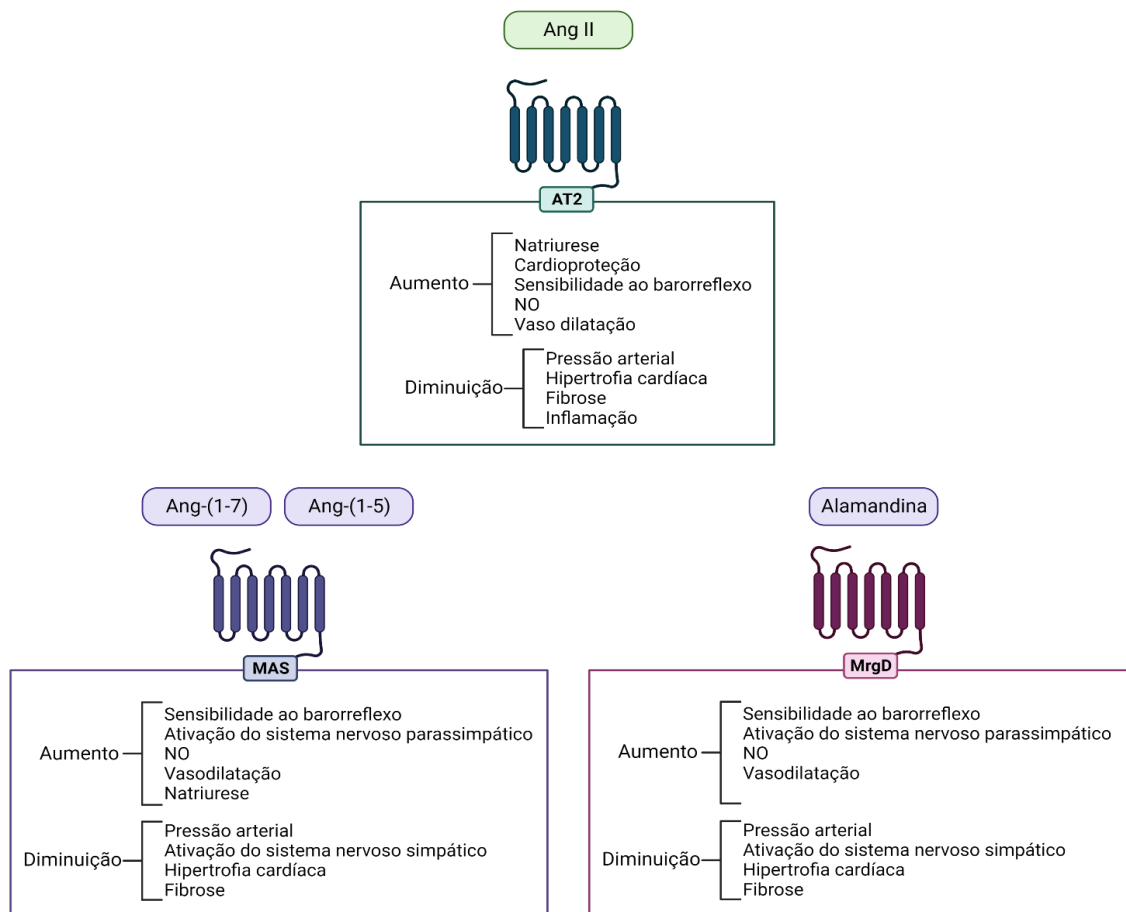


Figura 6: Alguns efeitos desencadeados pela ligação dos peptídeos do eixo protetor aos receptores AT2, MAS e MrgD.

### 1.3. Variações no sistema cardiovascular ao longo do dia

A atividade do sistema cardiovascular é modulada ao longo do dia, ocorrendo alterações na pressão arterial (PA) e na frequência cardíaca, que diminuem durante o período de repouso (HARTIKAINEN et al., 1993) e de oscilações na regulação do SRA (CHARLOUX et al., 1999; STERN et al., 1986). A PA geralmente apresenta uma variação circadiana, com um pico no início da manhã (HERMIDA et al., 2007) e esse ritmo circadiano tem uma forte influência na biologia e patologia humanas. No início da manhã, também foi observado aumento da frequência cardíaca, da atividade de coagulação e do tônus vascular (PANZA et al., 1991).

Os eventos mencionados contribuem para uma maior ocorrência de infarto agudo do miocárdio (IAM) durante determinados horários, principalmente nas primeiras horas do dia (KOLATA, G, 1986 ; COHEN et al., 1997 ; ELLIOTT et al., 2001). Além disso, estudos têm demonstrado que a desregulação dos ritmos intrínsecos do sistema cardiovascular, como o ritmo pressórico, está associada a um mau prognóstico em pacientes com doenças cardiovasculares (MINAMISAWA et al., 2015; MULLER et al., 1985), com a ocorrência de eventos cardiovasculares também apresentando variações ao longo do dia (BEHRENS et al., 1995; TAKEDA et al., 2010). Essas variações na PA são atribuídas a flutuações nas atividades do sistema nervoso autônomo, ao nível de cortisol plasmático e ao SRA. Dessa forma, a flutuação na concentração dos componentes do SRA podem ser um fator importante de suscetibilidade do organismo a acidentes vasculares.

Com o conhecimento atual, pode-se concluir que o SRA está intimamente ligado ao ritmo biológico, pois uma lesão no SCN diminui o ritmo da atividade da renina plasmática no rato (STOYNEV et al., 1980), a infusão de Ang II é capaz de modular a expressão do gene *Per2*, provocando diminuição da amplitude da expressão de mRNA da ECA e aumento da expressão da ECA 2 com consequente desaparecimento de ritmicidade (HERICHOVÁ et al., 2013), e a deleção de *BMAL1* resulta em uma menor expressão de ECA 2 (ZHUANG et al., 2021). Devido a essa estreita conexão entre o SRA e o ritmo biológico, é esperado que a concentração dos peptídeos também apresente ritmicidade. Para investigar essas prováveis flutuações, estudos foram conduzidos utilizando a técnica de radioimunoensaio para a quantificação da Ang II (KALA et al., 1973; RITTIG et al., 2006). No entanto, é importante ressaltar que a Ang II não é o único componente do sistema, e as limitações do radioimunoensaio impediam a quantificação de todos os componentes, uma vez que eles são muito semelhantes entre si. Felizmente, com o avanço de técnicas analíticas como a espectrometria de massa, agora é possível realizar quantificações do sistema de forma confiável e abrangente, superando as

limitações anteriores. Essa abordagem é capaz de proporcionar uma visão mais completa da dinâmica do SRA e sua relação com os ritmos biológicos.

#### 1.4. Métodos bioquímicos para quantificação de peptídeos

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para quantificar proteínas e peptídeos em amostras biológicas ao longo dos anos. As primeiras técnicas a surgirem foram a espectrofotometria, que se baseia na capacidade de absorção de um comprimento de onda específico pela proteína, usando corantes como o de Bradford ou o método de Lowry, e a eletroforese em gel de poliacrilamida, que separa as proteínas de acordo com seu tamanho e carga elétrica. Posteriormente, foram desenvolvidas técnicas como o radioimunoensaio, que utiliza um radioisótopo marcado para quantificar uma substância-alvo específica. O método ELISA, por sua vez, utiliza anticorpos para realizar a quantificação, possibilitando a detecção de proteínas específicas e o Western Blot, que combina a separação das proteínas por eletroforese em gel com a utilização de anticorpos para a detecção de proteínas específicas, permitindo uma quantificação relativa (CLARK et al., 1986 ; KIM et al., 2017).

Esses métodos têm sido fundamentais para a análise quantitativa de proteínas em amostras biológicas, porém, elas possuem algumas limitações. Por exemplo, quando se utiliza anticorpos para selecionar os compostos de interesse, a precisão da quantificação fica atrelada à capacidade do anticorpo de se ligar a um alvo específico. No entanto, isso depende da sua eficiência em reconhecer epítomos, sequência contendo alguns resíduos de aminoácidos de proteínas e peptídeos (SHARP et al., 1985), o que pode gerar ligações cruzadas com outras proteínas/peptídeos. As proteínas podem também apresentar pequenas modificações como o truncamento das porções N-terminal ou C-terminal, além de modificações pós-traducionais, que poderiam impedir o reconhecimento antígeno-anticorpo.

Para ter precisão na quantificação de um composto, principalmente quando este apresenta uma estrutura pequena, como é o caso dos peptídeos do SRA, é preciso levar em consideração as propriedades físico-químicas, que são determinadas pela sequência de resíduos de aminoácidos de cada molécula, resultando em diferentes graus de hidrofobicidade, massa molecular, dentre outros. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa é uma técnica analítica que utiliza tais propriedades físico-químicas para identificar e quantificar os peptídeos.

Historicamente, foi na década de 1980 que a espectrometria de massa começou a ser utilizada para a análise de peptídeos e proteínas, com o desenvolvimento de fontes de ionização mais brandas, como a ionização do tipo eletrospray o que permite uma melhor análise dos componentes (GRIFFITHS et al., 2008).

Uma forma popular de se utilizar a cromatografia líquida (LC, sigla em inglês) acoplada à espectrometria de massa (MS, sigla em inglês) para quantificar peptídeos de interesse é através do modo direcionado (“target”), que seleciona os alvos de interesse e os separa levando em consideração propriedades físico-químicas, como massa molecular e hidrofobicidade, e depois realiza a quantificação, em um método denominado “multiple reaction monitoring” (MRM) “mass spectrometry” (MS), ou MRM-MS. Os principais equipamentos utilizados para realizar essas análises são espectrômetros de massa com três analisadores de massa iguais, como o quadrupolo (Q), denominados triplo quadrupolo MS ou QQQ MS. Neste tipo de MS, os íons dos peptídeos são filtrados no primeiro quadrupolo (Q1), que se refere à massa molecular do peptídeo de interesse, posteriormente, no Q2, os íons peptídeos são fragmentados através da colisão com um gás inerte, geralmente o argônio, em uma técnica denominada dissociação induzida por colisão (CID, sigla em inglês), finalmente, os íons gerados são analisados no terceiro quadrupolo (Q3). Por meio da técnica de LC-MRM MS, é possível identificar e quantificar os diferentes peptídeos do SRA de forma seletiva e quantificá-los, para aumentar o conhecimento sobre o sistema, adicionando o conhecimento dos peptídeos que ainda não foram quantificados.

Sendo assim, neste projeto foi utilizada a técnica de LC-MRM MS para quantificar, de forma altamente seletiva e específica, os peptídeos do SRA ao longo do dia.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial ritmo biológico de produção dos peptídeos plasmáticos do SRA Angiotensina I, Angiotensina II, Angiotensina-(1-7), Angiotensina-(1-5), Angiotensina A e Alamandina em camundongos C57B16/J durante o ciclo claro/escuro.

### 2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um método analítico para a quantificação dos peptídeos de interesse;
- Aprimorar o protocolo para extração do conteúdo peptídico de amostras de sangue;
- Quantificar a concentração plasmática dos peptídeos de interesse em 4 horários estabelecidos do dia (ZTs);
- Avaliar a existência em potencial de flutuações temporais na concentração circulante dos diferentes peptídeos ao longo do dia;

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Animais

Foram utilizados animais C57Bl6/J machos de 12 semanas de idade. Essa linhagem foi escolhida pois não produzem melatonina (KASAHARA et al., 2010). Sendo assim, minimizamos a possível interferência do hormônio melatonina na oscilação dos peptídeos. Os animais eram provenientes do Centro de Bioterismo do ICB/UFMG (CEBIO) e foram mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas-2 (BICBIO-2) até atingirem a idade desejada. Todos os animais foram mantidos sob dieta normal com livre acesso a água e comida, em um ambiente climatizado a 23°C com fotoperíodo de claro/escuro de 12 horas cada. Todos os procedimentos aqui descritos respeitaram as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo aprovado de número 253/2022.

#### 3.2. Reagentes Utilizados

Acetonitrila (sigma-aldrich, USA); Metanol (sigma-aldrich, USA), Ácido Fórmico (Merck, Alemanha), Pepstatin A (sigma-aldrich, USA), 1,10-fenantrolina (sigma-aldrich, USA), Peroxymonophosphate (sigma-aldrich, USA), Fluoreto de fenilmetilsulfonil (sigma-aldrich, USA), EDTA (Labsynth, Brasil), os peptídeos Ang I, Ang II, Ang A, Ang-(1-7), Ang-(1-5) e Alamandina foram gentilmente fornecidos pelo professor Robson Augusto Souza dos Santos.

#### 3.3. Coleta do sangue

Durante o experimento, os animais foram eutanasiados por decapitação em quatro períodos diferentes do dia (ZTs): 7:00 horas (ZT00) - quando as luzes do biotério são acesas e se inicia o "período de inatividade", 13:00 horas (ZT06) - correspondente à metade do período de inatividade, 19:00 horas (ZT12) - quando as luzes são apagadas e se inicia o "período de atividade", e 1:00 hora (ZT18) - correspondente à metade do período de atividade dos camundongos. Dessa forma, as coletas foram feitas com uma diferença de 6 horas entre cada período.

Para garantir que o fotoperíodo dos animais não fosse alterado durante as coletas noturnas (19:00 horas e 1:00 hora), eles não foram expostos à luz branca, apenas à luz vermelha ( $\lambda$  620-640nm) de baixa intensidade, que não interfere no relógio biológico (THAPAN et al., 2001 ; HANIFIN et al., 2006). O sangue (400  $\mu$ L) foi coletado em microtubos do tipo eppendorf “low-binding” de 1,5 mL contendo 140  $\mu$ L do coquetel de inibidores de protease juntamente com agente anticoagulante (POOH 1 mM; 1,10-Fenantrolina 30 mM; PMSF 1 mM; EDTA 7,5%; Pepstatin A 1 mM). Em seguida, o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 4°C e 2700 g. O plasma foi separado, coletado e acondicionado em ultrafreezer, na temperatura de -80°C.

#### 3.4. Extração de peptídeos plasmáticos

Para processar o plasma, foram utilizadas colunas de extração sólida C18 (Sep-Pak, Waters, EUA). Essas colunas possuem uma fase estacionária à base de sílica modificada quimicamente com cadeias longas de hidrocarbonetos contendo 18 átomos de carbono cada, o que confere à coluna um caráter hidrofóbico, as tornando ideais para separação de peptídeos.

Foi alocada uma coluna para cada amostra, na qual a resina C18 foi devidamente limpa e ativada através de duas lavagens consecutivas com 10 mL de acetonitrila 99% e 0,1% de ácido fórmico (AF), seguidas por 10 mL de uma solução de 0,1% de AF em água. Em seguida, adicionou-se à coluna uma solução contendo 3 mL de BSA a 0,1% e 0,1% de AF em água, que foi primeiramente lavada com 10 mL de acetonitrila 10% e, posteriormente, com 3 mL de 0,1% de AF em água.

Após essa etapa, a amostra de plasma (aproximadamente 300  $\mu$ L) foi adicionada à coluna e lavada duas vezes com 10 mL de AF 0,1% e 3 mL de acetonitrila 10%. Essa menor concentração de solvente orgânico foi utilizada para descartar os componentes presentes que possuíam menor hidrofobicidade em relação aos peptídeos de interesse.

Em sequência, os peptídeos foram eluídos da coluna para tubos de polipropileno de baixa ligação (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) utilizando uma solução composta por 40% de acetonitrila e AF 0,1%. Por fim, o solvente foi evaporado em um SpeedVac (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a uma temperatura constante de 30°C, e os tubos foram armazenados em freezer a -20°C.

### 3.5. Análise de LC-MRM

As amostras foram ressuspensas em 50 uL de AF 0,1% e analisadas no sistema ACQUITY I-Class UPLC (Waters, EUA) acoplado via ionização por electrospray (ESI) à espectrometria de massa em tandem ( LC-ESI-MS/MS Xevo TQ-S, Waters, EUA). A separação cromatográfica foi feita em uma coluna C18 (ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm × 100 mm, Waters, Milford, MA, EUA).

O espectrômetro de massa foi operado no modo MRM. Essa técnica utiliza os três analisadores de massa do tipo triplo quadrupolo MS para primeiro analisar e selecionar o íon peptídico correspondente ao composto de interesse no primeiro quadrupolo (Q1), com fragmentação subsequente desse íon alvo para produzir uma variedade de íons filhos no segundo quadrupolo (Q2). Um ou mais íons-filhos podem ser selecionados e analisados para fins de quantificação no terceiro quadrupolo (Q3). Somente os compostos que atendem a ambos os critérios (íon parental específico e íons filhos específicos, também denominados transições) são isolados, analisados e detectados no espectrômetro de massa. Ao descartar todos os outros íons presentes, o experimento ganha sensibilidade, mantendo a sua seletividade e especificidade.

#### 3.5.1 Otimização do método MRM

Os peptídeos do SRA que foram selecionados para quantificação nas amostras biológicas foram:

- Ang I [H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH]
- Ang II [H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH]
- Ang A [H-Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH]
- Ang-(1-7) [H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-OH]
- Alamandina [H-Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-OH]
- Ang-(1-5) [H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-OH]

Para padronizar o método de quantificação de cada peptídeo, ou seja, determinar quais transições seriam usadas, cada composto foi infundido diretamente no espectrômetro de massa, na concentração de 1 nanograma por mililitro (1 ng/mL) em solução de AF 0,1%. Foram avaliadas quais relações massa/carga (m/z) dos peptídeos de interesse apresentavam uma maior



intensidade. Após identificar os íons de interesse, foram realizadas uma série de fragmentações para encontrar os chamados "íons filhos", que também seriam identificados com maior intensidade pelo equipamento, foi determinada a energia de colisão (CID) e a voltagem do cone. Dessa forma, foi possível determinar as melhores transições, ou seja, os melhores íons do peptídeo (MS) e os melhores íons filhos (MS/MS), quando analisados no MS.

### 3.5.2 Parâmetros Utilizados

Cada amostra foi ressuspensa em 50 µl de ácido fórmico 0,1% (fator de concentração da amostra = 8 vezes). Em seguida, 30 µl foram utilizados para as análises, o restante foi acondicionado a 4°C. Cada cromatografia durou 5,5 min. Foi utilizada para a separação cromatográfica uma coluna de C18 (ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 100 mm, Waters, Milford, MA, USA) e dois solventes, o solvente A consistia em AF 0,1% em H<sub>2</sub>O e solvente B em AF 0,1% em acetonitrila. O gradiente cromatográfico está especificado na tabela 1. Com relação à análise de MS, os principais parâmetros foram: (i) capilar = 3,5 kV; (ii) cone = 20 V; (iii) temperatura do gás de dessolvatação (hidrogênio) = 550°C. A energia de colisão (gás argônio) foi ajustada para cada peptídeo. Na tabela 2 estão especificados os parâmetros para análise de cada transição monitorada pelo MS no modo MRM.

Tempo (min)	Fluxo (mL/Min)	% solvente A	% solvente B	Curva
0,00	0,3	97	3	Inicial
3,50	0,3	60	40	6
3,51	0,3	1	99	6
4,50	0,3	1	99	6
4,51	0,3	97	3	6
5,50	0,3	97	3	6

Tabela 1: Gradiente cromatográfico utilizado

Peptídeo	Íon Parental (m/z)	Transição (m/z)	Energia de Colisão (V)	Dwell (s)	Tempo de retenção (min)
Angiotensina I	422,2	422,2 - 647,4	15	0,015	2,4 - 3,35
Angiotensina II	349,7	349,7 - 255,2	19	0,035	2,35 - 3,2
Angiotensina II	349,7	349,7 - 371,2	9	0,035	2,35 - 3,2
Angiotensina A	335,1	335,1 - 231,8	7	0,043	2,4 - 3,8
Angiotensina A	335,1	335,1 - 513,2	8	0,043	2,4 - 3,8
Angiotensina-(1-7)	300,8	300,8 - 110,1	23	0,034	1,6 - 2,5
Angiotensina-(1-7)	300,8	300,8 - 371,2	7	0,034	1,6 - 2,5
Angiotensina-(1-5)	333,1	333,1 - 371,2	10	0,010	2,2 - 3
Angiotensina-(1-5)	333,1	333,1 - 534,3	9	0,010	2,2 - 3
Alamandina	286,1	286,1 - 136,1	15	0,034	1,6 - 2,8
Alamandina	286,1	286,1 - 327,2	8	0,040	1,6 - 2,8

Tabela 2: parâmetros dos peptídeos analisados no equipamento XEVO-TQS.

### 3.6. Análise estatística

Os experimentos foram realizados utilizando três animais para o ZT18 (n = 3) e cinco animais para os demais ZTs (n = 5), com exceção do peptídeo Ang-(1-5), para o qual foram utilizados

quatro animais no ZT00 ( $n = 4$ ). Inicialmente, foram feitos testes de ANOVA para avaliar as diferenças na concentração plasmática dos peptídeos, utilizando o software GraphPad Prism v.7.0. Em seguida, foram realizados os testes de ritmicidade através dos algoritmos JTK\_Cycle e RAIN, utilizando o NiteCap, fornecido pela Escola de Medicina Perelman, Universidade da Pensilvânia. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado para mostrar significância estatística entre as médias dos grupos em todas as análises.

Todos os testes são utilizados para avaliar dados não paramétricos. O algoritmo JTK\_Cycle avalia oscilações monotônicas e é capaz de prever a fase, amplitude e período dos ciclos. Esse teste organiza as medianas de cada ZT em ordem crescente e as compara, a hipótese nula é considerada quando os valores de dois pontos consecutivos são idênticos, e é válida quando as medianas consecutivas são todas diferentes entre si (HUGHES et al., 2010). Devido a essa característica, o algoritmo JTK\_Cycle só considera rítmicos os casos em que as ondas de oscilação são assimétricas. Para superar essa limitação, foi utilizado o teste RAIN, que pode detectar ritmos de qualquer período e faz poucas suposições sobre as formas de onda analisando as partes ascendentes e descendentes da curva separadamente (THABEN et al., 2014).

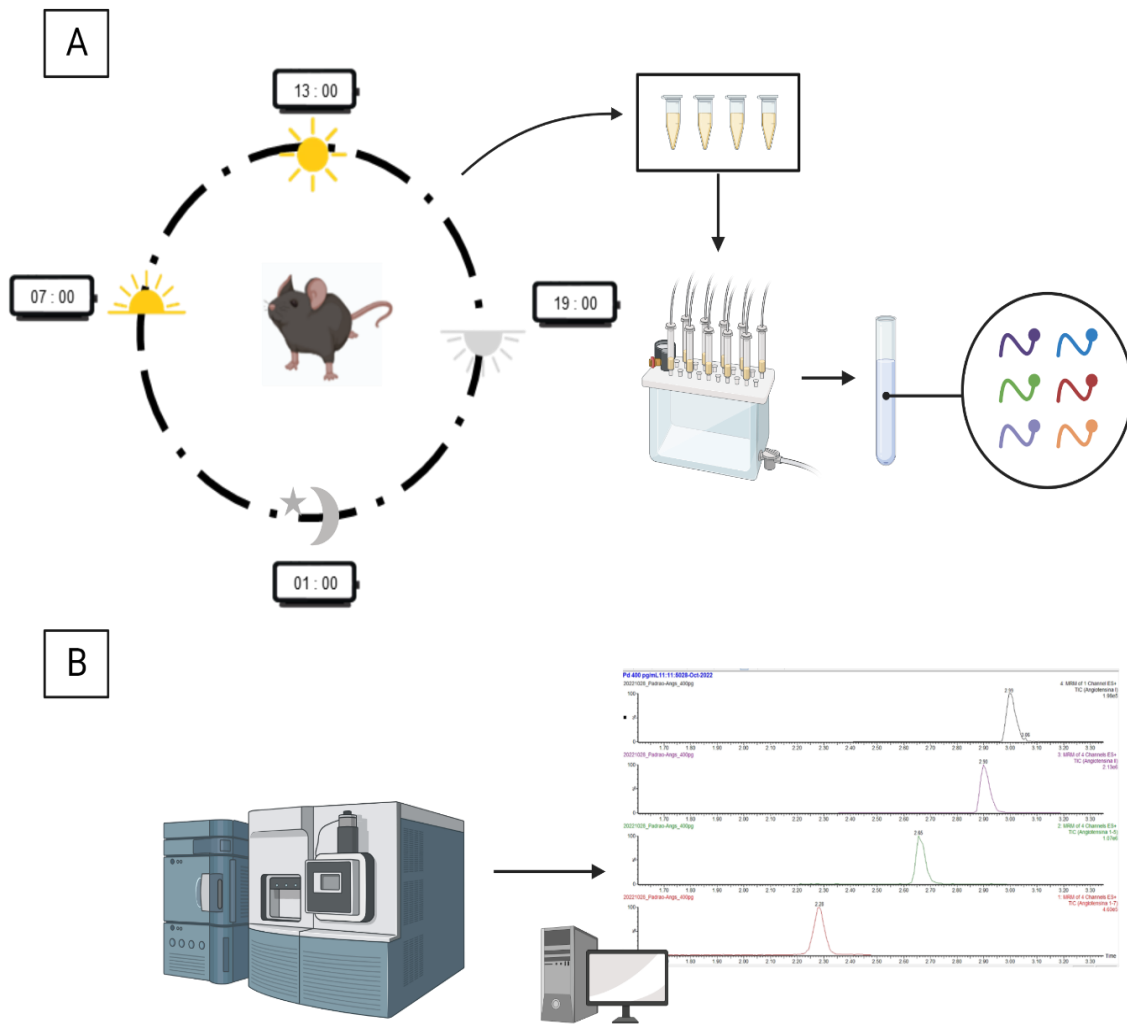


Figura 7: Esquema do método utilizado para a quantificação dos componentes do SRA. a) Coleta do plasma em quatro diferentes ZTs seguido de extração e eluição dos peptídeos de interesse b) Obtenção dos espectros correspondentes aos peptídeos e quantificação absoluta no espectrômetro de massa XEVO-TQS.

## 4. Resultados

### 4.1. Diferença na concentração plasmática

Visando determinar o potencial ritmo biológico dos peptídeos do SRA, foram realizadas análises quantitativas dos peptídeos plasmáticos. A Ang I, Ang II, Ang A, Ang-(1-7), Ang-(1-5) e Alamandina foram quantificadas utilizando a técnica de LC-MRM em quatro diferentes períodos do dia (ZT00, ZT06, ZT12 e ZT18), como ilustrado na Figura 7. Esses períodos foram escolhidos para representar momentos-chave do ciclo circadiano, permitindo uma investigação dos possíveis ritmos desses peptídeos no organismo. A LC-MRM foi empregada devido à sua alta sensibilidade e capacidade de análise precisa dos diferentes peptídeos do SRA.

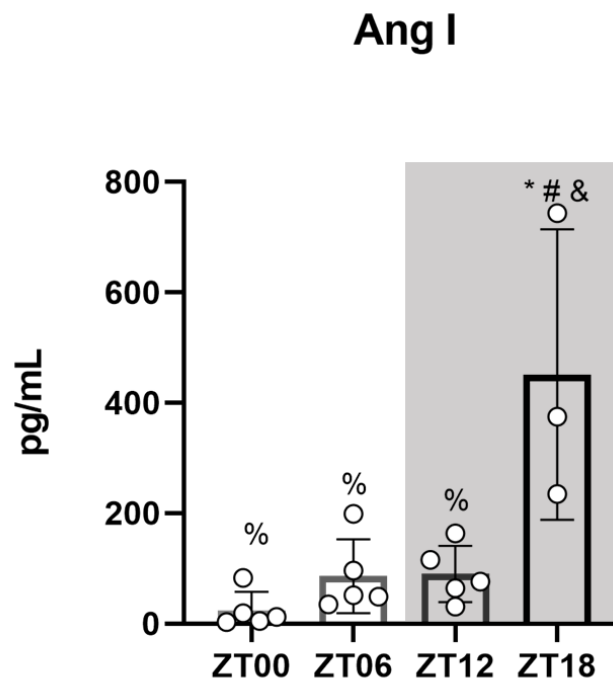


Figura 8: Concentração plasmática do peptídeo Ang I nos quatro diferentes ZTs avaliados (ZT00 n = 5; ZT06 n = 5; ZT12 n = 5; ZT18 n = 3). Os dados estão expressos utilizando a média dos valores e o desvio padrão ( $\pm$  DP). Foi realizado o teste ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. \* Concentração diferente do ZT00,  $p < 0,05$ . # Concentração diferente do ZT06,  $p < 0,05$ . & Concentração diferente do ZT12,  $p < 0,05$ . % Concentração diferente do ZT18,  $p < 0,05$

Como demonstrado na Figura 8, o decapeptídeo Ang I, que inicia a cascata de formação dos peptídeos do SRA, apresentou um pico de produção no ZT18 ( $\mu = 2$  pg/mL  $\pm 0,95$ ). Por outro

lado, a concentração de Ang I nos outros três ZTs analisados não apresentou diferença pronunciadas nas concentrações entre si (ZT00  $\mu = 0,11$  pg/mL  $\pm 0,13$ , ZT06  $\mu = 0,38$  pg/mL  $\pm 0,26$ , ZT12  $\mu = 0,4$  pg/mL  $\pm 0,2$ ).

#### 4.1.1. Eixo Canônico / Pressor

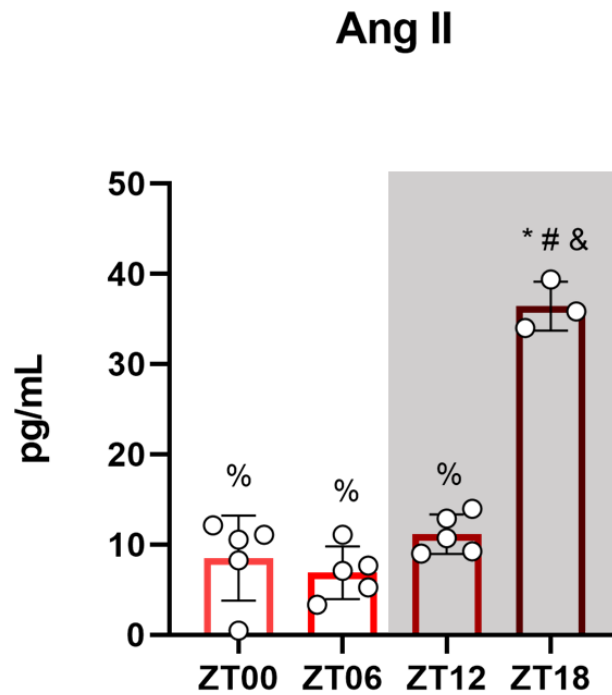


Figura 9: Concentrações plasmáticas do peptídeo Ang II nos quatro diferentes ZTs avaliados (ZT00 n = 5; ZT06 n = 5; ZT12 n = 5; ZT18 n = 3). Os dados estão expressos utilizando a média dos valores e o desvio padrão ( $\pm$  DP). Foi realizado o teste ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. \* Concentração diferente do ZT00,  $p < 0,05$ . # Concentração diferente do ZT06,  $p < 0,05$ . & Concentração diferente do ZT12,  $p < 0,05$ . % Concentração diferente do ZT18,  $p < 0,05$

Assim como a Ang I, o peptídeo Ang II apresentou concentrações plasmáticas relativamente estáveis ao longo do dia (ZT00  $\mu = 0,011$  pg/mL  $\pm 0,005$ , ZT06  $\mu = 0,009$  pg/mL  $\pm 0,003$ , ZT12  $\mu = 0,014$  pg/mL  $\pm 0,002$ ), com um pico na sua produção no ZT18 ( $\mu = 0,048$  pg/mL  $\pm 0,002$ ), que corresponde à metade do período de atividade dos animais (Figura 9).

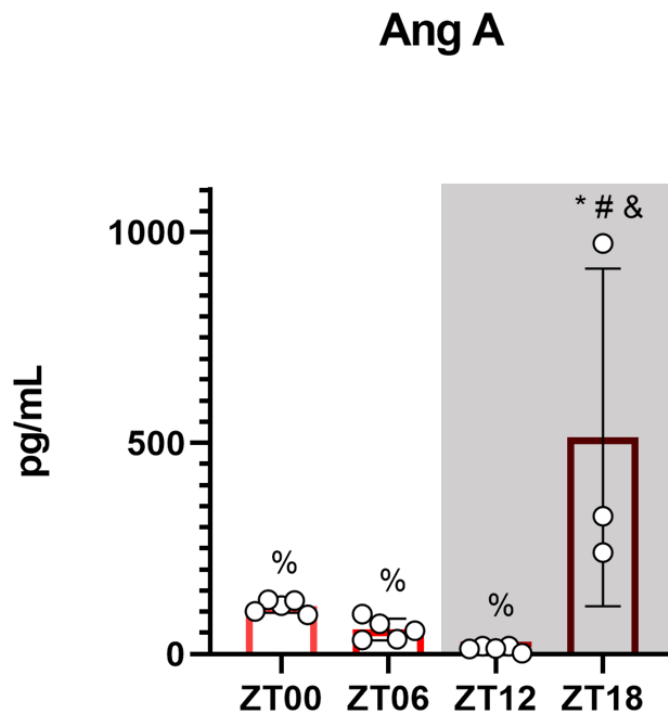


Figura 10: Concentrações plasmáticas do peptídeo Ang A nos quatro diferentes ZTs avaliados (ZT00 n = 5; ZT06 n = 5; ZT12 n = 5; ZT18 n = 3). Os dados estão expressos utilizando a média dos valores e o desvio padrão ( $\pm$  DP). Foi realizado o teste ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. \* Concentração diferente do ZT00,  $p < 0,05$ . # Concentração diferente do ZT06,  $p < 0,05$ . & Concentração diferente do ZT12,  $p < 0,05$ . % Concentração diferente do ZT18,  $p < 0,05$

Assim como os peptídeos Ang I e Ang II, a Ang A manteve concentrações plasmáticas baixas ao longo do dia (ZT00  $\mu = 0,01$  pg/mL  $\pm 0,001$ , ZT06  $\mu = 0,005$  pg/mL  $\pm 0,002$ , ZT12  $\mu = 0,001$  pg/mL  $\pm 0,0005$ ), alcançando o seu pico de produção no ZT18 ( $\mu = 0,047$  pg/mL  $\pm 0,03$ ), quando foi observada uma diferença estatisticamente significativa no ZT18 (Figura 10).

## 4.1.2. Eixo Não Canônico / Protetor

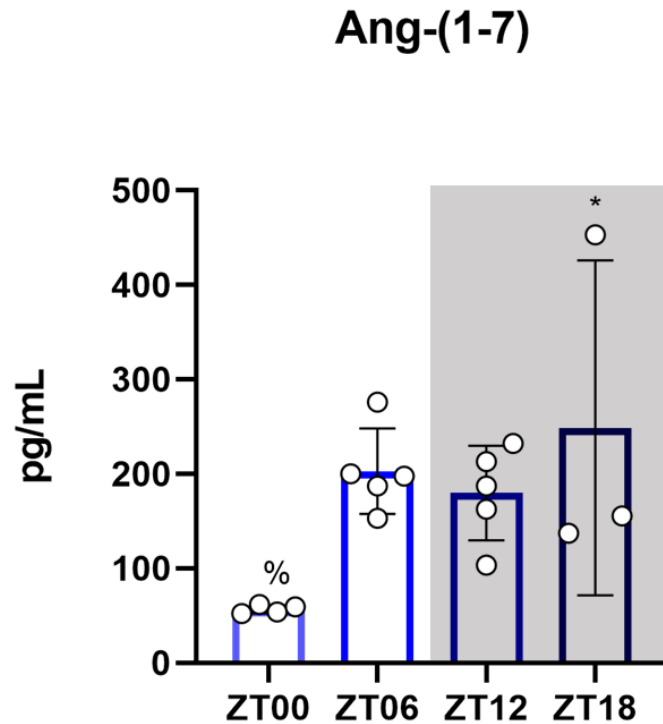


Figura 11: Concentrações plasmáticas do peptídeo Ang-(1-7) nos quatro diferentes ZTs avaliados (ZT00 n = 5; ZT06 n = 5; ZT12 n = 5; ZT18 n = 3). Os dados estão expressos utilizando a média dos valores e o desvio padrão ( $\pm$  DP). Foi realizado o teste ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. \* Concentração diferente do ZT00,  $p < 0,05$ . # Concentração diferente do ZT06,  $p < 0,05$ . & Concentração diferente do ZT12,  $p < 0,05$ . % Concentração diferente do ZT18,  $p < 0,05$

Assim como demonstrado anteriormente, para os peptídeos do eixo canônico do SRA, o peptídeo Ang-(1-7) (Figura 11) apresentou um pico de produção na segunda metade do período de atividade dos animais (ZT18  $\mu = 0,125$  pg/mL  $\pm 0,07$ ). A Ang-(1-7) foi o componente que demonstrou uma concentração plasmática mais baixa no início do período de inatividade (ZT00,  $\mu = 0,02$  pg/mL  $\pm 0,001$ ), com aumento gradual até o ZT06 ( $\mu = 0,1$  pg/mL  $\pm 0,02$ ) e se mantendo mais elevada no ZT12 ( $\mu = 0,09$  pg/mL  $\pm 0,022$ ).



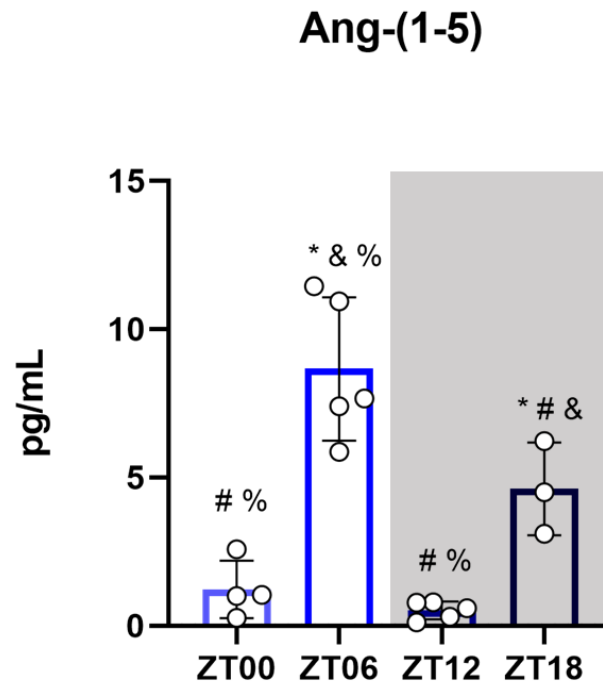


Figura 12: Concentrações plasmáticas do peptídeo Ang-(1-5) nos quatro diferentes ZTs avaliados (ZT00 n = 4; ZT06 n = 5; ZT12 n = 5; ZT18 n = 3). Os dados estão expressos utilizando a média dos valores e o desvio padrão ( $\pm$  DP). Foi realizado o teste ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. \* Concentração diferente do ZT00,  $p < 0,05$ . # Concentração diferente do ZT06,  $p < 0,05$ . & Concentração diferente do ZT12,  $p < 0,05$ . % Concentração diferente do ZT18,  $p < 0,05$

O peptídeo Ang-(1-5) (Figura 12) apresentou uma oscilação no seu perfil de concentração plasmática, com baixa abundância plasmática no início da fase clara (ZT00  $\mu = 0,001$  pg/mL  $\pm 0,001$ ), atingindo seu ápice seis horas depois (ZT06,  $\mu = 0,01$  pg/mL  $\pm 0,003$ ), com redução significativa no início da fase escura (ZT12,  $\mu = 0,0007$  pg/mL  $\pm 0,0003$ ) e aumentando, novamente, no ZT18 ( $\mu = 0,006$  pg/mL  $\pm 0,001$ ).

## Alamandina

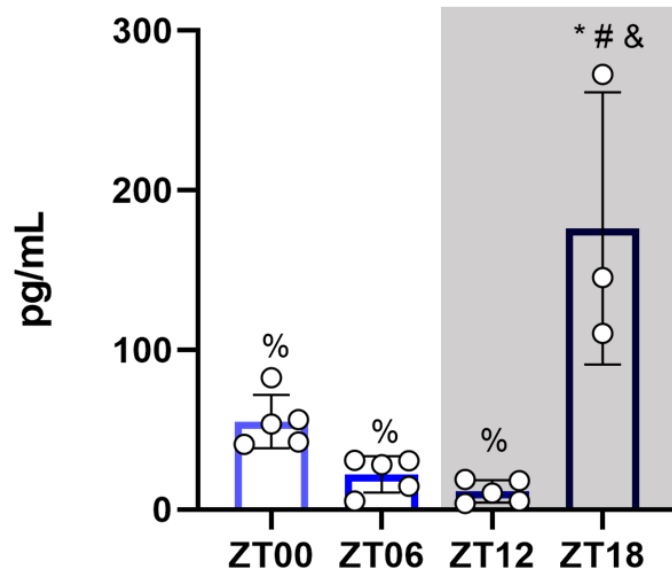


Figura 13: Concentrações plasmáticas do peptídeo Alamandina nos quatro diferentes ZTs avaliados (ZT00 n = 5; ZT06 n = 5; ZT12 n = 5; ZT18 n = 3). Os dados estão expressos utilizando a média dos valores e o desvio padrão ( $\pm$  DP). Foi realizado o teste ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. \* Concentração diferente do ZT00,  $p < 0,05$ . # Concentração diferente do ZT06,  $p < 0,05$ . & Concentração diferente do ZT12,  $p < 0,05$ . % Concentração diferente do ZT18,  $p < 0,05$

O perfil de concentração plasmática da Alamandina apresentou uma tendência de variação semelhante aos seus precursores, com aumentos de concentração no início do ciclo de inatividade (ZT00,  $\mu = 0,007$  pg/mL  $\pm$  0,001), se mantendo baixa durante todo o dia, mas aumentando consideravelmente no meio do ciclo de atividade (ZT18). A Figura 13 representa a concentração plasmática da Alamandina (ZT06  $\mu = 0,002$  pg/mL  $\pm$  0,001; ZT12  $\mu = 0,001$  pg/mL  $\pm$  0,0008; ZT18  $\mu = 0,023$  pg/mL  $\pm$  0,009).

### 4.2. Testes de ritmicidade

Através dos testes de análise de variância (ANOVA), foi possível determinar que realmente há diferenças na concentração plasmática de todos os peptídeos avaliados ao longo do dia. Porém, esse teste estatístico não avalia a existência de ritmos biológicos. Sendo assim, foram utilizados os algoritmos JTK\_Cycle e RAIN para confirmar ou refutar se a hipótese de que os peptídeos do SRA apresentavam um comportamento rítmico.

No teste JTK\_Cycle (Figuras 14 a 19), os peptídeos que apresentaram um perfil rítmico na concentração plasmática foram: Ang II, Ang-(1-7), Ang-(1-5) e Alamandina. Já no teste RAIN, os peptídeos com variação significativa foram Ang I, Ang II, Ang-(1-7) e Ang-(1-5). Ambos os testes consideraram uma variação significativa quando  $p < 0,05$ . Peptídeos que passaram em pelo menos um dos testes foram considerados como tendo um padrão rítmico. É importante destacar que a Ang A não apresentou valor significativo em nenhum dos testes. Portanto, este foi o único peptídeo avaliado que não demonstrou oscilação temporal.

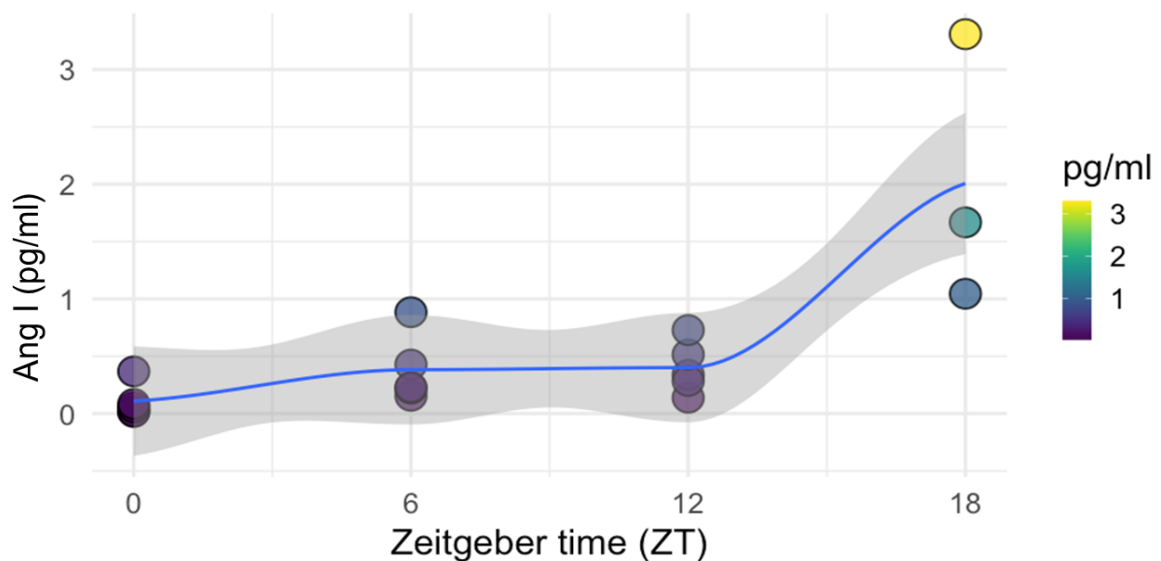


Figura 14: Oscilação do peptídeo Angiotensina I, JTK\_Cycle,  $p > 0,05$ ; RAIN,  $p = 0,0005$ ; Acrofase (pico) = ZT18 (ZT00,  $n = 5$ ; ZT06,  $n = 5$ ; ZT12,  $n = 5$ ; ZT18,  $n = 3$ ).

## 4.2.1. Eixo Canônico / Pressor

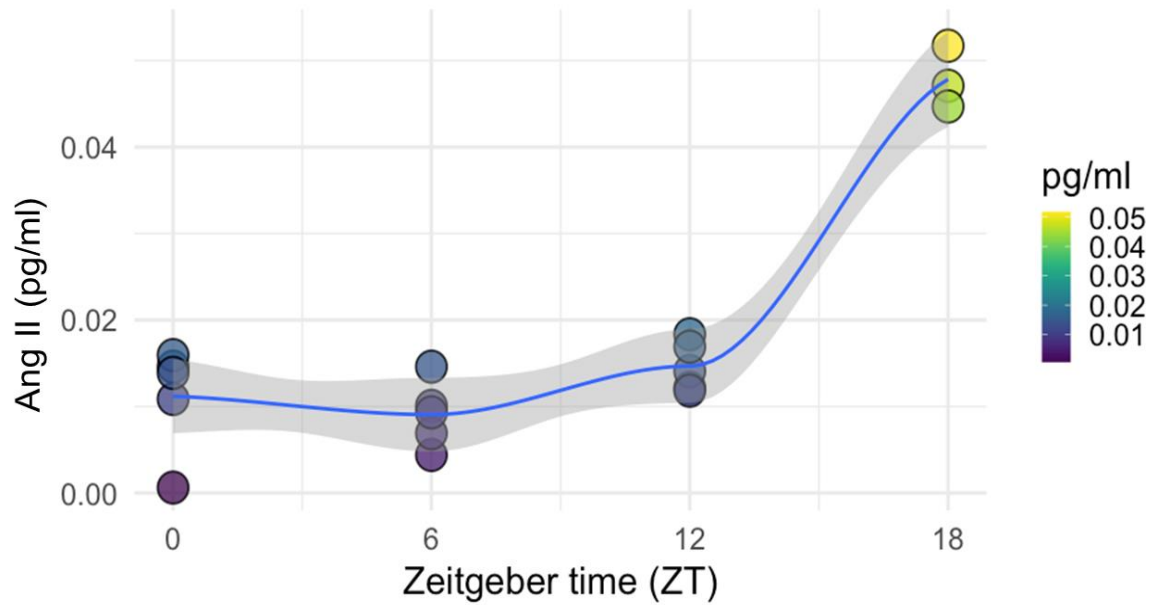


Figura 15: Oscilação do peptídeo Angiotensina II, JTK\_Cycle,  $p = 0,004$ ; RAIN,  $p = 0,0002$ ; Acrofase = ZT18; Período aproximado de oscilação = 24h (ritmo circadiano). ZT00,  $n = 5$ ; ZT06,  $n = 5$ ; ZT12,  $n = 5$ ; ZT18  $n = 3$ .

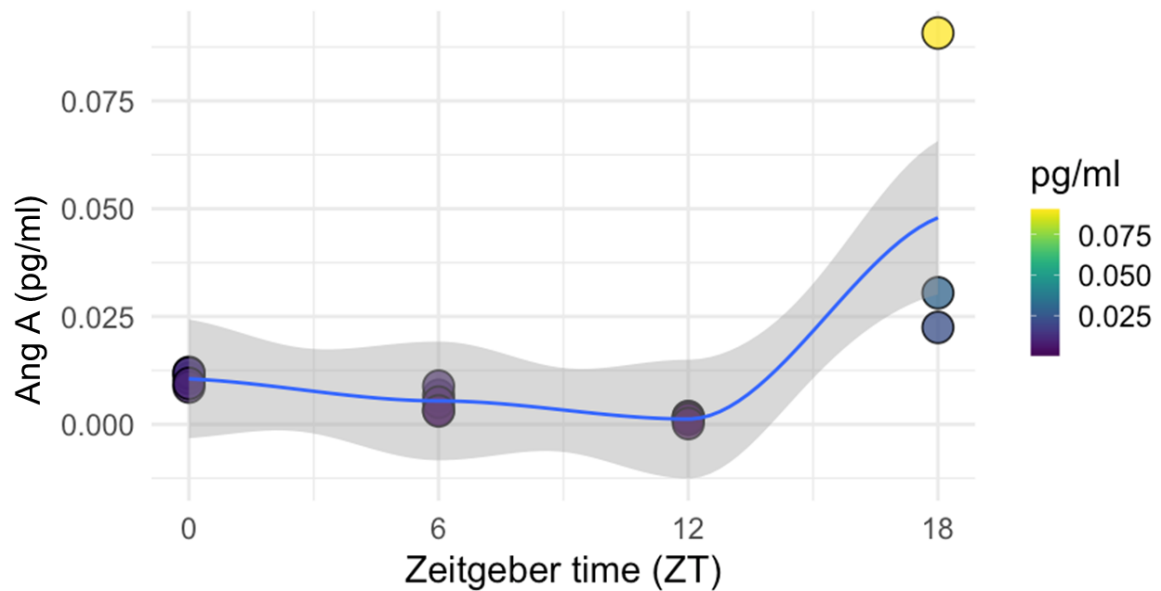


Figura 16: Oscilação do peptídeo Angiotensina A, JTK\_Cycle  $p > 0,05$ ; RAIN  $p > 0,05$ ; Acrofase = ZT18; Período aproximado de oscilação = 18h (ritmo ultradiano). ZT00,  $n = 5$ ; ZT06,  $n = 5$ ; ZT12,  $n = 5$ ; ZT18,  $n = 3$ .

## 4.2.2. Eixo Não Canônico / Protetor

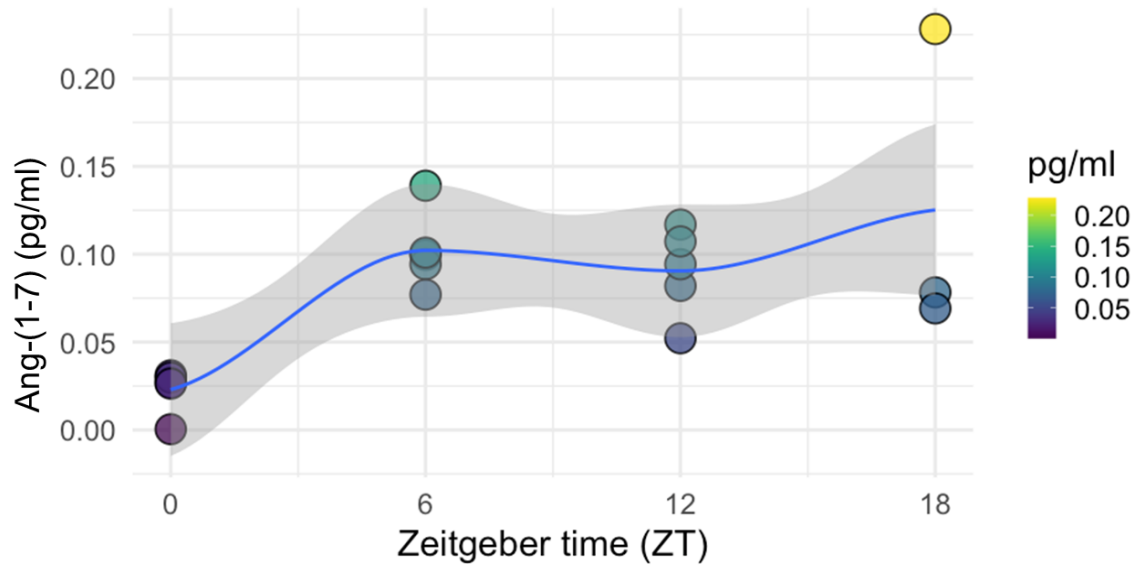


Figura 17: Oscilação do peptídeo Angiotensina-(1-7), JTK\_Cycle  $p = 0,01$ ; RAIN  $p = 0,007$ ; Acrofase = ZT18; Período aproximado de oscilação = 18h (ritmo ultradiano). ZT00,  $n = 5$ ; ZT06,  $n = 5$ ; ZT12,  $n = 5$ ; ZT18,  $n = 3$ .

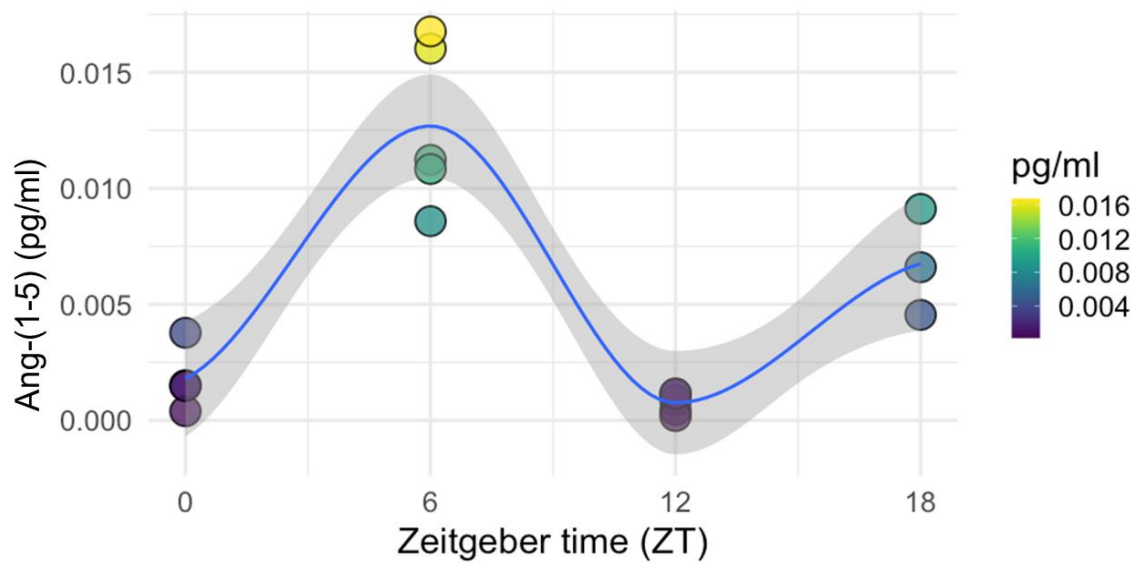


Figura 18: Oscilação do peptídeo Angiotensina-(1-5), JTK\_Cycle  $p = 0,00001$ ; RAIN  $p = 0,005$  Acrofase = ZT06; Período aproximado de oscilação = 18h (ritmo ultradiano). ZT00,  $n = 4$ ; ZT06,  $n = 5$ ; ZT12,  $n = 5$ ; ZT18,  $n = 3$ .

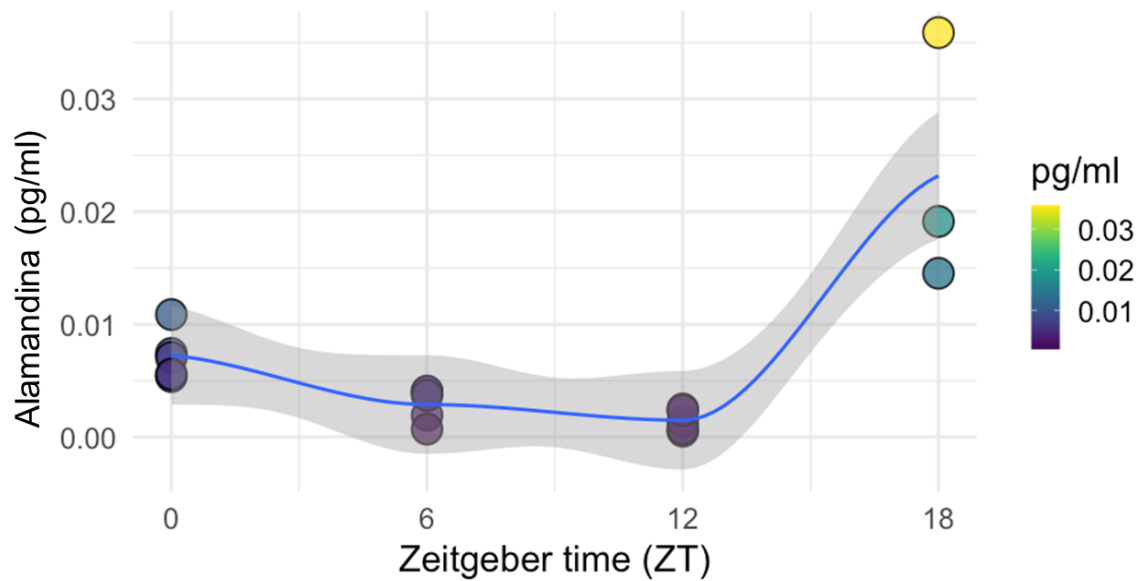


Figura 19: Oscilação do peptídeo Alamandina, JTK\_Cycle  $p = 0,00008$ ; RAIN  $p > 0,05$ ; Acrofase no ZT18; Período aproximado de oscilação = 18h (ZT00  $n = 5$ ; ZT06  $n = 5$ ; ZT12  $n = 5$ ; ZT18  $n = 3$ ).

#### 4.3 Taxa de conversão relativa entre os peptídeos avaliados em diferentes ZTs

Este trabalho visou quantificar a concentração plasmática de alguns peptídeos do SRA ao longo do dia. Contudo, visando estabelecer uma relação indireta da atividade das enzimas formadoras de tais peptídeos (Figura 4), foi realizada a razão entre os produtos e seus substratos, utilizando as concentrações absolutas de cada peptídeo e em cada ZT (Figura 20). A conversão da Ang I para Ang II, realizada pela ECA, nos forneceu uma ideia da atividade catalítica desta enzima, que apresentou a sua acrofase no ZT00 (Figura 20A). A conversão de Ang II para Ang-(1-7) nos fornece uma ideia da atividade da ECA 2, que apresentou o seu pico de atividade na metade do período claro (Figura 20B).

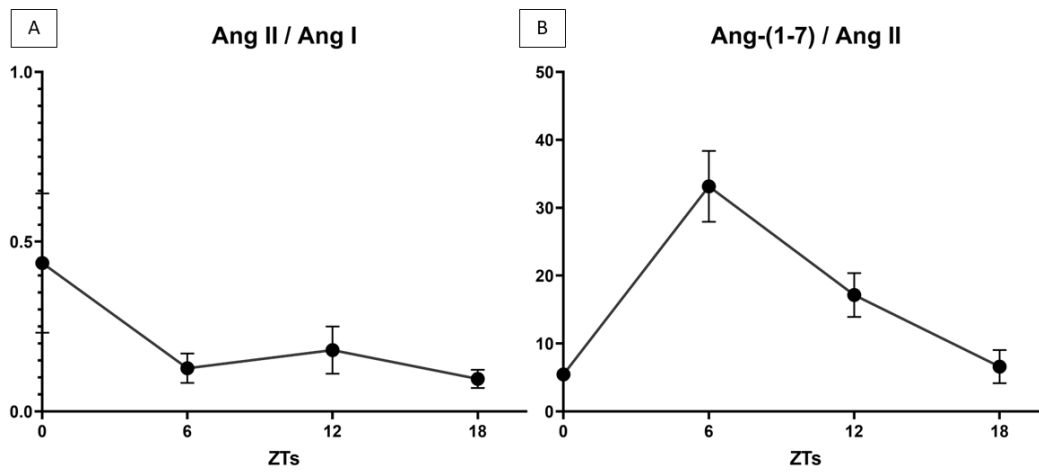


Figura 20: Relação entre as concentrações dos peptídeos nos diferentes ZTs. (a) Relação entre Ang I e Ang II. Oscilação: JTK\_Cycle  $p > 0,05$  ; RAIN  $p > 0,05$  ; Acrofase no ZT00. (b) Relação entre Ang II e Ang-(1-7). Oscilação: JTK\_Cycle  $p > 0,05$  ; RAIN  $p > 0,05$  ; Acrofase no ZT06.

## 5. Discussão

O SRA desempenha um papel crucial na regulação de vários processos fisiológicos em todo o corpo, devido a essa característica, é esperado que, para manter a homeostase à medida que as necessidades fisiológicas mudam ao longo do dia, os peptídeos desse sistema apresentem oscilações rítmicas. Embora a glicoproteína Angiotensinogênio, precursor dos peptídeos do SRA, não apresente ritmo biológico em humanos (NISHIJIMA et al., 2014), estudos em camundongos mostraram variações na sua concentração plasmática e nos níveis de expressão de mRNA no período de 24h. Estudos indicam uma menor expressão de mRNA do Angiotensinogênio no ZT00, aumentando gradativamente ao longo do dia, com sua acrofase (pico de produção) ocorrendo oito horas após o início da fase clara, ou seja, no ZT08 (NAITO et al., 2002 ; TOKONAMI et al., 2014).

A baixa abundância de Angiotensinogênio no início da fase clara, conforme relatado por Tokonami et al. e Naito et al., está de acordo com os resultados aqui reportados, que indicam uma baixa concentração plasmática de todos os peptídeos do sistema quantificados nesse período. Além disso, o Angiotensinogênio aumenta tanto a sua expressão quanto a concentração plasmática ao longo da fase clara e sofre uma nova redução no início da fase escura. Essa segunda diminuição pode estar associada aos resultados encontrados (Figuras 8 a 11 e Figura 13), uma vez que, com exceção da Ang-(1-5) (Figura 12), todos os peptídeos apresentam acrofase no meio da fase escura. Esse aumento pode estar relacionado com a conversão da glicoproteína em seus subprodutos ao longo da noite, período de maior atividade dos camundongos. Essas descobertas sugerem que a ritmicidade dos peptídeos do SRA nesse modelo pode estar relacionada com a alteração na concentração plasmática do precursor do sistema.

Neste trabalho, demonstramos que todos os subprodutos do Angiotensinogênio, com exceção da Ang A, apresentam algum grau de ritmicidade. A Ang II apresentou uma oscilação rítmica ao longo do dia, seguindo um padrão circadiano, enquanto os peptídeos do eixo não-canônico, Ang-(1-7), Ang-(1-5) e Alamandina, exibiram oscilações ultradianas, com um período de aproximadamente 18 horas. Não foi possível determinar o período de oscilação para a Ang I, uma vez que essa análise é baseada nos resultados obtidos pelo teste JTK\_Cycle e esse peptídeo apresentou alteração estatística apenas no teste de curva assimétrica RAIN.



O primeiro peptídeo analisado foi a Ang I, que, apesar de não apresentar atividade fisiológica significativa, é de extrema importância como ponto inicial tanto para o eixo canônico quanto para o eixo protetor do SRA. Essa molécula é formada pela ação catalítica da enzima Renina sobre o Angiotensinogênio, e já foi evidenciado que há variações rítmicas na sua atividade plasmática tanto em camundongos como em humanos (GORDON et al., 1966; MODLINGER et al., 1976; HILFENHAUS et al., 1976; KAWASAKI et al., 1990). O período de oscilação da atividade catalítica da Renina ainda não está bem definido, pois diferentes autores, como Modlinger et al., Hilfenhaus et al. e Kawasaki et al., relatam a existência de uma periodicidade circadiana, enquanto um estudo realizado em humanos por Brandenberger et al. indicou que a atividade da enzima pode apresentar oscilações ultradianas, variando de acordo com a ingestão de alimentos durante o período de atividade ou de acordo com as fases do sono (REM e não REM) durante o repouso (BRANDENBERGER et al., 1985). Essas discrepâncias nos estudos podem estar relacionadas aos períodos de coleta das amostras ou aos métodos utilizados para determinar o perfil de oscilação. No entanto, é importante destacar que em todos os trabalhos a ritmicidade da Renina está presente, dessa forma, nossos achados estão em concordância com o esperado, uma vez que a Ang I apresentou um padrão de oscilação assimétrica (Figura 14), com maior concentração durante a fase escura em que a expressão de Renina começa a aumentar (NAITO et al., 2002).

Os dois componentes do eixo pressor selecionados para análise apresentaram comportamentos distintos. Enquanto a Ang II exibiu uma oscilação rítmica monotônica de aproximadamente 24 horas, consistente com a literatura sobre as oscilações diurnas desse peptídeo (KALA et al., 1973), a Ang A não mostrou nenhum tipo de oscilação. A síntese da Ang II ocorre principalmente através da clivagem da Ang I pela ECA, e, uma vez que a ECA apresenta oscilação circadiana (VEGLIO et al., 1987; CUGINI et al., 1988), é esperado que seu subproduto, a Ang II, tenha o mesmo perfil. Além disso, a expressão e atividade da ECA atinge o pico no meio do período de atividade (NAITO et al., 2002; CUGINI et al., 2004), o que se assemelha à acrofase da Ang II no ZT18 (Figura 9). Ademais, Naito et al. também demonstraram um aumento de mRNA dos receptores AT1 e AT2, de forma coordenada com a ECA. Esses dados nos levam a postular que o meio do período de atividade desses animais é o momento em que o eixo pressor se encontra mais ativo, possivelmente relacionado com a regulação positiva do metabolismo do animal nesse período. Vale também ressaltar que a expressão de mRNA de AT1 é muito mais constante ao longo do dia, com um leve aumento no início da fase escura, enquanto a expressão de AT2 demonstrou alterações pronunciadas

(NAITO et al., 2002; HERICHOVÁ et al., 2013). A partir desse dado podemos inferir que o papel do eixo pressor não só está ligado à concentração de seus peptídeos, mas também a prevalência de seus diferentes receptores. Por exemplo, a maior incidência de acidentes cardiovasculares nas primeiras horas da manhã, que apesar de não corresponder a acrofase de Ang II (Figura 9), pode ser explicado pelo momento em que o mRNA do receptor AT2 está menos abundante, o que pode resultar em um efeito constritor mais intenso da Ang II.

A enzima responsável pela formação da Ang A ainda é desconhecida, logo, não podemos fazer inferências comparando os nossos resultados com estudos anteriores. Apesar disso, uma vez que os nossos dados demonstraram variações na concentração da Ang A durante o dia, mas nenhum tipo de ritmo, podemos postular, inicialmente, que tal enzima, ainda que desconhecida, não apresenta ciclo de atividade periódica e que as variações observadas ao longo do dia estão associadas à concentração do substrato Ang II.

Ao avaliar o eixo protetor, identificamos a presença de um padrão ultradiano em todos os peptídeos selecionados, com ciclos que se repetem aproximadamente a cada 18 horas. O peptídeo Ang-(1-7), considerado o principal componente do eixo protetor do SRA, foi o que apresentou uma concentração plasmática mais homogênea ao longo do dia, com um aumento significativo no ZT06 (13:00h), mantendo-se elevada até o ZT18 (01:00h) e, posteriormente, tendo uma queda no ZT00 (7:00h). Esse é o componente conhecido com mais vias de formação e possíveis precursores dentro do SRA, dessa forma, sua ritmicidade poderia ser gerada apenas por uma das enzimas ou pela combinação da atividade dessas. A síntese da Ang-(1-7) pode ocorrer pela ação da ECA sobre a Ang-(1-9), que segue um padrão de oscilação rítmica em sua atividade catalítica (VEGLIO et al., 1987; CUGINI et al., 1988), e também pela ECA 2 sobre a Ang II, que também apresenta oscilações na expressão de mRNA ao longo do dia, com o pico de concentração no meio da fase escura em ratos (HERICHOVÁ et al., 2013), o que está de acordo com a acrofase observada (Figura 11). Além disso, a Ang-(1-7) também pode ser formada pela ação da NEP, que, pelo que sabemos, não existem dados na literatura que abordem a expressão dessa enzima ao longo do dia, o que impossibilita uma inferência ou correlação com as concentrações plasmáticas de Ang-(1-7). Com base nos nossos resultados e nas evidências da literatura, postulamos que a ritmicidade da Ang-(1-7) é um resultado das oscilações na atividade catalítica de pelo menos duas enzimas, a ECA e a ECA 2.

A Alamandina apresentou um padrão rítmico semelhante aos outros peptídeos do eixo protetor do SRA, com a acrofase ocorrendo em um momento semelhante ao da Ang A e Ang-(1-7), os

seus precursores conhecidos. Observou-se que a concentração de Alamandina foi menor nos ZTs 00, 06 e 12, e maior no ZT18. No entanto, em contraste com a Ang A, a Alamandina demonstrou um valor significativo de ritmicidade de acordo com o algoritmo JTK\_Cycle. Essa diferença provavelmente se deve ao fato da Alamandina possuir mais de uma via de formação. Assim como é o caso da conversão de Ang II para Ang A, ainda não se sabe qual enzima é responsável pela transformação da Ang-(1-7) em Alamandina, porém, a princípio, supondo que seja a mesma proteína, podemos prever que ela não está relacionada com o ritmo encontrado. Partindo desse pressuposto, a responsável pela oscilação plasmática da Alamandina é provavelmente a ECA 2, o que também é corroborado pelo fato de que a acrofase desse peptídeo coincide com o pico de expressão da ECA 2 (HERICHOVÁ et al., 2013). Esses achados reforçam a grande semelhança entre a Ang-(1-7) e a Alamandina, que apresentam uma concentração plasmática ultradiana, com acrofase na metade do período de atividade, possivelmente provocada pela mesma enzima.

A Ang-(1-5) se destacou como o peptídeo com o padrão rítmico mais distinto entre todos os avaliados. Observou-se uma baixa concentração no ZT00, um pico no ZT06, com queda no ZT12 e novo aumento no ZT18. A ritmicidade desse componente provavelmente é resultado da oscilação na atividade catalítica da ECA. No entanto, é curioso que, apesar de ser formado pela mesma enzima que a Ang-(1-7), a Ang-(1-5) possui um padrão tão distinto, sendo o único a apresentar acrofase durante a fase clara. A falta de semelhança na oscilação da Ang-(1-5) com a Ang-(1-7), apontada como seu precursor, pode sugerir a existência de uma via alternativa de formação ainda não descoberta ou uma velocidade de degradação distinta (meia-vida) entre os dois peptídeos ao longo do dia.

Além disso, outro dado que chama a atenção é a relação da concentração da Ang-(1-5) com a oscilação de expressão de mRNA da ECA, descrito por Naito et al. (2002), que não se assemelha aos nossos resultados, esse estudo apontou o menor nível de expressão da enzima ocorrendo na metade da fase clara, sendo o inverso do que era esperado pela nossa quantificação. Esse dado contraditório também pode corroborar uma via alternativa de síntese de Ang-(1-5). Contudo, tal inferência deve ser feita com cautela, pois a abundância de mRNA não necessariamente reflete em abundância da enzima, muito menos na sua atividade ou na meia vida do peptídeo na circulação. Sendo assim, se faz necessários testes de atividade enzimática, a serem realizados concomitantemente com a quantificação dos componentes por LC-MRM, para que tenhamos um entendimento mais preciso do processo e de seu ritmo biológico.

Os nossos resultados apresentam algumas descobertas interessantes que merecem destaque. A prevalência de todos os componentes do sistema, com exceção da Ang-(1-5), no ZT18 correspondente à metade do período de atividade dos camundongos, sugere que esse pode ser um momento crucial para a regulação do SRA como um todo. Como não observamos um pico de expressão do eixo pressor no início da fase clara nem no início do período de atividade (fase escura), pelo menos em camundongos não é possível estabelecer uma ligação entre a concentração plasmática da Ang II e os acidentes cardiovasculares observados em humanos no início da manhã. Uma hipótese que pode ser elaborada é que, em alguns indivíduos possa ocorrer um desequilíbrio no ritmo desses peptídeos, com consequente aumento na concentração de Ang II e diminuição de Ang-(1-7) nas primeiras horas do período claro, favorecendo o acometimento de episódios agudos de doenças vasculares. Contudo, dois pontos devem ser destacados, (i) o ritmo dos peptídeos circulantes do SRA pode ser diferente em *Homo sapiens*, sendo necessário realizar um estudo semelhante em humanos, e (ii) não foi realizada a quantificação dos peptídeos no tecido cardíaco, sendo possível que eles apresentem um ritmo diferente do encontrado na circulação, podendo estar associados à prevalência de doenças vasculares próximas ao ZT00 (07:00h). Além disso, é possível que tais eventos adversos ocorram devido ao padrão de expressão dos receptores AT1 e AT2, em que o primeiro, receptor do eixo pressor, apresentou uma maior expressão no início do período de atividade (NAITO et al., 2002; HERICHOVÁ et al., 2013).

A relação entre a Ang II e a Ang-(1-7) também é intrigante. O fato de o componente do eixo protetor (Ang-(1-7)) estar consistentemente em maior concentração absoluta do que o do eixo pressor (Ang II) pode ter implicações importantes na regulação do sistema e na manutenção da homeostase. A predominância absoluta desse componente em todas as fases do dia pode ser atribuída à presença de mais opções de substratos para a síntese de Ang-(1-7), levando-nos a considerar que o organismo busca ativamente manter os níveis de Ang-(1-7) mais elevados. Além disso, é capaz até mesmo de converter a Ang II em Ang-(1-7), evitando, assim, o acúmulo desse octapeptídeo no organismo e prevenindo os efeitos nocivos que a Ang II pode desencadear, quando produzida de forma descontrolada. Essa dinâmica pode representar um mecanismo de controle essencial para equilibrar a ação dos diferentes componentes do SRA e garantir sua função fisiológica adequada.

Finalmente, é importante reconhecer que os resultados aqui reportados refletem a regulação fisiológica como um todo, considerando a concentração plasmática dos peptídeos, incluindo o impacto das circulações sistêmica e pulmonar. Buscamos comprovar o possível ritmo biológico

dos dois braços funcionais do SRA, por isso, optamos pela quantificação absoluta dos componentes na circulação. No entanto, uma vez que todos os componentes do SRA estão presentes e atuam em diversos órgãos (BADER et al., 2008), o nosso trabalho não permite determinar se a oscilação encontrada é generalizada e acontece da mesma forma em diferentes sistemas do organismo. Cada órgão pode ter necessidades e ritmos distintos, sendo necessária uma abordagem similar em tecidos específicos para alcançar uma caracterização molecular mais completa do SRA.

## 6. Conclusão

Os nossos achados fornecem informações importantes sobre as oscilações e a regulação do SRA circulante. Demonstramos que todos os peptídeos, exceto a Ang A, oscilam ao longo do dia, e a metade da fase de atividade do animal é marcada pela maior abundância de componentes circulantes do sistema de forma geral. Essa descoberta sugere que esse período pode ser crucial para a regulação do SRA e a manutenção da homeostase. Os resultados destacam a complexidade do SRA e sua regulação em diferentes contextos, podendo ter grandes variações mesmo em um intervalo curto de 24h. No entanto, ainda há muitas questões a serem respondidas, como as vias de formação dos peptídeos e as variações dos receptores celulares em diferentes tecidos.

Esse trabalho abre caminho para estudos mais aprofundados, que podem fornecer pistas adicionais sobre como o SRA é regulado em diferentes tecidos e como suas oscilações podem impactar a saúde cardiovascular e a homeostase geral do organismo. A investigação contínua nessa área é essencial para avançar o conhecimento sobre o SRA e pode ter implicações importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas, visando o tratamento de doenças cardiovasculares e outras condições relacionadas.

Finalmente, acreditamos que este trabalho deve ser usado como ponto de inflexão para os grupos de pesquisa que trabalham com o SRA em modelos experimentais *in vivo* em camundongos, pois, normalmente, tais experimentos são realizados no período de inatividade dos animais e, como demonstramos, é o momento de menor produção dos peptídeos circulantes do SRA.

## 7. Referências

- ALBRECHT, Urs; OSTER, Henrik. The circadian clock and behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1–2, p. 89–91, 2001.
- AL-MERANI, S A; BROOKS, D P; CHAPMAN, B J; *et al.* The half-lives of angiotensin II, angiotensin II-amide, angiotensin III, Sar1-Ala8-angiotensin II and renin in the circulatory system of the rat. **The Journal of Physiology**, v. 278, n. 1, p. 471–490, 1978.
- ASABA, Yutaro; ITO, Masako; FUMOTO, Toshio; *et al.* Activation of Renin–Angiotensin System Induces Osteoporosis Independently of Hypertension. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 2, p. 241–250, 2009.
- BADER, Michael; GANTEN, Detlev. Update on tissue renin–angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, p. 615–621, 2008.
- BALSALOBRE, Aurélio; DAMIOLA, Francesca; SCHIBLER, Ueli. A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. **Cell**, v. 93, n. 6, p. 929–937, 1998.
- BEHRENS, Steffen; GALECKA, Mirosława; BRÜGGEMANN, Thomas; *et al.* Circadian variation of sustained ventricular tachyarrhythmias terminated by appropriate shocks in patients with an implantable cardioverter defibrillator. **American Heart Journal**, v. 130, n. 1, p. 79–84, 1995.
- BUIJS, Ruud M.; WORTEL, Joke; VAN HEERIKHUIZE, Joop J.; *et al.* Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway: Suprachiasmatic adrenal interaction. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 1535–1544, 1999.
- BUNGER, Maureen K.; WILSBACHER, Lisa D.; MORAN, Susan M.; *et al.* Mop3 Is an Essential Component of the Master Circadian Pacemaker in Mammals. **Cell**, v. 103, n. 7, p. 1009–1017, 2000.
- BURGESS, Helen J.; SHARKEY, Katherine M.; EASTMAN, Charmane I. Bright light, dark and melatonin can promote circadian adaptation in night shift workers. **Sleep Medicine Reviews**, v. 6, n. 5, p. 407–420, 2002.
- CHARLOUX, Anne; GRONFIER, Claude; LONSDORFER-WOLF, Evelyne; *et al.* Aldosterone release during the sleep-wake cycle in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 276, n. 1, p. E43–E49, 1999.
- CHUNG, Sooyoung; SON, Gi Hoon; KIM, Kyungjin. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 5, p. 581–591, 2011.
- CLARK, Michael F.; LISTER, Richard M.; BAR-JOSEPH, Moshe. ELISA techniques. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1986. p. 742–766.
- CRACKOWER, Michael A.; SARAIO, Renu; OUDIT, Gavin Y.; *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**, v. 417, n. 6891, p. 822–828, 2002.
- COHEN, Mylan C. *et al.* Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death. **American Journal of Cardiology**, v. 79, n. 11, p. 1512–1516, 1997.

- CUGINI, P.; LETIZIA, C.; SCAVO, D. The circadian rhythmicity of serum angiotensin converting enzyme: its phasic relation with the circadian cycle of plasma renin and aldosterone. **Chronobiologia**, v. 15, n. 3, p. 229-231, 1988.
- CUGINI, P.; LUCIA, P. Circadian rhythm of the renin-angiotensin-aldosterone system: a summary of our research studies. **La Clinica terapeutica**, v. 155, n. 7-8, p. 287-291, 2004.
- DALLMANN, Robert; BROWN, Steven A.; GACHON, Frédéric. Chronopharmacology: New Insights and Therapeutic Implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 339–361, 2014.
- DUNLAP, Jay C. Molecular Bases for Circadian Clocks. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 271–290, 1999.
- ELLIOTT, W. Cyclic and circadian variations in cardiovascular events\*1. **American Journal of Hypertension**, v. 14, n. 9, p. S291–S295, 2001.
- FERRARIO, Carlos M. Contribution of angiotensin-(1-7) to cardiovascular physiology and pathology. **Current Hypertension Reports**, v. 5, n. 2, p. 129–134, 2003.
- FERREIRA, Anderson J.; SANTOS, Robson AS; ALMEIDA, Alvaír P. Angiotensina-(1-7): efeito cardioprotetor na isquemia/reperfusão miocárdica. **Hipertensão**, v. 38, n. 3, pág. 665-668, 2001.
- FORRESTER, Steven J.; BOOZ, George W.; SIGMUND, Curt D.; *et al.* Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1627–1738, 2018.
- FRANK, Ellen; BENABOU, Marion; BENTZLEY, Brandon; *et al.* Influencing circadian and sleep-wake regulation for prevention and intervention in mood and anxiety disorders: what makes a good homeostat?: What makes a good homeostat? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1334, n. 1, p. 1–25, 2014.
- GASTEL, Jonathan A.; ROSEBOOM, Patrick H.; RINALDI, Peter A.; *et al.* Melatonin Production: Proteasomal Proteolysis in Serotonin *N*-Acetyltransferase Regulation. **Science**, v. 279, n. 5355, p. 1358–1360, 1998.
- GOLOMBEK, Diego A.; ROSENSTEIN, Ruth E. Physiology of Circadian Entrainment. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 1063–1102, 2010.
- GORDON, R D; WOLFE, L K; ISLAND, D P; *et al.* A diurnal rhythm in plasma renin activity in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 45, n. 10, p. 1587–1592, 1966.
- GRIFFITHS, Jennifer. A Brief History of Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 15, p. 5678–5683, 2008.
- GUILDING, Clare; HUGHES, Alun TI; BROWN, Timothy M; *et al.* A riot of rhythms: neuronal and glial circadian oscillators in the mediobasal hypothalamus. **Molecular Brain**, v. 2, n. 1, p. 28, 2009.
- HANIFIN, John P.; STEWART, Karen T.; SMITH, Peter; *et al.* High-intensity red light suppresses melatonin. **Chronobiology International**, v. 23, n. 1–2, p. 251–268, 2006.
- HARTIKAINEN, J.; TARKIAINEN, I.; TAHVANAINEN, K.; *et al.* Circadian variation of cardiac autonomic regulation during 24-h bed rest. **Clinical Physiology**, v. 13, n. 2, p. 185–196, 1993.
- HASTINGS, Michael; MAYWOOD, Elizabeth S. Circadian clocks in the mammalian brain. **BioEssays**, v. 22, n. 1, p. 23–31, 2000.
- HASTINGS, Michael; O'NEILL, John S; MAYWOOD, Elizabeth S. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. **Journal of Endocrinology**, v. 195, n. 2, p. 187–198, 2007.



- HASTINGS, Michael H.; MAYWOOD, Elizabeth S.; BRANCACCIO, Marco. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 19, n. 8, p. 453-469, 2018.
- HERICHOVÁ, Iveta; ŠOLTÉSOVÁ, Dorota; SZÁNTÓOVÁ, Kristína; *et al.* Effect of angiotensin II on rhythmic *per2* expression in the suprachiasmatic nucleus and heart and daily rhythm of activity in Wistar rats. **Regulatory Peptides**, v. 186, p. 49–56, 2013.
- HICKMAN, Alison Burgess *et al.* The structural basis of ordered substrate binding by serotonin N-acetyltransferase: enzyme complex at 1.8 Å resolution with a bisubstrate analog. *Cell*, v. 97, n. 3, p. 361-369, 1999.
- HILFENHAUS, M. Circadian rhythm of the renin-angiotensin-aldosterone system in the rat. **Archives of Toxicology**, v. 36, n. 3–4, p. 305–316, 1976.
- HUGHES, Michael E.; HOGENESCH, John B.; KORNACKER, Karl. JTK\_CYCLE: An Efficient Nonparametric Algorithm for Detecting Rhythmic Components in Genome-Scale Data Sets. **Journal of Biological Rhythms**, v. 25, n. 5, p. 372–380, 2010.
- JANKOWSKI, Vera; VANHOLDER, Raymond; VAN DER GIET, Markus; *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, 2007.
- JESUS, Itamar Couto Guedes De; SCALZO, Sérgio; ALVES, Fabiana; *et al.* Alamandine acts via MrgD to induce AMPK/NO activation against ANG II hypertrophy in cardiomyocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 314, n. 6, p. C702–C711, 2018.
- KALA, R.; FYHRQUIST, F.; EISALO, A. Diurnal Variation of Plasma Angiotensin II in Man. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 31, n. 4, p. 363–365, 1973.
- KALSBECK, A.; VAN DER SPEK, R.; LEI, J.; *et al.* Circadian rhythms in the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 349, n. 1, p. 20–29, 2012.
- KARIO, Kazuomi; PICKERING, Thomas G.; UMEDA, Yuji; *et al.* Morning Surge in Blood Pressure as a Predictor of Silent and Clinical Cerebrovascular Disease in Elderly Hypertensives: A Prospective Study. **Circulation**, v. 107, n. 10, p. 1401–1406, 2003.
- KASAHARA, Takaoki; ABE, Kuniya; MEKADA, Kazuyuki; *et al.* Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 14, p. 6412–6417, 2010.
- KAWASAKI, T.; CUGINI, P.; UEZONO, K.; *et al.* Circadian Variations of Total Renin, Active Renin, Plasma Renin Activity and Plasma Aldosterone in Clinically Healthy Young Subjects. **Hormone and Metabolic Research**, v. 22, n. 12, p. 636–639, 1990.
- KENDALL, P.E.; WEBSTER, J.R. Season and physiological status affects the circadian body temperature rhythm of dairy cows. **Livestock Science**, v. 125, n. 2–3, p. 155–160, 2009.
- KENNAWAY, D. J.; VOULTSIOS, A.; VARCOE, T. J.; *et al.* Melatonin in mice: rhythms, response to light, adrenergic stimulation, and metabolism. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 2, p. R358–R365, 2002.
- KIM, Brianna. Western blot techniques. **Molecular profiling: Methods and protocols**, p. 133-139, 2017.

KOLATA, Gina. Heart Attacks at 9:00 a.m.: Researchers are finding, to their surprise, that heart attacks and strokes tend to occur in the morning, which may lead them to an understanding of why they occur at all. **Science**, v. 233, n. 4762, p. 417–418, 1986.

LA FLEUR; KALSBECK; WORTEL; *et al.* A Suprachiasmatic Nucleus Generated Rhythm In Basal Glucose Concentrations: A glucose rhythm generated by the SCN. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, n. 8, p. 643–652, 2001.

LAUTNER, Roberto Queiroga; VILLELA, Daniel C.; FRAGA-SILVA, Rodrigo A.; *et al.* Discovery and Characterization of Alamandine: A Novel Component of the Renin–Angiotensin System. **Circulation Research**, v. 112, n. 8, p. 1104–1111, 2013.

LIAO, Tang-Dong; YANG, Xiao-Ping; LIU, Yun-He; *et al.* Role of Inflammation in the Development of Renal Damage and Dysfunction in Angiotensin II–Induced Hypertension. **Hypertension**, v. 52, n. 2, p. 256–263, 2008.

LIGHTMAN, S. L. *et al.* Studies of diurnal changes in plasma renin activity, and plasma noradrenaline, aldosterone and cortisol concentrations in man. **Clinical endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 213–223, 1981.

MAEMURA, Koji; DE LA MONTE, Suzanne M.; CHIN, Michael T.; *et al.* CLIF, a Novel Cycle-like Factor, Regulates the Circadian Oscillation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 36847–36851, 2000.

MINAMISAWA, Masatoshi; IZAWA, Atsushi; MOTOKI, Hirohiko; *et al.* Prognostic Significance of Neuroadrenergic Dysfunction for Cardiovascular Events in Patients With Acute Myocardial Infarction. **Circulation Journal**, v. 79, n. 10, p. 2238–2245, 2015.

MODLINGER, Robert S.; SHARIF-ZADEH, Kurosh; ERTEL, Norman H.; *et al.* The Circadian Rhythm of Renin. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 43, n. 6, p. 1276–1282, 1976.

MOORE, Robert Y.; EICHLER, Victor B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. **Brain Research**, v. 42, n. 1, p. 201–206, 1972.

NAITO, Yoshiro; TSUJINO, Takeshi; FUJIOKA, Yoshio; *et al.* Augmented Diurnal Variations of the Cardiac Renin-Angiotensin System in Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 40, n. 6, p. 827–833, 2002.

NISHIJIMA, Yoko; KOBORI, Hiroyuki; KAIFU, Kumiko; *et al.* Circadian rhythm of plasma and urinary angiotensinogen in healthy volunteers and in patients with chronic kidney disease. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 15, n. 4, p. 505–508, 2014.

PANDA, Satchidananda. Circadian physiology of metabolism. **Science**, v. 354, n. 6315, p. 1008–1015, 2016.

PANZA, Julio A.; EPSTEIN, Stephen E.; QUYYUMI, Arshed A. Circadian variation in vascular tone and its relation to  $\alpha$ -sympathetic vasoconstrictor activity. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 14, p. 986–990, 1991.

PARANJPE, Dhanashree A.; ANITHA, D.; KUMAR, Shailesh; *et al.* Entrainment of Eclosion Rhythm in *Drosophila melanogaster* Populations Reared for More Than 700 Generations in Constant Light Environment. **Chronobiology International**, v. 20, n. 6, p. 977–987, 2003.

PASSOS-SILVA, Danielle G.; VERANO-BRAGA, Thiago; SANTOS, Robson A. S. Angiotensin-(1–7): beyond the cardio-renal actions. **Clinical Science**, v. 124, n. 7, p. 443–456, 2013.

PAZ OCARANZA, Maria et al. Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 2, p. 116–129, 2020.

PERREAU-LENZ, Stéphanie; KALSBECK, Andries; GARIDOU, Marie-Laure; *et al.* Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms: Melatonin synthesis controlled by clock outputs. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 221–228, 2003.

PICKERING, Thomas G. et al. Blood pressure during normal daily activities, sleep, and exercise: comparison of values in normal and hypertensive subjects. **Jama**, v. 247, n. 7, p. 992–996, 1982.

PITSAWONG, Warintra; PÁDUA, Ricardo A. P.; GRANT, Timothy; *et al.* From primordial clocks to circadian oscillators. **Nature**, v. 616, n. 7955, p. 183–189, 2023.

PITTENDRIGH, Colin S.; KYNER, Walter T.; TAKAMURA, Tsuguhiko. The Amplitude of Circadian Oscillations: Temperature Dependence, Latitudinal Clines, and the Photoperiodic Time Measurement. **Journal of Biological Rhythms**, v. 6, n. 4, p. 299–313, 1991.

POLIDAROVÁ, Lenka; SLÁDEK, Martin; NOVÁKOVÁ, Marta; *et al.* Increased Sensitivity of the Circadian System to Temporal Changes in the Feeding Regime of Spontaneously Hypertensive Rats - A Potential Role for Bmal2 in the Liver. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e75690, 2013.

RENSING, Ludger; MEYER-GRAHLE, Ulf; RUOFF, Peter. Biological timing and the clock metaphor: oscillatory and hourglass mechanisms. **Chronobiology international**, v. 18, n. 3, p. 329–369, 2001.

RICE, Gillian I.; THOMAS, Daniel A.; GRANT, Peter J.; *et al.* Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. **Biochemical Journal**, v. 383, n. 1, p. 45–51, 2004.

RITTIG, Søren; MATTHIESEN, Thorsten B.; PEDERSEN, Erling B.; *et al.* Circadian Variation of Angiotensin II and Aldosterone in Nocturnal Enuresis: Relationship to Arterial Blood Pressure and Urine Output. **Journal of Urology**, v. 176, n. 2, p. 774–780, 2006.

SANTOS, Robson A. S.; E SILVA, Ana C. Simoes; MARIC, Christine; *et al.* Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 2003.

SANTOS, Robson Augusto Souza; SAMPAIO, Walkyria Oliveira; ALZAMORA, Andreia C.; *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, 2018.

STERN, Naftali et al. Circadian rhythm of plasma renin activity in older normal and essential hypertensive men: relation with inactive renin, aldosterone, cortisol and REM sleep. *Journal of hypertension*, v. 4, n. 5, p. 543–550, 1986.

SHARP, Mark E.; MARX, Stephen J. Radioimmunoassay for the middle region of human parathyroid hormone: comparison of two radioiodinated synthetic peptides. **Clinica Chimica Acta**, v. 145, n. 1, p. 59–68, 1985.

SHINOHARA, K; HONMA, S; KATSUNO, Y; *et al.* Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 16, p. 7396–7400, 1995.

SKEGGS, Leonard T.; MARSH, Walton H.; KAHN, Joseph R.; *et al.* THE EXISTENCE OF TWO FORMS OF HYPERTENSIN. **Journal of Experimental Medicine**, v. 99, n. 3, p. 275–282, 1954.

- STEPHAN, Friedrich K.; ZUCKER, Irving. Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 6, p. 1583–1586, 1972.
- STOYNEV, A. et al. Effects of suprachiasmatic nuclei (SCN) lesions on the circadian variations in PRA and IRI level in the rat. **Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 56, n. 4, p. 431–435, 1980.
- TAKEDA, Norihiko; MAEMURA, Koji. Circadian clock and the onset of cardiovascular events. **Hypertension Research**, v. 39, n. 6, p. 383–390, 2016.
- TAKEDA, Norihiko; MAEMURA, Koji. Circadian clock and vascular disease. **Hypertension Research**, v. 33, n. 7, p. 645–651, 2010.
- THABEN, Paul F.; WESTERMARK, Pål O. Detecting Rhythms in Time Series with RAIN. **Journal of Biological Rhythms**, v. 29, n. 6, p. 391–400, 2014.
- THAPAN, Kavita; ARENDT, Josephine; SKENE, Debra J. An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. **The Journal of Physiology**, v. 535, n. 1, p. 261–267, 2001.
- TIGERSTEDT, Robert; BERGMAN, P. Q. Niere und Kreislauf <sup>1</sup>. **Skandinavisches Archiv Für Physiologie**, v. 8, n. 1, p. 223–271, 1898.
- TIPNIS, Sarah R.; HOOPER, Nigel M.; HYDE, Ralph; *et al.* A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33238–33243, 2000.
- TOKONAMI, Natsuko; MORDASINI, David; PRADERVAND, Sylvain; *et al.* Local Renal Circadian Clocks Control Fluid–Electrolyte Homeostasis and BP. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 7, p. 1430–1439, 2014.
- TONSFELDT, Karen J.; CHAPPELL, Patrick E. Clocks on top: The role of the circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 349, n. 1, p. 3–12, 2012.
- VAAJANEN, Anu; VAPAATALO, Heikki; KAUTIAINEN, Hannu; *et al.* Angiotensin (1-7) Reduces Intraocular Pressure in the Normotensive Rabbit Eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, n. 6, p. 2557, 2008.
- VAN DEN POL, Anthony N. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 191, n. 4, p. 661–702, 1980.
- VEGLIO, Franco et al. Circadian rhythm of the angiotensin converting enzyme (ACE) activity in serum of healthy adult subjects. **Chronobiologia**, v. 14, n. 1, p. 21–25, 1987.
- WAGER-SMITH, Karen; KAY, Steve A. Circadian rhythm genetics: from flies to mice to humans. **Nature Genetics**, v. 26, n. 1, p. 23–27, 2000.
- WEBB, Alexis B.; ANGELO, Nikhil; HUETTNER, James E.; *et al.* Intrinsic, nondeterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 38, p. 16493–16498, 2009.
- WILLIAMS, Bryan. Angiotensin II and the pathophysiology of cardiovascular remodeling. **The American Journal of Cardiology**, v. 87, n. 8, p. 10–17, 2001.
- WILSBACHER, Lisa D; TAKAHASHI, Joseph S. Circadian rhythms: molecular basis of the clock. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 8, n. 5, p. 595–602, 1998.

WOLF, Gunter; NEILSON, Eric G. From converting enzyme inhibition to angiotensin II receptor blockade: new insight on angiotensin II receptor subtypes in the kidney. **Experimental Nephrology**, v. 4, p. 8-19, 1996.

World Health Organization - WHO. Cardiovascular diseases. Disponível em [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) Acesso em: 19 de fev. 2021.

WU, Tao; JIN, Yuanxiang; KATO, Hisanori; *et al.* Light and food signals cooperate to entrain the rat pineal circadian system. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 14, p. 3246–3255, 2008.

YAMADA, Kazuo; IYER, Shridhar N.; CHAPPELL, Mark C.; *et al.* Converting Enzyme Determines Plasma Clearance of Angiotensin-(1–7). **Hypertension**, v. 32, n. 3, p. 496–502, 1998.

YAMAMOTO, Koichi; OHISHI, Mitsuru; KATSUYA, Tomohiro; *et al.* Deletion of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Accelerates Pressure Overload-Induced Cardiac Dysfunction by Increasing Local Angiotensin II. **Hypertension**, v. 47, n. 4, p. 718–726, 2006.

YANG, Rui; SMOLDERS, Ilse; VANDERHEYDEN, Patrick; *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, 2011.

ZHANG, Jianfa; KAASIK, Krista; BLACKBURN, Michael R.; *et al.* Constant darkness is a circadian metabolic signal in mammals. **Nature**, v. 439, n. 7074, p. 340–343, 2006.

ZHUANG, Xiaodong; TSUKUDA, Senko; WRENSCH, Florian; *et al.* The circadian clock component BMAL1 regulates SARS-CoV-2 entry and replication in lung epithelial cells. **iScience**, v. 24, n. 10, p. 103144, 2021.