



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

REGINA SOUZA AIRES

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO HIPOTENSOR DE UM PEPTÍDEO
NATRIURÉTICO SINTÉTICO (NPCdc) EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA RENAL
CRÔNICA**

**Recife
2019**

REGINA SOUZA AIRES

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO HIPOTENSOR DE UM PEPTÍDEO
NATRIURÉTICO SINTÉTICO (NPCdc) EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA RENAL
CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de doutora em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Aires, Regina Souza

Investigação do mecanismo de ação hipotensor de um peptídeo natriurético (NPCdc) em ratos com insuficiência renal crônica / Regina Souza Aires. – 2019.

110 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Durce Oliveira da Paixão.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Insuficiência renal crônica. 2. Peptídeos. 3. Farmacocinética. I. Paixão, Ana Durce Oliveira da (Orientadora). II. Título.

616.614

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 206

REGINA SOUZA AIRES

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO HIPOTENSOR DE UM PEPTÍDEO
NATRIURÉTICO SINTÉTICO (NPCdc) EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA RENAL
CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de doutora em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 13/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Profª Ana Durce Oliveira da Paixão (Orientadora)
Departamento de Biofísica – UFPE

Prof Claudio Gabriel Rodrigues (Examinador interno)
Departamento de Biofísica – UFPE

Profª Dayane Aparecida Gomes (Examinador externo)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE

Prof João Henrique da Costa Silva (Examinador externo)
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – CAV – UFPE

Profª Alice Valença Araújo (Examinador externo)
Núcleo de Saúde Coletiva – CAV – UFPE

Prof. Edjair Vicente Cabral (Examinador externo)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE

Dedico esse trabalho a minha querida mãe Graciete Aires por todo amor e proteção e ao meu pai Reginaldo Souza (*in memoriam*) pelos ensinamentos jamais esquecidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar a força e a proteção necessária para seguir em frente. Por me proporcionar grandes conquistas. E claro, pelo dom da vida.

À minha família, por formarem uma estrutura sólida que me proporcionou crescer e seguir no caminho certo.

À professora Ana Durce Oliveira da Paixão, por se empenhar no papel de educadora compartilhando seus conhecimentos. Agradeço pela orientação acadêmica durante a iniciação científica, mestrado e doutorado, e por ter me ajudado na construção, no andamento e na conclusão deste trabalho.

Ao professor Leucio Duarte, pela amizade, consideração e ajuda fundamental para elaboração deste trabalho.

A todos os integrantes que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal, que de formas variadas contribuíram para a construção desse trabalho e que por vezes sacrificaram seus tempos, finais de semana e feriados, em virtude dos experimentos aqui apresentados.

Aos integrantes do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Departamento de Biofísica, pela disposição em ceder tempo, espaço e auxílio com os equipamentos.

A todos os mestres que me despertaram o gosto por aprender e ensinar. Sem dúvidas vocês foram muito importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta tese.

Ao Paulo Germano pela sua competência, paciência, colaboração e pontualidade.

A coordenação da Pós-Graduação em Inovação Terapêutica pelo prazer da interdisciplinaridade e desenvolvimento de atividades de pesquisa, ensino e extensão. Foram dois anos de mestrado e quatro anos de doutorado bastante produtivos e proveitosos.

A Universidade Federal de Pernambuco por proporcionar-me um ótimo perfil acadêmico para a vida profissional. Por dispor de ótima estrutura para o desenvolvimento das atividades de ensino, pesquisa e extensão, pelas ajudas de custo na realização e participação de eventos científicos.

Às agências de fomento, em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela bolsa de doutorado e a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo auxílio de mobilidade discente concedido.

Aos integrantes do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial a Professora Maria Elena de Lima pela acolhida e solicitude e a Ana Cristina Freitas pela ajuda nos experimentos de biologia molecular.

À professora Adriana Carmona e ao Marcelo Marcondes pelos experimentos com a neprilisina, realizados na Universidade Federal de São Paulo.

Aos amigos que acompanharam e se dispuseram a ouvir, a entender e a ajudar durante essa jornada pessoal, científica e acadêmica.

À minha irmã Raiane Souza Aires por estar junto comigo nessa jornada, apoiando-me.

E sem dúvidas, aos meus pais Reginaldo Souza (*in memoriam*) e Graciete Aires por terem iniciado minha vida e possibilitado todas as minhas conquistas que pertencem acima de tudo a eles.

“Não há saber mais ou saber menos: há saberes diferentes.”

Paulo Freire

RESUMO

O NPCdc é um peptídeo natriurético sintético originalmente derivado de outro peptídeo, o NP2_Casca, isolado do veneno da *Crotalus durissus cascavella*. Neste trabalho propomos investigar o mecanismo de ação hipotensor do NPCdc em ratos com massa renal reduzida, um modelo de insuficiência renal crônica. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (nº 23076.016262/2015-01). Ratos Wistar machos, pesando em média 300g foram utilizados. Os animais foram submetidos à cirurgia fictícia (sham) ou a nefrectomia 5/6 (Nx5/6). No 15º dia após a cirurgia, os animais foram anestesiados e submetidos à infusão intravenosa do NPCdc (7,5 µg/kg/min) ou veículo (salina), para avaliação de variáveis hemodinâmicas e parâmetros da função renal. No final das mensurações, o rim e a aorta foram coletados. O rim foi utilizado para avaliação da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase e Na⁺-ATPase, bem como para avaliação dos níveis de ânion superóxido. A aorta foi utilizada para dosagem de óxido nítrico (NO) e para avaliação da expressão proteica da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e de sua forma induzida (iNOS). Adicionalmente, a expressão das proteínas cinases, ERK1/2, AKT e cGKI também foram avaliadas. A análise estatística foi realizada através de two-way ANOVA e teste “t” não pareado. Durante infusão do NPCdc no grupo Nx5/6, foram observados: diminuição da pressão arterial média e da resistência vascular renal, nenhuma alteração do fluxo sanguíneo e plasmático renal e elevação da filtração glomerular e da fração de filtração. Embora o NPCdc não tenha aumentado o fluxo urinário, a fração de excreção de Na⁺ e K⁺ apresentou-se aumentada. Ademais, no grupo sham, o NPCdc diminuiu a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase e aumentou a atividade da Na⁺-ATPase. Em contrapartida, no grupo Nx5/6, o NPCdc não alterou a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase, porém aumentou a atividade da Na⁺-ATPase. Em relação ao estresse oxidativo, os níveis basais de ânion superóxido apresentaram-se inalterados, porém a produção de ânion superóxido dependente da NADPH oxidase apresentou-se diminuída pelo NPCdc. Na aorta, o grupo Nx5/6 apresentou: nenhuma alteração nas expressões da AKT e da ERK1/2, expressão aumentada das isoformas fosforiladas de eNOS e iNOS e diminuição da expressão da cGKI. Ainda na aorta do grupo Nx5/6, os níveis de nitrito apresentaram-se diminuídos, dado que indica uma menor biodisponibilidade do NO. Nas aortas de ambos os grupos tratados com o NPCdc, sham e Nx5/6, os níveis de ERK1/2 fosforilada apresentaram-se aumentados, assim como a expressão da cGKI e a concentração de nitrito. A repercussão do efeito do NPCdc sobre a expressão de ERK1/2 fosforilada ainda precisa investigações adicionais. Estes dados indicam que o NPCdc tem ação hipotensora porque aumenta a filtração glomerular e a fração de excreção de sódio, adicionalmente, aumenta a expressão de cGKI, diminui níveis de ânion superóxido e aumenta a biodisponibilidade do óxido nítrico na aorta.

Palavras-chave: Peptídeo natriurético. Aorta. Óxido Nítrico. ERK1/2. Hemodinâmica renal. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

NPCdc is a synthetic natriuretic peptide that was originally derived from another peptide, the NP2_Casca, isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. In this work, we propose to investigate the hypotension mechanism of action of NPCdc in rats subjected to 5/6 nephrectomy, a model of chronic renal failure. The experimental protocol was approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation (n° 23076.016262/2015-01). Male Wistar rats weighing 300 ± 20 g were used. The animals were submitted to a fictitious surgery, the Sham group or to 5/6 nephrectomy, the group Nx5/6. On the 15th day after surgery, the animals were anesthetized and prepared for intravenous infusion of NPCdc (7.5 μ g/kg/min) or vehicle (saline), in order to evaluate renal hemodynamics and natriuresis. After *in vivo* evaluations, the kidneys and abdominal aorta were withdrawn. In the kidney the activity of ATP dependent sodium transporters, Na⁺/K⁺-ATPase and Na⁺-ATPase, in proximal tubule, as well as levels of superoxide anion were evaluated. In aorta, nitric oxide (NO) and expressions of nitric oxide synthase neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and induced (iNOS) were investigated. Additionally, expressions of kinases ERK1/2, Akt and cGKI were also evaluated. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA and unpaired Student “t” test. During NPCdc administration, in Nx5/6 group, it was observed: reduction in mean arterial pressure and renal vascular resistance, any alteration in renal blood and plasma flow and elevation in glomerular filtration rate and filtration fraction was reduced when compared to Nx5/6 treated with vehicle. Although NPCdc did not increase urinary flow, it led to increased Na⁺ and K⁺ excretion fraction. Furthermore, in Sham group, NPCdc reduced Na⁺/K⁺-ATPase and increased Na⁺-ATPase activity. On the other hand, in the Nx5/6 group, NPCdc did not change Na⁺/K⁺-ATPase activity, but increased Na⁺-ATPase activity. Regarding oxidative stress, basal levels of superoxide anion was unchanged by NPCdc, but NADPH oxidase dependent superoxide anion was decreased by NPCdc. In aorta, Nx5/6 group presented: any alteration in expressions of Akt and ERK1/2, elevation in phospho-eNOS and phosphor-iNOS and reduction in cGKI expression. Still in aNx5/6 aorta, nitrite levels were reduced, which indicates reduced NO bioavailability. In aorta of both groups treated with NPCdc, Sham and Nx5/6, the expression of phosphor-ERK1/2 were augmented, as well as the expression of cGKI and nitrite concentration. Repercussion of NPCdc effects on ERK1/2 needs additional investigations. These data indicate that NPCdc has hypotensive action because it increases glomerular filtration and sodium excretion fraction, additionally it increases cGKI expression, decreases superoxide anion levels and increases nitric oxide bioavailability in aorta.

Keywords: Natriuretic peptide. Aorta. Nitric oxide. ERK1/2. Renal hemodynamics. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ESTRUTURAS DA FAMÍLIA DOS PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS	22
FIGURA 2 – ESTRUTURA DE PRÉ-PRÓ-HORMÔNIOS, SEQUÊNCIA FINAL E SÍTIOS DE CLIVAGEM PARA PNA, PNB E PNC.	23
FIGURA 3 – RECEPTORES PARA OS PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS RPN-A, RPN-B E RPN-C	24
FIGURA 4 – SINALIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS E MODULAÇÃO DOS CANAIS DE K_{ATP}	32
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVAÇÃO DA NADPH OXIDASE EM FAGÓCITOS	36
FIGURA 6 –SEQUÊNCIA COMPLETA DE AMINOÁCIDOS DO PEPTÍDEO, COM ALINHAMENTO SEQUENCIAL COMPARATIVO ENTRE O NPCdc E OUTROS PNs..	41
FIGURA 7. PERFIL DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO NPCdc POR MALDI-TOFF (GENONE).	49
FIGURA 8 – MODELO CIRÚRGICO – NEFRECTOMIA 5/6.....	52
FIGURA 9 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL EM DIAS	52
FIGURA 10 – REGISTRO DE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS EM MINUTOS.....	55
FIGURA 11 – PARÂMETRO B-FACTOR PROFILE (BPF) PARA A PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA SEQUÊNCIA DO NPCdc..	64
FIGURA 12 – MODELOS 3D DO NPCdc GERADOS PELO PROGRAMA I-TASSER. O C-SCORE CORRESPONDE À PRECISÃO DOS MODELOS DAS ESTRUTURAS OBTIDAS PELO ITASSER.....	65
FIGURA 13. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO (KI) DO NPCDC NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA ENDOPEPTIDASE NEUTRA (NEP).	66
FIGURA 14 – CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS APÓS A CIRURGIA DE Nx5/6	67
FIGURA 15 – PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA ANTES E DURANTE A INFUSÃO DE DOLUÇÃO SALINA OU NPCdc.....	69
FIGURA 16 – PARÂMETROS HEMODINÂMICOS RENAI NOS GRUPOS SHAM E NX5/6 DURANTE A INFUSÃO DE SOLUÇÃO SALINA OU NPCdc.....	71

FIGURA 17 – ATIVIDADE DA Na^+/K^+ -ATPASE E Na^+ -ATPASE NO TÚBULO PROXIMAL RENAL APÓS INFUSÃO DO NPCdc	73
FIGURA 18 – NÍVEIS BASAIS DE ÂNION SUPERÓXIDO ($\text{O}_2^{\bullet-}$) E ATIVIDADE DE NADPH OXIDASE NO RIM APÓS A INFUSÃO DE SOLUÇÃO SALINA OU NPCDC ..	73
FIGURA 19 – ATIVIDADE DA NADPH OXIDASE, CONCENTRAÇÃO DE NITRITO [NO_2^-] E DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA QUINASE DEPENDENTE DE cGMP (cGKI) NA AORTA TORÁCICA APÓS A INFUSÃO DE SOLUÇÃO SALINA OU NPCdc.	75
FIGURA 20 – NÍVEIS DE PROTEÍNAS NOS NA AORTA TORÁCICA APÓS A INFUSÃO DE SOLUÇÃO SALINA OU NPCdc.....	76
FIGURA 21 – NÍVEIS DAS PROTEÍNAS AKT E ERK1/2 NA AORTA TORÁCICA APÓS INFUSÃO DE SOLUÇÃO SALINA OU NPCdc.....	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	42
TABELA 2 – DESCRIÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NO WESTERN BLOTTING E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES DE USO.....	63
TABELA 3 – PROTEÍNAS BASEADA NO TM-SCORE DO ALINHAMENTO ESTRUTURAL ENTRE O NPCDC E AS ESTRUTURAS CONHECIDAS NO PDB.	65
TABELA 4 – PARÂMETROS METABÓLICOS AVALIADOS NO 13º DIA APÓS A NX5/6.	67
TABELA 5 – ANÁLISE DE VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	70
TABELA 6 – CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA E URINÁRIA DOS ÍONS SÓDIO E POTÁSSIO APÓS ADMINISTRAÇÃO DO VEÍCULO OU NPCdc.....	72
TABELA 7 – PARÂMETROS AVALIADOS NO 15º DIA APÓS A Nx5/6	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Hormônio antidiurético
AKT	Proteína cinase B
AMPc	3'5' – monofosfato cíclico de adenosina
AngII	Angiotensina II
ATP	Trifosfato de adenosina
BAD	Promotor de morte celular associado à Bcl-2
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	Linfoma de células B
BFP	<i>B-factor profile</i>
BH4	Tetrahidrobiopterina
BIP	Peptídeo inibidor da bradicinina
BK	Bradicinina
BPP	Peptídeo potenciador da bradicinina
BSA	Albumina bovina sérica
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
cGKI	Proteína cinase dependente de cGMP
cGMP	3'5' – monofosfato cíclico de guanosina
CVRR	Coeficiente de variância dos intervalos RR
DCV	Doença cardiovascular
DRC	Doença renal crônica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET	Endotelina
FAD	Flavina-adenina-mononucleotídeo
FMN	Flavina-mononucleotídeo
FG	Filtração glomerular
FSR	Fluxo sanguíneo renal

GCp	Guanilil ciclase particulada
GCs	Guanilil ciclase solúvel
cGKI	Proteína cinase I dependente de cGMP
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
GN	Guanilina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
I-TASSER	<i>Iterative Threading ASSEmbly Refinement</i>
MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitógenos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAD(P)H oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato) oxidase
NEP	Neprilisina
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NPCasca	Peptídeo isolado da <i>Crotalus durissus cascavella</i>
NPCdc	Peptídeo sintético da <i>Crotalus durissus cascavella</i>
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
PDB	<i>Protein data bank</i>
PN	Peptídeo natriurético
PNA	Peptídeo natriurético atrial
PNB	Peptídeo natriurético tipo B
PNC	Peptídeo natriurético tipo C
PND	Peptídeo natriurético da <i>Dendroaspis angusticeps</i>
PPA	<i>Profile-Profile threading Alignment</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RPN-A	Receptor transmembrana de peptídeo natriurético tipo A
RPN-B	Receptor transmembrana de peptídeo natriurético tipo B
RPN-C	Receptor transmembrana de peptídeo natriurético tipo C
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDRR	Desvio padrão dos intervalos RR

SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SOD	Superóxido dismutase
SRRA	Sistema renina angiotensina aldosterona
SRTX	Sarafotoxina
TCA	Ácido tricloroacético
UGN	Uroguanilina
URO	Urodilatina
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS	22
2.1.1 Química, síntese e secreção	22
2.1.2 Receptores e metabolismo.....	24
2.2 SINALIZAÇÃO INTRACELULAR.....	27
2.2.1 Óxido nítrico	27
2.2.2 cGMP/cGKI	28
2.2.3 ERK1/2	29
2.2.4 AKT	30
2.3 EFEITOS HEMODINÂMICOS DOS PN _s	32
2.4 REGULAÇÃO HIDROELETROLÍTICA	34
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO.....	35
2.6 PEPTÍDEOS HIPOTENSORES OBTIDOS DE VENENOS OFÍDICOS.....	38
2.7 DOENÇA RENAL CRÔNICA	41
2.8 TERAPÊUTICA COM PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS	45
3 METODOLOGIA.....	49
3.1 SÍNTESE EM FASE SÓLIDA DO NPCdc	49
3.2 MODELAGEM MOLECULAR	49
3.3 MATERIAIS	50
3.4 PARÂMETRO FARMACOCINÉTICO	50
3.5 ASPECTOS ÉTICOS	51
3.6 ANIMAIS	51
3.7 NEFRECTOMIA 5/6.....	51
3.8 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS.....	53
3.9 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIORRENAIS	53
3.9.1 Preparação do animal para medidas hemodinâmicas.....	53
3.9.2 Registro direto da pressão arterial média	55
3.9.3 Análise da variabilidade da frequência cardíaca	56
3.9.4 Medida do fluxo sanguíneo renal	56
3.9.5 Determinação do fluxo plasmático renal	57

3.9.6 Determinação da resistência vascular renal.....	57
3.9.7 Avaliação da filtração glomerular.....	57
3.9.8 Determinação da fração de filtração.....	57
3.9.9 Determinação da fração de excreção de sódio e potássio.....	58
3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ATPASES TRANSPORTADORAS DE Na⁺ NO TÚBULO PROXIMAL RENAL.....	58
3.10.1 Obtenção da fração de membranas do túbulo proximal	58
3.10.2 Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase	59
3.10.3 Atividade da Na⁺-ATPase	59
3.11 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NADPH.....	60
3.12 AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO CELULAR NA AORTA.....	61
3.12.1 Dosagem de óxido nítrico	61
3.12.2 Determinação da expressão proteica	61
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
4 RESULTADOS	64
4.1 MODELAGEM DO NPCDC	64
4.2 ENSAIO DE INIBIÇÃO DO NPCdc.....	66
4.3 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA.....	66
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE DRC	67
4.5 EFEITOS DO NPCdc SOBRE PARÂMETROS CARDIORRENAIS.....	68
4.5.1 Pressão arterial e frequência cardíaca.....	68
4.5.2 Variabilidade da frequência cardíaca	69
4.5.3 Hemodinâmica renal	70
4.5.4 ATPases transportadores de Na⁺ no túbulo proximal renal.....	72
4.5.5 Níveis de ânion superóxido renal	73
4.6 EFEITOS DO NPCdc SOBRE A SINALIZAÇÃO CELULAR DA AORTA	74
4.6.1 Atividade da NADPH oxidase, níveis de NO e de cGKI	74
4.6.2 Expressão da eNOS, nNOS e iNOS.....	75
4.6.3 Expressão da AKT e ERK1/2	77
5 DISCUSSÃO.....	79
6 CONCLUSÃO.....	86
7 PERSPECTIVAS	87
REFERÊNCIAS	88

ANEXO.....110

1 INTRODUÇÃO

Peptídeos natriuréticos (PNs) constituem uma família de hormônios derivados do cérebro, coração, vasos e rins. Apresentam efeitos sobre o tônus, volume e remodelamento vascular, atividade neuro-hormonal, e metabolismo de energia, além de desempenhar um papel importante na manutenção da homeostase cardiovascular (NATHISUWAN E TALBERT, 2002; SCOTLAND, 2005; RUBATTU ET AL., 2008; WOODARD, 2008; MORO E LAFONTAN, 2013). São conhecidos e mais bem estudados três peptídeos endógenos: peptídeo natriurético atrial (PNA), peptídeo natriurético tipo B (PNB) e peptídeo natriurético tipo C (PNC).

Esses peptídeos são sintetizados na forma de pré-pró-hormônios, secretados de cardiomiócitos na forma de pró-hormônios, e subsequentemente são clivados em formas biologicamente ativas (POTTER; ABBEY-HOSCH; DICKEY, 2006). Para exercerem seus efeitos, os PNs podem interagir com três tipos diferentes de receptores de superfície celular: RPN-A, RPN-B e RPN-C, que apresentam diferentes localizações e afinidades aos PNs (MOGHTADAEI; POLINA; ROSE, 2016). O PNA e PNB atuam através de RPN-A e RPN-C, enquanto o PNC atua através de RPN-B e RPN-C (LEVIN, 1998; ARMALY, ASSADY, ABASSI, 2013). Através de RPN-A e RPN-B, esses PNs ativam a via da guanilil ciclase de membrana. Enquanto, através do RPN-C estes PNs são removidos da circulação (ARMALY, ASSADY, ABASSI, 2013), ou ainda podem se ligar as subunidades $G\alpha_i$, β e γ (ROSE; GILES, 2008) para ativar uma cascata de sinalização que leva a redução de AMPc e aumento de óxido nítrico (NO) (TOURKI et al., 2016; ANDRADE et al., 2014).

A ação fundamental dos PNs está em regular o volume extracelular e, para tanto, mecanismos vasculares, como o óxido nítrico são requeridos (ANAND et al., 2017). Esses efeitos se somam a ação no sistema nervoso central, onde no cérebro, os PNs inibem o apetite por sal e água (STELLAR; EPSTEI, 1991, MAHINRAD et al., 2016). Como resultado, os PNs protegem o organismo da retenção excessiva de sal e água, inibem a produção de peptídeos vasoconstritores, inibem a atividade simpática, promovem vasodilatação e são antiproliferativos (GUPTA; WANG, 2015). Portanto, suas ações levam a natriurese, devido a maior carga filtrada de solutos, particularmente sódio, e diminuição da pressão arterial por diminuir o volume plasmático e o débito cardíaco.

No que se refere ao metabolismo, a meia-vida dos PNs endógenos de mamíferos é curta, cerca de poucos minutos. Isso porque sofrem internalização celular e degradação lisossômica, subsequente à ligação ao RPN-C. E, além disso, são clivados por endopeptidases, como a neprilisina (NEP), que inativa os PNs por hidrolisar as ligações peptídicas e quebrar o anel, comum aos PNs, com 17 resíduos de aminoácidos. PNA e PNC, cujas cadeias N-terminal têm 6 e 5 aminoácidos, respectivamente são clivados pela NEP na posição *Cis*7-Fen8, no anel de 17 aminoácidos. Assim, a neprilisina os torna inativos, com meia-vida muito curta, cerca de 2-4 minutos (VINK et al., 2012). O PNB, que tem 9 aminoácidos na cadeia N-terminal, tem clivagem na posição Met5-Val6 e apresenta meia-vida significativamente mais longa, cerca de 20 minutos (PANKOW et al., 2009). O rápido metabolismo, aliado a possíveis alterações na via de sinalização intracelular, devido à internalização do RPN-A, podem ser responsáveis por redução da eficácia que caracteriza tolerância aos peptídeos endógenos (PANDEY, 2015).

Por outro lado, muitos PNs oriundos de répteis possuem caudas N- e C- terminais estendidas, o que confere maior resistência à hidrólise por NEP (CHEN; LAINCHBURY; BURNETT JR, 2002). Como no caso do NPCasca, isolado da serpente *Crotalus durissus cascavella* (EVANGELISTA, et al., 2008). Esse peptídeo contém 33 aminoácidos e mantém uma importante homologia do anel de 17 aminoácidos com os PNs humanos. *In vivo*, o NPCasca tem ação hipotensora e *in vitro*, em rim isolado, aumenta a fração de excreção de sódio (EVANGELISTA, et al., 2008). Baseado na sequência de aminoácidos do NPCasca, um peptídeo sintético, o NPCdc, foi sintetizado pela empresa GenOne, e em estudos iniciais apresentou efeitos diuréticos e natriuréticos semelhantes ao NPCasca (resultados não publicados). Ademais, o NPCdc também possui 9 aminoácidos na cadeia N-terminal, portanto, pode se tratar de um peptídeo natriurético promissor devido a uma maior meia-vida.

Alguns resíduos de aminoácidos, como Phe8 e Arg14 e a sequência C-terminal do PNA humano (OGAWA et al., 2004) e Phe7, Arg13 e Met17 do PNC humano (HE et al., 2001) são conservadas ao longo de todos os membros da família de PNs. Estes resíduos juntamente com a estrutura central em anel são críticos para a ligação ao receptor, sendo essenciais para os efeitos natriuréticos desejados via RPN-A, juntamente com a depuração mediada pelo RPN-C (MISONO et al., 1984, VINK et al., 2012). O NPCdc também possui resíduos conservados na região do anel dissulfeto, sendo representados por Phe11 e Arg17. Isto possivelmente sugere que o NPCdc tenha efeitos via receptor de peptídeos natriuréticos.

A ativação do RPN-A e RPN-B leva a um aumento de cGMP e ativação de proteína cinase dependente de cGMP (cGKI), responsável pelos efeitos cardioprotetores dos PNs (MANGIAFICO et al., 2013). A sGC, por outro lado, é ativada pelo NO que parece também exercer efeitos protetores no remodelamento do músculo cardíaco (HAMMOND; BALLIGAND, 2012), e na função renal, através de ações vasodilatadoras e anti-hipertensivas (KALK et al., 2006). Essa ação vasodilatadora é em parte devido à ativação de canais de potássio (K_{ATP}) no músculo liso (TANAKA et al., 1998). Embora o mecanismo de modulação exija uma elucidação, a relação entre a sinalização do peptídeo natriurético e K_{ATP} tem sido relatada (BURLEY et al., 2014, SANTOS, 2017). Na presença do NPCasca, a condutância de íons potássio foi alterada resultando em aumento da contratilidade da musculatura vascular (EVANGELISTA et al., 2008).

Diante do exposto, neste estudo foram investigados o NPCdc em relação aos seguintes aspectos: i) algumas características farmacocinéticas; ii) seus efeitos sobre parâmetros cardiorrenais em ratos com massa renal reduzida; iii) a sinalização intracelular deste peptídeo na aorta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS

2.1.1 Química, síntese e secreção

Peptídeos natriuréticos (PNs) constituem uma família de hormônios que apresentam estruturas semelhantes, com um anel formado através de uma ponte dissulfeto entre duas cisteínas. Foram identificados pela primeira vez em 1981, em ratos, nos quais foi demonstrada a secreção de substâncias diuréticas e natriuréticas pelo coração (DE BOLD et al., 1981). São conhecidos e mais bem estudados três peptídeos endógenos: peptídeo natriurético atrial (PNA), peptídeo natriurético tipo B (PNB) e peptídeo natriurético tipo C (PNC). Posteriormente, a urodilatina (URO) foi adicionada a esta família por ter ações semelhantes, embora seja encontrada apenas na urina (SCHULZ-KNAPPE; FORSSMANN; HERBST, 1998). Ademais, hormônios derivados de células intestinais, como a guanilina (GN) e uroguanilina (UGN) também compartilham semelhanças com os PNs, regulando o transporte tubular de sódio (KINOSHITA, H. et al., 1997; SINDIC, 2013) (Figura 1).

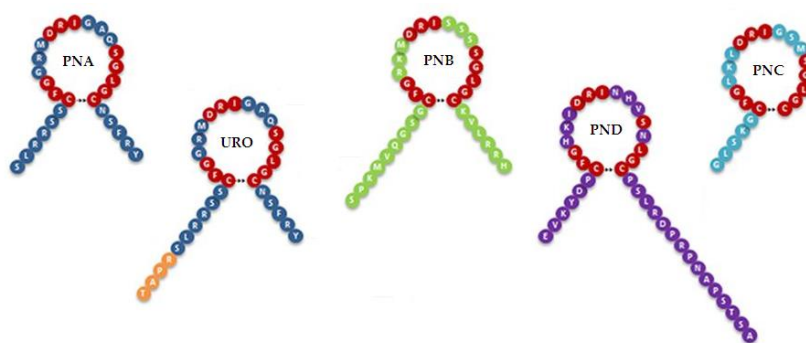


Figura 1 – Sequência de aminoácidos e estruturas da família dos peptídeos natriuréticos. PNA: peptídeo natriurético atrial; PNB: peptídeo natriurético cerebral; PNC: peptídeo natriurético tipo C; URO: urodilatina; PND: peptídeo natriurético da *Dendroaspis angusticeps*. Modificada de MEEMS; BURNETT, 2016).

Todos os PNs endógenos são sintetizados na forma de pré-pró-hormônios, armazenados na forma de pró-hormônio e posteriormente são clivados em formas biologicamente ativas (Figura 2).

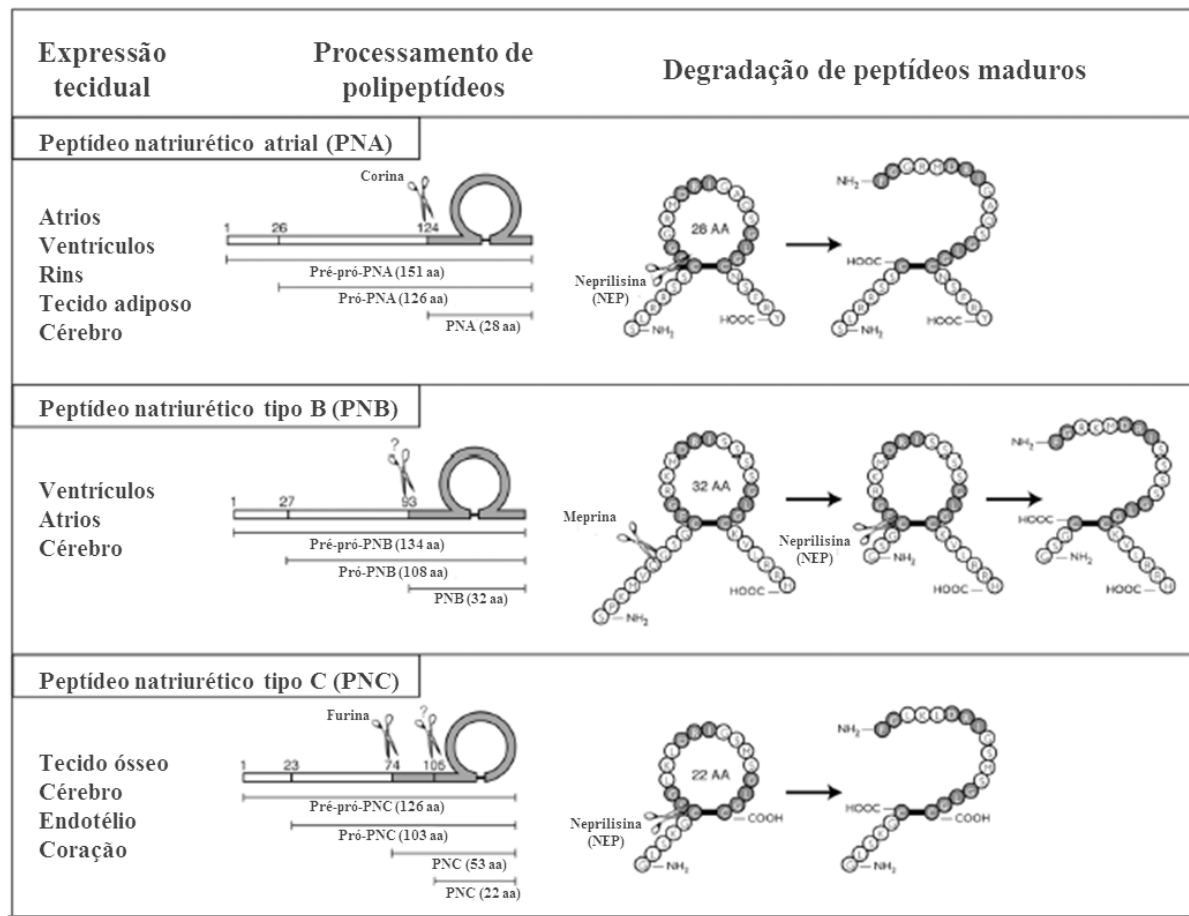


Figura 2 – Estrutura de pré-pró-hormônios, sequência final e sítios de clivagem para PNA, PNB e PNC. Os sítios de clivagem são indicados com tesouras. Modificada de POTTER et al., 2009.

O PNA é sintetizado como pré-pró-PNA (151 aminoácidos) e armazenado em grânulos secretores como pró-PNA (126 aminoácidos). Quando secretado, o pró-PNA é clivado pela corina, resultando no hormônio ativo com 28 resíduos de aminoácidos – PNA (POTTER et al., 2009). A transcrição gênica, bem como a secreção do PNA é estimulada por estiramento mecânico da parede atrial e ventricular devido à pressão transmural ou sobrecarga de volume (GERBES et al., 1994), e também afetados por idade, sexo, frequência cardíaca e função renal (WONG; GUO; ZHANG, 2017). O ventrículo normal produz pouco PNA, em contrapartida, em pacientes com insuficiência cardíaca (IC) há uma maior produção e liberação de PNA no plasma (FU et al., 2018).

Estruturalmente semelhante ao PNA, o PNB é um peptídeo de 32 aminoácidos que foi isolado primariamente de extratos cerebrais suínos. Os cardiomiócitos sintetizam o pré-pró-PNB (134 aminoácidos) que é clivado em pró-PNB (108 aminoácidos) e subsequentemente armazenado (POTTER et al., 2009). As endopeptidases, corina e furina são prováveis enzimas

envolvidas na clivagem do pró-PNB (CLERICO; VITTORINI; PASSINO, 2012). Durante a secreção dos cardiomiócitos, o pró-PNB é dividido na proporção de 1:1 no PNB fisiologicamente ativo (32 aminoácidos) que corresponde ao fragmento C-terminal, e o fragmento N-terminal biologicamente inativo NT-pró-PNB (76 aminoácidos) (FU et al., 2018). Em pacientes com IC, a relação NT-pró-PNB/PNB está elevada em resposta a um aumento da sobrecarga ventricular a atrial destes pacientes (NISHIKIMI et al., 2010).

Como o PN mais abundante no cérebro, o PNC também é sintetizado no átrio, ventrículo e endotélio. A estrutura em anel do PNC é homóloga ao do PNA e PNB, porém a extensão do terminal carboxil é ausente. O pré-pró-PNC (126 aminoácidos) é convertido a pró-PNC (103 aminoácidos) após a clivagem dos primeiros 23 aminoácidos. Após a secreção, o PNC é clivado pela furina e processado para PNC-53 (53 aminoácidos) e/ou PNC-22 (22 aminoácidos) cujas potências são equivalentes (WU et al., 2003). Embora o PNC-53 e PNC-22 possuam atividade e função similares, PNC-53 predomina no coração, no endotélio e no cérebro, enquanto o PNC-22 predomina no líquido cefalorraquidiano e plasma (WU et al., 2003). Assim como PNA e PNB, a expressão do PNC é regulada positivamente pelo estiramento mecânico.

2.1.2 Receptores e metabolismo

Para exercerem seus efeitos, os PNs podem interagir com três diferentes tipos de receptores de superfície celular: RPN-A, RPN-B e RPN-C (Figura 3). RPNs apresentam diferentes localizações e afinidades aos PNs (GUPTA; WANG, 2015). O PNA e PNB atuam através de RPN-A e RPN-C, enquanto o PNC atua através de RPN-B e RPN-C (LEVIN, 1998; ARMALY, ASSADY, ABASSI, 2013).

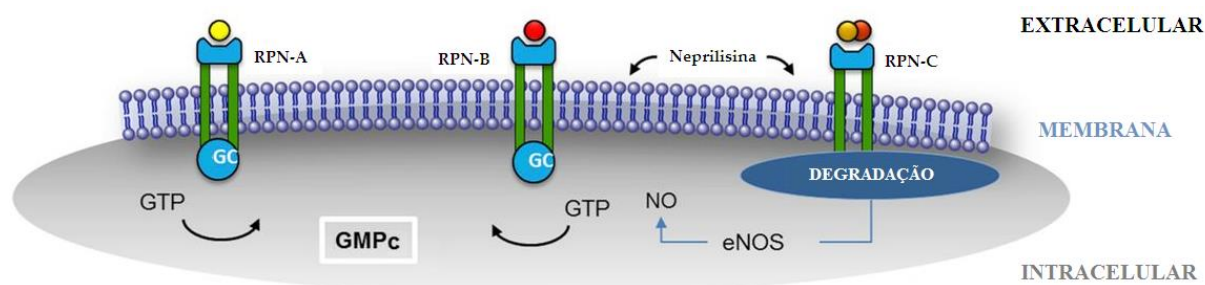


Figura 3 – Receptores para os peptídeos natriuréticos RPN-A, RPN-B e RPN-C. cGMP = guanosina monofosfato cíclico; eNOS = óxido nítrico sintase endotelial; GTP = guanosina-5'-trifosfato; NO = óxido nítrico; RPN = receptor PN. Modificada de MEEMS; BURNETT (2016).

Através do RPN-A e do RPN-B, esses PNs ativam a via da guanilil ciclase (GC) de membrana e por intermédio do RPN-C inibem a adenilil ciclase (AC), através da subunidade alfa da proteína Gi, e ativação da fosfolipase C (MATSUKAWA et al., 1999, POTTER, 2005). O RPN-C também é alvo de ligação e de efeitos fisiológicos da GN e UGN (ARMALY, ASSADY, ABASSI, 2013) e sua potencial atividade biológica é tido principalmente como a capacidade de se ligar preferencialmente ao PNC em relação ao PNA ou PNB (RUBATTU et al., 2008). Além disso, por não possuir o domínio intracelular de GC, o RPN-C atua como um receptor de depuração, removendo os PNs da circulação.

A meia-vida dos PNs endógenos de mamíferos é curta, cerca de poucos minutos, pois sofrem internalização celular e degradação lisossômica. O tempo de meia-vida do PNA no plasma humano é de aproximadamente 2 min (YANDLE et al., 1986), semelhante ao do PNC (HUNT et al., 1994). Já o PNB tem uma meia-vida mais longa do que o PNA, cerca de 20 minutos (MUKOYAMA et al., 1991). Essa disparidade refere-se às diferentes afinidades de ligação dos PNs ao RPN-C (SUGA et al., 1992).

Além disso, os PNs são clivados por endopeptidases, como a neprilisina (NEP). A NEP é uma metaloendopeptidase de zinco, com 94 kDa, localizada na superfície celular. Ela tem funções de uma ectoenzima, catalisando a hidrólise de peptídeos na face extracelular da membrana plasmática (TURNER; ISAAC; COATES, 2001). Essa enzima foi inicialmente isolada da borda em escova de membranas do rim (KERR; KENNY, 1974), e subsequentemente encontrada em vários tecidos, incluindo o sistema nervoso central (ERDOS; SKIDGEL, 1989). Além disso, a NEP está presente na urina de humanos (DI MARCO et al, 1998, CSARINI et al, 1992) e de ratos (KURIBAYASHI et al, 1993).

A NEP inativa os PNs por hidrolisar as ligações peptídicas e quebrar o anel, comum aos PNs, com 17 resíduos de aminoácidos. A afinidade da NEP é variável quanto aos peptídeos endógenos, apresentando uma menor afinidade por peptídeos com terminais amina e carboxílicos longos (VINK et al, 2012). PNA e PNC, cujas cadeias N-terminal têm 6 e 5 aminoácidos, respectivamente são clivados pela NEP na posição Cis7-Fen8, no anel de 17 aminoácidos. Assim, a NEP os torna inativos, com meia-vida muito curta, cerca de 2-4 minutos (VINK et al., 2012). O PNB, que tem 9 aminoácidos na cadeia N-terminal, tem clivagem na posição Met5-Val6 e apresenta meia-vida significativamente mais longa em torno de 20 min (SMITH et al., 2000, PANKOW et al., 2009). O rápido metabolismo, aliado a possíveis alterações na via de sinalização intracelular, devido à internalização do RPN-A,

podem ser responsáveis por redução da eficácia que caracteriza tolerância aos peptídeos endógenos (PANDEY, 2015).

Peptídeos com atividade natriurética já foram identificados em várias espécies de animais, plantas e mais recentemente, seres procariontes (VINK et al, 2012). Entre os mamíferos a sequência do anel de 17 aminoácidos é relativamente similar. Essa semelhança também acontece em répteis, porém com a vantagem de apresentarem terminais amina e carboxila longos, o que lhes confere uma maior estabilidade. Como exemplo, o peptídeo natriurético da *Dendroaspis* (PND) originalmente isolado do veneno da Mamba verde (*Dendroaspis angusticeps*), e posteriormente identificado em humanos (SCHIRGER et al., 1999), cães (LISY et al., 2001), ratos e coelhos (CAI et al., 2008). O PND apresenta 38 resíduos de aminoácidos, contendo um anel dissulfeto com 17 aminoácidos, estrutura similar a dos PNs humanos (Figura 1), com a vantagem de possuir terminais amino e carboxílico alongados (SCHWEITZ et al., 1992), o que o torna resistente à degradação da NEP (CHEN; LAINCHBURY; BURNETT, 2002).

Além da semelhança estrutural, o PND também compartilha efeitos fisiológicos similares aos PNs humanos via RPN (SCHWEITZ et al., 1992). Os efeitos biológicos resultantes da ligação dos PNs aos seus receptores estão relacionados à ativação de vias que modulam canais iônicos, fosforilação de proteínas, translocação nuclear e expressão gênica (KERKELÄ; ULVILA; MAGGA, 2015). Essas vias incluem a ativação de GC, um grupo de proteínas que possuem uma função enzimática comum, a produção de cGMP, mas diferem quanto a sua seletividade na ativação por ligantes (WALDMAN; MURAD, 1987). Essa enzima é encontrada em duas formas principais, particulada (pGC) e solúvel (sGC). A ativação da forma particulada se dá em resposta aos PNs e às guanilinas, que atuam como agonistas para os RPNs, produzindo ações biológicas através desta ligação. Já a ativação da forma solúvel ocorre em resposta ao óxido nítrico, um potente vasodilatador (ARNOLD et al., 1977, DANIELS; MAISEL, 2007, KUHN, 2004).

2.2 SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

2.2.1 Óxido nítrico

Os níveis de NO vascular são controlados pela taxa de geração e de metabolismo. A maior parte do NO produzido nas células endoteliais é realizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir da conversão de L-arginina a L-citrulina na célula endotelial. Existem três isoformas de NOS: as isoformas neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), que são constitutivas e reguladas pela concentração de cálcio intracelular, e a isoforma induzida (iNOS), que é independente do transiente de cálcio. A atividade enzimática da NOS tem como fatores regulatórios a disponibilidade de substrato e de cofatores, assim como a taxa de transferência de elétrons. Esses substratos e cofatores que controlam a atividade da NOS também se encontram envolvidos em outras vias metabólicas dentro das células, portanto, unindo a atividade da NOS com outros processos metabólicos. Em presença de cofatores, como NADPH, tetrahidrobiopterina (BH₄), flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) e flavina-mononucleotídeo (FMN), a atividade da NOS é dependente da disponibilidade de arginina e oxigênio molecular (ANDREW; MAYER, 1999).

Uma vez produzido, o NO se difunde rapidamente, devido ao seu pequeno peso molecular e as suas características de solubilidade, para a célula do músculo liso vascular estimulando a sGC, que por sua vez produz um segundo mensageiro: guanosina monofosfato cíclico (cGMP) que ativa proteínas cinases dependentes de cGMP (cGKI ou PKG), levando ao relaxamento do músculo liso (IGNARRO et al., 1999). Ademais, o NO é capaz de produzir vasodilatação em diversos leitos vasculares, através de mecanismos que implicam na diminuição da concentração de cálcio citosólico, ou ainda pode ativar diretamente proteínas e canais iônicos para promover vasodilatação (KERR et al., 2012). Tem sido estabelecido que níveis diminuídos de NO e redução da capacidade antioxidante nos vasos, coração, cérebro e rins pode ter um papel crucial na patogênese e manutenção da hipertensão arterial (PINHEIRO; TANUS-SANTOS; CASTRO, 2017).

É sabido que humanos com hipertensão essencial (GKALIAGKOUSI et al., 2015) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (ANISHCHENKO et al., 2015) apresentam prejuízos na vasodilatação dependente do endotélio quando comparados com controles normais. Essa menor vasodilatação deve-se, em parte, a uma disfunção endotelial, a qual está associada a menor biodisponibilidade de NO.

Por outro lado, a ativação da via do NO está envolvida no efeito hipotensor do PNA e em parte com as ações cardiovasculares e renais desse peptídeo (COSTA et al., 2004). No rim, o NO é produzido em vários segmentos do néfron, com isso há uma liberação local de NO para o controle da hemodinâmica renal e modulação do feedback tubuloglomerular (CARLSTRÖM; WILCOX; ARENDSHORST, 2015). Uma alteração na produção de NO no rim pode estar envolvida com a progressão da doença renal. No entanto, o metabolismo do NO na DRC não é bem compreendido. É sabido que em ratos com DRC há uma redução significativa de metabólitos do NO (BAYLIS, 2008), e diminuição na expressão proteica das NOS no rim e na aorta e no rim remanescente (KIM et al., 2000). Além disso, efeitos do PNC em microvasos renais, promovendo dilatação das arteríolas aferentes via prostaglandina e NO foram relatados (AMIN; CARRETERO; SADAYOSHI, 1995). Esse achado foi corroborado por outros autores que encontraram uma estreita relação entre a expressão de iNOS e PNC no músculo liso vascular celular (MARUMO, 1995).

A cascata de sinalização do PN/pGC/cGMP e a via NO/sGC/cGMP regulam a função renal direcionando os vasos sanguíneos renais e as células musculares lisas vasculares, impactando na inervação renal (KRISHNAN et al., 2018). Alterações nessas vias resulta na diminuição dos níveis de cGMP, o que pode comprometer a vasodilatação e contribuir para fisiopatologia da hipertensão (BUYS et al., 2012).

2.2.2 cGMP/cGKI

O NO e o cGMP estão envolvidos em muitos processos fisiológicos como o relaxamento de células do músculo liso, apoptose, proliferação, migração, e produção de matriz extracelular (MCDONALD; MURAD, 1995). Além disso, a via de sinalização NO/cGMP é um modulador da pressão arterial. Alterações nessa via, seja por deleção genética, bloqueio farmacológico ou aumento do estresse oxidativo pode levar ao desenvolvimento de hipertensão (HERMANN; FLAMMER; LÜSCHER, 2006).

Após ativação por NO, o cGMP é gerado através da sGC que converte o GTP em cGMP. Outra via de geração do cGMP consiste de uma família de pGC que atuam acopladas aos RPNs. O cGMP produzido ativa uma importante proteína efetora, a proteína cinase dependente de cGMP (cGKI), que é responsável por mediar os efeitos do cGMP no relaxamento da musculatura lisa vascular (WALFORD; LOSCALZO, 2003; BRYAN; BIAN;

MURAD, 2009). O gene que codifica a cGKI é expresso em células do músculo liso vascular, e sua deleção tem sido relacionada a múltiplos fenótipos, incluindo pressão arterial elevada (HOFMANN et al., 2006).

Tendo em vista as ações dessa via em processos fisiopatológicos, a cGKI torna-se um alvo interessante para o desenvolvimento de medicamentos terapêuticos para tratar doenças cardiovasculares e renais (HOFMANN et al., 2009). Os efeitos subjacentes as vias NO/cGMP e PNs/cGMP são bem estudados e elucidados, no entanto, a sinalização da cGKI é complexa e pode regular e ser regulada por outras proteínas intracelulares, como as proteínas cinases ERK1/2 (SCHINNER et al., 2017) e AKT (LOPES-PIRES et al., 2015).

2.2.3 ERK1/2

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são atores-chave na transdução de sinais extracelulares de receptores ativados localizados na membrana plasmática, para vários compartimentos celulares, como o núcleo. MAPKs são serina/treonina cinases, que regulam positivamente ou negativamente a atividade de seus substratos, levando assim a diferentes respostas celulares. Assim, elas regulam a ativação da transcrição gênica, síntese de proteínas, proliferação, diferenciação, migração, senescência e apoptose celular (PETI; PAGE, 2013). Três subfamílias de MAPK foram bem caracterizadas: cinase 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), c-jun N-terminal cinase (JNK) e p38-MAPK. A ERK1/2 está envolvida no crescimento celular (SUN et al., 2015), enquanto a p38-MAPK e a JNK estão associadas com resposta celular ao estresse, inflamação e mediadores vasoativos, como a endotelina-1 (ET-1) (CUADRADO A, NEBRED A, 2010, CARGNELLO; ROUX, 2011).

As proteínas ERK1 (p44) e ERK2 (p42) são os principais componentes e são tipicamente designadas de ERK1/2. Apesar do efeito sobre os eventos transcricionais, vários trabalhos sugeriram um papel importante da ERK1/2 na sinalização endotelial através da fosforilação direta da eNOS (BARAUNA et al., 2013, SALERNO et al., 2014, WANG et al., 2014). A regulação de ERK1/2 e consequente modulação da eNOS tem sido proposta como um evento importante em complicações vasculares de algumas patologias cardiovasculares, como hipertensão, aterosclerose e diabetes (TAGUCHI et al., 2012). No entanto, a nNOS e a iNOS também podem ser reguladas pela ERK1/2 (CHOW et al., 2012, KORKMAS et al., 2011).

Classicamente, a fosforilação e ativação de ERK 1/2 está associada à proliferação celular, como é observada em células musculares lisas vasculares em resposta a vários mitógenos, incluindo ET-1 e angiotensina II (AngII) (WATANABE et al., 1996; YOSHIZUMI et al., 1998). Por outro lado, a modulação da expressão da ERK1/2 por PNs é controversa. Alguns trabalhos mostram que os PNs agem regulando negativamente a expressão da ERK1/2 via RPN-A (O'TIERNEY et al., 2010). Ou então, promovendo sua fosforilação via receptor RPN-C, resultando em proliferação aumentada de células endoteliais e inibição do crescimento do músculo liso vascular, o que está relacionado a um efeito vasoprotetor por parte do PNC (KHAMBATA; PANAYIOTOU; HOBBS, 2011). Embora a cascata ERK1/2 seja uma via de transdução de sinal central na célula, o mesmo estímulo também pode ativar outras cascatas, como as vias do TGF- β (SCHINNER et al., 2017), NF- κ B (MEZZASOMA; ANTOGNELLI; TALESA, 2017) e PI3K-AKT (ZIMMERMANN et al., 1999). Essas cascatas podem interagir entre si e modular a sinalização pela fosforilação entre as cascatas, por efeitos combinatórios em alvos subjacentes, ou por modulação da atividade.

2.2.4 AKT

Além da ERK, os sinais derivados de PI3K também são necessários para o aumento da proliferação de cardiomiócitos após ativação de RPN pelo PNA (SUNDGREN et al., 2003, KATO et al. 2005, ZHAO; LI; PENG, 2015). A PI3K converte fosfatidilinositol- 4,5-bifosfato para fosfatidilinositol- 3,4,5-trifosfato, que estimula a fosforilação da serina-treonina cinase AKT pela cinase dependente de fosfoinosítídeo. A AKT fosforilada ativa várias vias de sinalização dentro do cardiomiócito, afetando o metabolismo e o crescimento celular (MATSUI et al., 2003). A ativação aguda de mTOR por PI3K e AKT pode melhorar a sobrevivência dos cardiomiócitos através de síntese proteica. Contudo, a ativação crônica da sinalização cardíaca de AKT/mTOR pode causar hipertrofia (KEMI et al., 2008) e, assim, a inibição da mTOR pode servir como um possível caminho para retardar a hipertrofia cardíaca patológica (ZHANG; XU; REN, 2013).

Por outro lado, é sabido que AKT inibe a formação de proteínas proapoptóticas, Bax, Bad e caspase (ZHANG et al., 2013) e aumenta a formação de óxido nítrico através da eNOS (YU; GAO; MA, 2011). Portanto, a cascata de sinalização da PI3K/AKT pode contribuir para o recrutamento de múltiplas vias cardioprotetoras endógenas para reduzir o dano miocárdico após isquemia e reperfusão (TANG et al., 2017, XUE et al., 2017). A via PI3K/AKT também

está envolvida com a proliferação de células do músculo liso vascular (LIU et al., 2010). A proliferação desordenada dessas células, em paralelo a uma menor produção de NO vascular pode ser um evento chave na aterosclerose (BENNETT; SINHA; OWENS, 2016).

Distúrbios cardiovasculares, como hipertensão e doença renal associada estão inter-relacionados sugerindo vias patológicas comuns. O estresse oxidativo e a função comprometida das enzimas NOS levam a uma disfunção endotelial e redução da biodisponibilidade do NO (KONUKOGLU; UZUN, 2017). Novas estratégias que corrigem esse desequilíbrio redox e aumentam a bioatividade do NO podem ter implicações clínicas importantes. A via de sinalização PI3K/AKT também pode ser modulada por espécies reativas de oxigênio (LESLIE; DOWNES, 2002, MURATA et al., 2003). A atenuação do estresse oxidativo e ativação da via PI3K/Akt/eNOS além de melhorar o relaxamento da aorta torácica, preveniu a disfunção endotelial vascular em ratos espontaneamente hipertensos (GU et al., 2016).

PNs podem agir como moduladores da via de sinalização PI3/Akt por PNs (ANAND-SRIVASTAVA, 2005, HUANG et al., 2006). Hashim et al. (2006) demonstraram que o PNA inibiu a proliferação estimulada por AngII por inibir a fosforilação de ERK e AKT em células de músculo liso vascular de ratos. Breivik et al. (2015) relataram que ao utilizar isatin, um inibidor não seletivo de RPN, a fosforilação de AKT foi abolida. Demonstrando assim que os efeitos cardioprotetores induzidos por PNB eram dependentes de AKT e mediados pela via RPN-C/pGC/cGMP.

A ativação de RPNs leva a um aumento de cGMP e ativação de cGKI, via que é responsável pelos efeitos cardioprotetores dos PNs (MANGIAFICO et al., 2013). A sGC, por outro lado, é ativada pelo NO que também parece exercer efeitos protetores no remodelamento do músculo cardíaco (HAMMOND; BALLIGAND, 2012), e na função renal, através de ações vasodilatadoras e anti-hipertensivas (KALK et al., 2006). Essa ação vasodilatadora é em parte devido à ativação de canais de potássio (K_{ATP}) no músculo liso (TANAKA et al., 1998). Embora o mecanismo de modulação exija uma elucidação, a relação entre a sinalização do peptídeo natriurético e K_{ATP} tem sido relatada (Figura 4) (BURLEY et al., 2014, SANTOS, 2017).

apresentaram uma redução na PAM e aumento do hematócrito após infusão com extrato atrial. Experimentos subsequentes em ratos com redução de massa renal, também demonstraram que a infusão de PNA atenuou a elevação PAM, diminuiu volume plasmático e aumentou hematócrito (ALMEIDA; SUZUKI; MAACK, 1986). Além disso, em humanos normotensos, a infusão de PNA aumentou a permeabilidade dos capilares promovendo um extravasamento de fluido do sistema circulatório. Essa diminuição do volume plasmático contribui para diminuição do débito cardíaco e consequentemente da PAM (WIJEYARATNE; MOULT, 1993).

O efeito hipotensivo do PNA é atribuído a uma diminuição no débito cardíaco e na resistência periférica total, o PNA dilata os vasos de resistência renal bem como vasos de resistência sistêmicos (NAGUIB; CONTANT; CUPPLES, 1994). Por outro lado, a diurese e natriurese induzidas pelo PNA são atribuídas ao aumento da filtração glomerular (FG) e inibição da reabsorção tubular de sódio (HIRATA et al., 1985). Em paralelo as ações renais e vasculares, os PNs são também antagonistas do tônus simpático. Um efeito inibitório na atividade das fibras pós-ganglionares simpáticas após administração do PNA (FLORAS, 1995) comprova sua ação na atenuação da atividade simpática, contribuindo para a diminuição da vasoconstrição sistêmica e diminuição da PAM.

Tradicionalmente a hipertensão é em grande parte dependente da retenção de fluido, embora haja um papel conhecido do sistema nervoso simpático que a princípio pode ser anulado pelos barorreceptores (ABUZINADAH et al., 2016). A atividade dos nervos renais estimula a secreção de renina do aparelho justaglomerular, promovendo a absorção tubular renal do sódio e vasoconstrição renal, o que reduz o fluxo sanguíneo renal (FSR) e eleva a PAM (KOEPEKE; DIBONA, 1985). A elevação da PAM ou da pressão de perfusão na artéria renal resulta em um rápido aumento da excreção renal de água e sódio pelos rins, denominado natriurese pressórica. Com isso, o débito cardíaco e a pressão arterial são diminuídos (ZATZ, 2002). A deficiência nesse processo pode ser considerada um componente central no desenvolvimento da hipertensão. A hiperatividade simpática na insuficiência renal crônica é causada por mecanismos neuro-hormonais que surgem no rim. A desnervação renal ajuda a promover a excreção urinária de sódio e reduzir os níveis pressóricos (AUGUSTYNIAK, et al., 2002).

Por outro lado, o PNA também via cGMP, aumenta a natriurese inibindo diretamente a liberação de renina das células justaglomerulares, e diminuindo a síntese e liberação de

aldosterona (KURTZ et al., 1986). Outro efeito do PNA é inibir a liberação de vasopressina impedindo a reabsorção de água no néfron distal (MATSUKAWA; MIYAMOTO, 2011), e nos ductos coletores impedir a ação da vasopressina no seu receptor V2 (INOUE; NONOGUCHI; TOMITA, 2001).

2.4 REGULAÇÃO HIDROELETROLÍTICA

Tendo em vista que a manutenção dos níveis plasmáticos de alguns íons é um requisito fundamental para o dinamismo celular, o controle rigoroso entre reabsorção e excreção hidroeletrolítica é crucial para o equilíbrio dos fluídos corporais e manutenção dos níveis pressóricos (ESTEVA-FONT; BALLARIN; FERNÁNDEZ-LLAMA, 2012). Assim, concentrações séricas de sódio e potássio, por exemplo, são mantidas no organismo dentro de estreita variação sendo determinantes para o volume de fluido extracelular. O balanço desses íons é controlado por mecanismos fisiológicos que atuam dinamicamente. São estes dependentes da atividade nervosa simpática, ou do SRAA e de peptídeos natriuréticos.

Nos rins, o mecanismo básico para o transporte de íons está basicamente ligado à atividade de uma ATPase presente na membrana basolateral do túbulo proximal renal, a Na^+/K^+ -ATPase sensível a ouabaína. Esta enzima garante a reabsorção ativa de Na^+ e secreção de K^+ , à custa da hidrólise do ATP (FERRAILLE; DOUCET, 2001; LIU et al., 2015). Os gradientes gerados pela atividade desta enzima fornecem a força motriz para outros processos de transporte, como o transporte ativo secundário de vários solutos, tais como aminoácidos, vitaminas, fosfato, glicose, entre outros (SWEENEY; KLIP, 1998) e o próprio transporte de sódio a favor do gradiente de concentração. Mais recentemente, outra ATPase foi identificada na membrana basolateral do túbulo proximal renal, Na^+ -ATPase resistente a ouabaína e sensível a furosemida (ROCAFULL et al., 2011). Essa ATPase está envolvida no ajuste fino da reabsorção de Na^+ nesse segmento do néfron (DIAS et al., 2014).

Em contraste, a entrada apical de sódio é exercida por diferentes transportadores. No túbulo proximal e no ramo ascendente espesso da alça Henle, o trocador iônico Na^+/H^+ tipo 3 (NHE3) utiliza o gradiente de Na^+ criado pela Na^+/K^+ -ATPase para impulsionar a secreção de H^+ . Juntamente com o cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2) são os principais responsáveis pela reabsorção de sódio no ramo ascendente espesso da alça de Henle. Já no túbulo distal, o sódio é reabsorvido principalmente através do cotransportador Na-Cl (NCC). E na porção

final do néfron, no ducto coletor ocorre o ajuste fino da reabsorção de sódio e água. Através de canais de sódio epitelial (ENaC), o sódio atravessa a membrana plasmática apical a favor do seu gradiente eletroquímico, e é transportado ativamente para o espaço intersticial pela Na^+/K^+ -ATPase basolateral. A entrada e a saída de sódio induzem variações na concentração intracelular de sódio e no volume celular. Portanto, o transporte de sódio apical e basolateral são altamente coordenados nas células epiteliais renais (FERAILLE; DIZIN, 2016).

A taxa de transporte de sódio é regulada por mecanismos e substâncias endógenas em resposta à ingestão dietética de sódio, filtração glomerular, hormônios circulantes, sinais neurais e fatores reguladores locais. Diante de alteração do volume celular, proteínas com funções enzimáticas e transportadoras no rim também podem ter sua atividade alterada. Como na hipertensão associada ao diabetes, a Na^+ -ATPase tem sua atividade modulada por substâncias como leptina, EROs, nucleotídeos cíclicos e NO (BELTOWSKI et al., 2007).

O cGMP está envolvido na fosforilação de várias proteínas de transporte de íons (KOURIE; RIVE, 1999). As ações natriuréticas e diuréticas dos PNs, subsequente à ativação do cGMP modulam a reabsorção de sódio no rim (ZEIDEL, 1990). Algumas das ações dos PNs na manutenção do balanço de água e sal incluem uma ação direta e estimulatória através da ativação de aquaporinas, canais de água presentes na membrana basolateral dos túbulos renais, e inibição do trocador Na^+/H^+ em diferentes tipos celulares (WINAVER et al., 1990). Por outro lado, o ENaC das células principais do ducto coletor tem sua expressão regulada primariamente pela aldosterona, mas já é sabido que outros hormônios, como a insulina também modulam esse canal (BLAZER-YOST; LIU; HELMAN, 1998). RPNs acoplados a guanilil ciclases são expressos na membrana apical de células renais, inclusive nos segmentos distais dos néfrons. A modulação do ENaC pelo PNA é dependente de cGMP e esse mecanismo envolve a ativação de NPR-A (GUO et al., 2013).

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Ademais, espécies reativas de oxigênio (EROs) podem modular a atividade de várias proteínas, incluindo transportadores iônicos em vários segmentos do néfron (SCHRECK; O'CONNOR, 2011). Uma diminuição na atividade da Na^+/K^+ -ATPase por EROs foi observada em células tubulares renais de ratos que sofreram obstrução ureteral unilateral, um modelo de DRC (LIU et al., 2015). Em uma situação distinta, o aumento na produção de

EROs na placenta de mães desnutridas, promove alterações no transporte de sódio proximal da prole (VIEIRA-FILHO et al., 2009). Essas evidências reforçam a importância de uma sinalização adequada de EROs dentro do epitélio tubular para manutenção da homeostase iônica corporal.

O estresse oxidativo foi originalmente descrito como um desequilíbrio entre a produção de EROs e defesas antioxidantes. Trata-se de um fenômeno importante em processos de defesa contra patógenos. Durante o ciclo de EROs podem ser gerados ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O ânion superóxido pode ser gerado pela redução incompleta de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons, bem como pela ação enzimática da NADPH oxidase. Em contrapartida, para manter o equilíbrio entre a produção de EROs, a enzima superóxido dismutase (SOD) rapidamente catalisa a dismutação de ânion superóxido em O_2 e H_2O_2 (DE VITO et al., 2009).

Em células fagocíticas, a NADPH oxidase é uma enzima importante na defesa contra patógenos. Sua presença em outras células está correlacionada com processos biológicos, incluindo o desenvolvimento, diferenciação, senescência celular e apoptose (CHAN et al., 2009). Em condições fisiológicas, a NADPH oxidase clássica expressa em neutrófilos consiste em componentes de membrana plasmática tais como o flavocitocromo B_{558} e dois polipeptídios de 22 kDa ($p22^{phox}$) e 91 kDa ($gp91^{phox}$, também denominado NOX2), e subunidades citosólicas livres incluindo 47 kDa ($p47^{phox}$), 67 kDa ($p67^{phox}$) e 40 kDa ($p40^{phox}$). Após a ativação, os componentes citosólicos são translocados para a face interna da membrana plasmática para formar o complexo ativo da enzima totalmente completo que inclui também duas proteínas G, a Rap e p21rac (Figura 5) (BEDARD et al., 2007, MCCANN et al., 2013.).

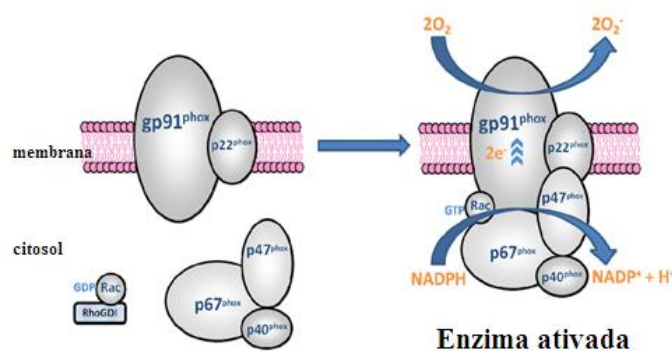


Figura 5 – Representação esquemática da ativação da NADPH oxidase em fagócitos. Modificada de MCCANN et al., 2013.

Outras NADPH oxidases não fagocíticas foram identificadas como isoformas de NOX em células de mamíferos: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 E DUOX2. Todos os membros da família NOX/DUOX compartilham a capacidade de transportar elétrons através da membrana e reduzir oxigênio à superóxido (NOX1, NOX2, NOX3, NOX5) e H_2O_2 (NOX4, DUOX1 e DUOX2), porém o mecanismo de ativação descrito acima e a distribuição tecidual entre eles é diferente (BEDARD et al., 2007).

No rim, pelo menos três isoformas diferentes de NOX são expressas no córtex renal: NOX4, NOX2 e NOX1 (KITADA et al., 2003; GRANGER; KVIETYS, 2015; JOSHI et al., 2013; LIU et al., 2015). A NOX4 é a isoforma predominantemente expressa no epitélio tubular, mas em níveis menores também é encontrada em outros tipos celulares, incluindo as células mesangiais glomerulares e podócitos (LIU et al., 2015; JOSHI et al., 2013). As funções propostas das EROs derivados da NOX no rim compreendem a regulação do fluxo sanguíneo renal e a regulação da expressão de genes (GRANGER; KVIETYS, 2015). Porém a geração excessiva de EROs pode estar envolvida na fisiopatologia de doenças renais e cardiovasculares, como hipertensão e ICC (LI et al., 2002).

Por outro lado, o PNA tem ações em diversos órgãos, e sua participação na regulação do crescimento e da proliferação celular pode estar associada à geração de EROs (DE VITO et al., 2009). A ativação da expressão de NOX4 em células endoteliais leva a disfunção e lesão endotelial (GUO; CHEN, 2015), danos que podem ser prevenidos pela ativação do RPN-C em ratos SHR (SAHA et al., 2008). Adicionalmente, PNA melhora a função endotelial de ratos diabéticos por atenuar o estresse oxidativo vascular (WOODMAN et al., 2008). Em pacientes com ICC, a ação antioxidante de um PNA sintético humano, carperitide, foi comprovada pela diminuição dos níveis de ânion superóxido em cardiomiócitos, refletindo em efeitos hemodinâmicos benéficos (IDE et al., 2000). A ação frente ao estresse oxidativo também foi evidenciada pela carperitide em experimentos *in vitro*, onde a expressão de enzimas envolvidas no estresse oxidativo foi inibida (SHONO et al., 2007). Assim, em concentrações farmacológicas o PNA pode prevenir os danos celulares causados pelas EROs por mecanismos envolvidos com a via do RPN-A e cGMP (BILZER et al., 1999, CARINI et al., 2003).

Considerando que compostos ativadores da GC sabidamente possuem propriedades antifibróticas nos rins (WANG et al., 2006), o aumento da produção de superóxido também contribui para disfunção celular, uma vez que compromete a via do cGMP e induz disfunção

endotelial (MÜNZEL, 2003). Embora exista uma correlação entre níveis aumentados de EROs e peptídeos natriuréticos, poucos são os estudos e evidências acerca desta correlação e dos mecanismos envolvidos. EROs são essenciais para a função celular normal, e quando exacerbados contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão (LOPERENA; HARRISON, 2017). Em ratos SRH existe uma correlação positiva entre níveis elevados de estresse oxidativo e expressão aumentada de proteínas envolvidas na patogênese da hipertensão, $G_{i\alpha}$ e adenilato ciclase (LAPPAS; DAOU; ANAND-SRIVASTAVA, 2005). Por outro lado, a ativação do RPN-C atenua níveis pressóricos em ratos SRH, através da supressão de proteínas G_i e estresse nitroxidativo (LI et al., 2014).

Sabidamente PNs têm um papel importante na função cardiorrenal, e como evidenciado nos estudos supracitados, também agem como antioxidantes. A proteção tecidual conferida a esses peptídeos reforça o potencial para ser utilizados como agente terapêutico no tratamento de complicações cardiovasculares, incluindo hipertensão.

2.6 PEPTÍDEOS HIPOTENSORES OBTIDOS DE VENENOS OFÍDICOS

Por se tratar de uma doença crônico-degenerativa que afeta o sistema cardiovascular, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma das mais importantes causas de mortes em todo o mundo. É sabidamente uma doença de alta prevalência na população, sendo considerado um grave problema de saúde pública por sua magnitude, risco e dificuldades no seu controle (RONCO; DI LULLO, 2017).

Segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão, é considerado hipertenso, o paciente que tem a pressão arterial sistólica (PAS) superior a 140 mmHg e/ou a pressão arterial diastólica (PAD) maior que 90 mmHg. Na maioria dos casos, desconhece-se a causa da hipertensão, é a chamada hipertensão primária, também conhecida como hipertensão arterial essencial (GARFINKLE, 2017). Em contraste, todas as demais formas de hipertensão, chamadas secundárias, estão associadas a outras patologias como obesidade (SERAVALLE; GRASSI, 2017) e insuficiência renal crônica (WEBSTER et al., 2017). Ou ainda, formas conhecidas e compreendidas, como o envelhecimento (PARIKH, 2017) e a gravidez (JACKSON; GREGG, 2017).

O tratamento adequado dos pacientes hipertensos ajuda a manter a qualidade de vida e evitar possíveis danos e complicações. No entanto, apenas uma parcela desses pacientes

consegue manter níveis adequados de pressão arterial. Isso reflete não apenas a adesão ao tratamento, mas principalmente os diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos (SARTORI et al., 2004). Por isso, para a eficácia do tratamento, se faz necessário considerar esses diferentes fatores, bem como os mecanismos de ação dos fármacos e possíveis efeitos tóxicos (JARARI et al., 2015). Os esforços de pesquisa continuam a se concentrar em intervenções inovadoras, incluindo a desnervação renal (TANKUT; YORUK; BISOGNANO, 2017), e novas moléculas vasoativas que atuem na interface terapêutica das doenças cardiorrenais (HAMRAHIAN, 2017).

Nesse contexto, venenos ofídicos representam uma fonte de recursos naturais muito utilizadas para a descoberta de mecanismos moleculares envolvidos em processos fisiológicos e no desenvolvimento de agentes terapêuticos. Algumas substâncias constitutivas como fosfolipases A₂ (TEIXEIRA et al., 2011; DE ALBUQUERQUE et al., 2006; FERNANDEZ et al., 2010), serina proteases (MATSUI et al., 1998) e nucleotidasas (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010) de diferentes espécies de serpentes ganharam conotação terapêutica por apresentarem propriedades hipotensoras e vasorelaxantes.

Foi o que aconteceu com o precursor do captopril, o BPP (peptídeo potenciador da bradicinina), isolado da *Bothrops jararaca* (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970). Sua estrutura possui 5 a 14 aminoácidos, com um resíduo de piroglutamil na extremidade N terminal e um resíduo de prolina na extremidade C terminal. Os efeitos fisiológicos do BPP envolvem a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e aumento dos níveis de bradicinina. A interação do resíduo de prolina na extremidade C terminal com o sítio ativo da ECA inativa a enzima (ONDETTI; CUSHMAN, 1981). Anos depois, outros BPPs foram identificados em diversas espécies de serpentes pertencentes à família *Viperidae* (SOARES et al., 2005, HIGUCHI et al., 2006). E em seguida, peptídeos inibidores da bradicinina (BIPs) foram isolados e caracterizados em pelo menos três espécies da subfamília *Crotalinae*: *Agkistrodon bilineatus*, *Crotalus viridis viridis* e *Lachesis muta* (GRAHAM et al., 2005), sendo considerada uma nova entidade biológica presente em venenos ofídicos.

Diferentemente dos BIPs, as sarafotoxinas (SRTXs), são peptídeos vasoativos isolados do veneno de *Atractaspis engaddensis* (KOCHVA; VILJOEN; BOTES, 1982). Possuem função semelhante às endotelinas (ETs), formam uma família de potentes vasoconstritores. SRTXs e ETs que compartilham cerca de 60% da homologia estrutural, e diferem no segmento C-terminal. São peptídeos bicíclicos, com duas pontes dissulfeto conservadas.

SRTXs atuam em receptores de endotelina (ET-A e ET-B) mediadas por receptores acoplados a proteína G. Ativação do receptor ET-B pela SRTX libera NO e prostaciclina (PGI₂). Possivelmente essa ativação seletiva do ET-B confere a SRTX propriedades cardioprotetoras e antiarrítmicas (DAS; SARKAR; SHANKAR, 2007).

Além da semelhança estrutural, PNs obtidos de venenos ofídicos também compartilham efeitos fisiológicos similares aos PNs humanos. Tal semelhança estrutural foi observada em um peptídeo isolado do veneno da glândula de *Dendroaspis angusticeps* (Mamba verde). O peptídeo natriurético dendroaspis (PND) apresenta 38 resíduos de aminoácidos, contendo um anel dissulfeto com 17 aminoácidos, estrutura similar a dos PNs humanos, com a vantagem de possuir terminais amino e carboxílico alongados (SCHWEITZ et al., 1992). Posteriormente, esse peptídeo também foi identificado em humanos (SCHIRGER et al., 1999), cães (LISY et al., 2001), ratos e coelhos (CAI et al., 2008). O mecanismo de ação do PND é via receptores natriuréticos e ativação da guanilil ciclase, e acontece de forma semelhante aos PNs endógenos (SCHWEITZ et al., 1992).

Outros peptídeos hipotensores com atividade natriurética foram isolados e caracterizados em outras espécies de serpentes: *Trimeresurus flavoviridis* (Taipan do interior) denominado Tf-PNC (MICHEL et al., 2000), *Oxyuranus microlepidotus* (FRY et al., 2004) e *Pseudocerastes persicus* (AMININASAB et al., 2004, ELMI et al., 2006).

E mais recentemente, um novo peptídeo da serpente *Crotalus durissus cascavella*, o NPCasca, foi isolado e caracterizado (Figura 6) (EVANGELISTA, et al., 2008). Esse peptídeo contém 33 aminoácidos e mantém uma importante homologia do anel de 17 aminoácidos com os PNs humanos. *In vivo*, o NPCasca tem ação hipotensora e *in vitro*, em rim isolado, aumenta a fração de excreção de sódio (EVANGELISTA, et al., 2008). Baseado na sequência de aminoácidos do NPCasca, um peptídeo sintético, o NPCdc, foi sintetizado pela empresa GenOne, e em estudos iniciais apresentou efeitos diuréticos e natriuréticos semelhantes ao NPCasca (resultados não publicados). Ademais, o NPCdc também possui 9 aminoácidos na cadeia N-terminal, portanto, pode se tratar de um peptídeo natriurético promissor devido a uma maior meia-vida.

	LOOP REGION
NP2_Casca	VSTSRGSQGC CFGLKLD RIGAASGLGC WRRIVDS
VNOC_OXYSA2	SDPKIGDGC CFGLPLD RIGSVSGLGC CNRFVQNRPKK
VNOC_OXYSA	SDSKIGNGC CFGFPLD RIGSVSGLGC CNRMQNPPKKFSGE
BNP_LACMU	RVGDGC CFGLKLD RIGSMSGLGC
BNP2_BOTJA	GAAGC CFGLKLD RIGTMSGLGC
BNP1_BOTJA	EVKYD PCF GHKLDRI NEVSGLGCPSLRD FRPNAPSTSA
H-CNP53	KKGLSKGC CFGLKLD RIGSMSGLGC
P-CNP53	KKGLSKGC CFGLKLD RIGSMSGLGC
H-CNP22	GLSKGC CFGLKLD RIGSMSGLGC
P-CNP22	GLSKGC CFGLKLD RIGSMSGLGC
Frog-CNP1	KKGYSRGC CFGVKLD RIGAFSGLGC
Frog-CNP2	KKGTSGC CFGLKLD RIGAMSGLC
CNP_Luta	RVGDGC CFGLKLD RIGSMSGLGC
Consensus	XXXXXXXX CGFGXXLDRI XXXX SGLGC XXXXXXXXXXXX

Figura 6 – Sequência completa de aminoácidos do peptídeo, com alinhamento sequencial comparativo entre o NPCdc e outros PNs. VNOC_OXYSA2 e VNOC_OXYSA (Peptídeos natriuréticos de *Oxyuranus microlepidotus*); BNP_LACMU (BPP/CNP de *Lachesis muta*); BNP2_BOTJA e BNP1_BOTJA (BPP/CNP de *Bothrops jararaca*); H-CNP53 e 22 (PNC humano isoformas 53 e 22); P-CNP (PNC porcino isoformas 53 e 22); Frog-CNP1 e Frog-CNP2 (PNCs isolados de sapo); CNP_Luta (PNC de *Lachesis muta*); Consensus (região comum entre os PNs listados). Fonte: EVANGELISTA, et al., 2008.

Alguns resíduos de aminoácidos, como Phe8 e Arg14 e a sequência C-terminal do PNA humano (OGAWA et al., 2004) e Phe7, Arg13 e Met17 do PNC humano (HE et al., 2001) são conservadas ao longo de todos os membros da família de PNs. Estes resíduos juntamente com a estrutura central em anel são críticos para a ligação ao receptor, sendo essenciais para os efeitos natriuréticos desejados via RPN-A, juntamente com a depuração mediada pelo RPN-C (MISONO et al., 1984, VINK et al., 2012). O NPCdc também possui resíduos na região do anel dissulfeto conservados, sendo representados por Phe11 e Arg17 (Figura 6). Isto possivelmente sugere que o NPCdc tenha efeitos via receptor de peptídeos natriuréticos.

2.7 DOENÇA RENAL CRÔNICA

A hipertensão é a segunda causa mais comum de doença renal crônica (DRC) e é um potencializador da insuficiência renal quando acompanha a doença. Com alta prevalência e incidência, o número de novos pacientes aumenta a cada ano, e os custos com o tratamento também se elevam (HILL et al., 2016).

Por definição, a DRC consiste em perda progressiva e irreversível da função dos rins, acompanhada por inflamação crônica, estresse oxidativo, remodelamento vascular e danos glomerulares e tubulares (NOGUEIRA; PIRES; OLIVEIRA, 2017). O grau de

comprometimento da função renal é caracterizado pelo decréscimo da FG. Para efeitos clínicos, de acordo com a *National Kidney Foundation*, a DRC pode ser dividida em seis estágios descritos na tabela 1.

Tabela 1– Estágios da doença renal crônica

ESTÁGIO	FILTRAÇÃO GLOMERULAR (ml/min)	GRAU DE INSUFICIENCIA RENAL
0	> 90	Grupos de risco para DRC Ausência de lesão renal
1	> 90	Lesão renal leve com Função renal normal
2	60 – 89	IR Leve ou Funciona
3	30 – 59	IR Moderada ou Laboratorial
4	15 – 29	IR Severa ou Clínica
5	< 15	IR Terminal ou Dialítica

IR = insuficiência renal; DRC=doença renal crônica.

As principais causas de insuficiência renal crônica são o diabetes mellitus e a HAS. Pacientes diabéticos e ou hipertensos tem maior chance de desenvolver a DRC (TOMINO, et al., 2014). Há ainda outras causas, como infecções, glomerulopatias, distúrbios de origem genética, e uso prolongado de medicamentos, por exemplo, anti-inflamatórios (WEBSTER et al., 2017). Outra morbidade comum em pacientes com DRC é a disfunção autonômica, que pode contribuir frequentemente para a morbidade e mortalidade cardiovascular (THAYER; YAMAMOTO; BROSSCHOT, 2010). A disfunção consiste no aumento das atividades simpáticas e parassimpáticas apresentadas como hipertensão resistente, hipotensão ortostática e intradialítica representando um risco maior de morte súbita cardíaca (SALMAN, 2015).

No entanto, ainda há poucos relatos sobre os mecanismos subjacentes de disfunção autonômica em cada estágio de pacientes com DRC, a maioria dos pesquisadores tem focado apenas em pacientes em diálise (DI LEO et al., 2005). O significado da disfunção autonômica para a progressão da DRC não é claro, porém pode ser útil como um prognóstico para esses pacientes (CHANDRA et al., 2012). A medição da função autonômica pode ser feita através da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) derivada de sinais eletrocardiográficos. Por ser uma técnica não invasiva e de fácil aplicação, é amplamente utilizada para avaliar atividade simpática e parassimpática. Pode ser quantificada por meio de análise no domínio do tempo e análise do domínio de frequência (CYGANKIEWICZ; ZAREBA, 2013).

Na análise do domínio do tempo, o desvio padrão de todas as faixas do intervalo RR (SDRR) representa a estimativa de todos os componentes cíclicos responsáveis pela variabilidade no período de registro. Atividades parassimpáticas e simpáticas podem ser

distinguidas por índices na análise do domínio da frequência. Por exemplo, o poder de alta frequência (HF) está associado à atividade parassimpática, enquanto o poder de baixa frequência (LF) reflete os componentes simpáticos e parassimpáticos. A relação entre baixo e alto poder (LF/HF) representa atividade simpática ou equilíbrio simpato-vagal. A potência total (TP) representa a soma de todas as atividades acima. A significância do SDNN é a variabilidade no total, que é semelhante a TP (CYGANKIEWICZ; ZAREBA, 2013). Esses parâmetros da VFC foram validados como bons fatores preditivos para o risco cardiovascular (FELBER et al., 2006, THAYER; YAMAMOTO; BROSSCHOT, 2010). Mas seu significado para a função renal em pacientes com DRC não é extensivamente estudado. Por isso a necessidade de se avaliar a disfunção autonômica em pacientes com DRC e estabelecer uma associação dos parâmetros da VFC com a progressão da DRC.

A condição clínica do paciente e as comorbidades associadas à DRC são determinantes para a progressão ou não da doença. Como visto anteriormente, uma queda da FG, precede em diferentes graus à falência renal, assim o monitoramento do clearance de creatinina, associado a outros parâmetros como proteinúria e pressão arterial são fundamentais para estabelecer uma correlação com a progressão da DRC e com danos cardiovasculares.

Para compreender melhor a fisiopatologia da DRC, modelos animais vêm sendo utilizados pelos pesquisadores ao longo do tempo (YANG; ZUO; FOGO, 2010). O desenvolvimento destes modelos experimentais permite a realização de experimentos que esclarecem os mecanismos envolvidos na doença, e a pesquisa de novas terapêuticas.

Tendo em vista a variedade de modelos existentes, a escolha se dá no aspecto do desenvolvimento da doença que se deseja estudar (KUNATH et al., 2017). Neste sentido, o modelo de ablação renal, também conhecido como nefrectomia de 5/6 (Nx5/6), simula a DRC em humanos, na qual ocorre a perda progressiva da função renal devido à diminuição na funcionalidade dos néfrons (YANG; ZUO; FOGO, 2010; GAVA et al., 2012). A indução da DRC neste modelo é alcançada por meio da retirada do rim direito e remoção dos polos ou por meio do infarto de 2/3 do rim remanescente através da ligação de 2 – 3 ramos da artéria renal (GRIFFIN; PICKEN; BIDANI, 1994).

Por outro lado, só com a retirada de um rim, já nota-se uma série de alterações adaptativas nos néfrons remanescentes para que a FG seja mantida e não decaia abruptamente, bem como a necessidade da manutenção do balanço hidroeletrolítico (CHEVALIER, 1982). A

escolha do modelo de nefrectomia 5/6 leva em conta a presença de hipertensão arterial, bem como um maior nível de glomeruloesclerose (GRIFFIN; PICKEN; BIDANI, 1994). Vale lembrar que a hipertensão é a segunda causa mais comum de doença renal crônica e é um potenciador da insuficiência renal quando acompanha a doença em humanos (STERNLICHT; BAKRIS, 2017).

Estudos iniciais em ratos nefrectomizados já correlacionavam a elevação da pressão arterial sistêmica com a progressão da doença renal (CHANUTIN; FERRIS, 1932). Estudos posteriores reforçaram a hipótese de uma resposta adaptativa no rim para manter a FG. Esse esforço que o rim faz se deve à hiperfiltração dos néfrons remanescentes, com alterações na hemodinâmica renal: a resistência da arteríola aferente diminuída reflete no aumento do FSR, o que leva a um aumento na pressão do capilar glomerular e no coeficiente de ultrafiltração (HOSTETTER et al, 1981, BRENNER 1985). Devido a esse aumento no volume luminal, observam-se alterações nos transportadores de membrana para manter constante o equilíbrio hidroeletrólítico (MCDOUGALL; YATES, 1998).

Essas modificações sofridas em detrimento da perda de massa renal conferem aos néfrons funcionantes uma série de prejuízos estruturais e em longo prazo, funcionais. Um processo inflamatório acentuado e estresse oxidativo aumentado, bem como acúmulo de proteínas e outras substâncias de alto peso molecular lesam componentes da barreira de filtração, resultando em proteinúria (KUJAL; VERNEROVÁ, 2008). Além dessas alterações, também se verifica a presença de matriz extracelular aumentada e fibrose que podem levar a injúria endotelial e aterogênese, fatores determinantes para glomeruloesclerose e fibrose-tubulointersticial (BONGARTZ et al., 2012).

Alterações morfológicas adaptativas ocorridas na doença renal atingem um ponto crítico quando o rim começa a apresentar distúrbios funcionais, como poliúria, devido à diminuição na capacidade de concentrar a urina e desequilíbrio hidroeletrólítico. Nesse contexto, PNs são componentes importantes do eixo cardiorrenal para regular a homeostase de sódio. No cenário de redução de massa renal, PNA parece ser um importante mediador na modulação adaptativa da função renal (VALENTIN, 1997). Níveis aumentados de PNs circulantes foram evidenciados em pacientes renais (DE NICOLA et al., 1997). Isso implica no aumento compensatório da FG e na diminuição da reabsorção de sódio (SCAVONE et al., 1995).

No entanto, apesar das alterações hemodinâmicas na DRC estarem frequentemente associadas ao comprometimento da função cardíaca, pouco se sabe sobre os mecanismos que levam ao aumento dos PNs e a repercussão desses níveis aumentados na fisiopatologia da DRC. Tem sido demonstrado aumento dos níveis plasmáticos do PNA em pacientes no estágio final da DRC (HASEGAWA et al., 1986), bem como em modelos experimentais de DRC, só que neste caso, esse aumento foi acompanhado por uma redução na densidade de seus receptores resultando em menor diurese e natriurese (SANTOS-ARAÚJO et al., 2009). Por outro lado, em um modelo de hipertensão essencial, ratos espontaneamente hipertensos (SRH), com hipertrofia cardíaca, também apresentaram níveis elevados de PNA circulante (GUTKOWSKA et al., 1986, MORII et al., 1986). Isso levanta a seguinte questão: é a pressão arterial elevada ou a própria deterioração da função renal responsável pelos níveis elevados de PNA circulante nas síndromes cardiorenais?

A doença cardiovascular (DCV) permanece sendo a principal causa de morte entre os portadores de DRC e o seu aparecimento está relacionado ao aumento da prevalência dos fatores de risco tradicionais associado à contribuição dada pelo aparecimento de fatores de risco peculiares da DRC e decorrentes da queda na função renal (YAMAMOTO; KON, 2009)

2.8 TERAPÊUTICA COM PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS

Para a manutenção da homeostase cardiovascular, o coração garante a perfusão e oxigenação dos tecidos, enquanto que os rins eliminam metabólitos, e regulam o equilíbrio ácido-base e balanço hidroeletrolítico. Essa coerência funcional entre os sistemas pode ser perturbada na ocorrência de alterações hemodinâmicas. É uma relação íntima que sofre influência de diversas substâncias e hormônios, incluindo AngII, PNs e NO. Níveis aumentados de AngII e PNs têm sido relacionados com HAS (NAKAGAWA et al., 2016) que sabidamente tem papel fundamental na progressão da DRC, podendo ser tanto causa como consequência da lesão renal. A HAS contribui para redução da produção de óxido nítrico, o que leva a vasoconstrição, e consequentemente, hipóxia no tecido renal (LOPEZ-NOVOA et al., 2010).

A coexistência de doença cardiovascular e disfunção renal pode ser resultado de fatores de risco em comum que afetam ambos os sistemas: cardíaco e renal. A ICC é uma causa de mortalidade de elevada incidência que cursa frequentemente com insuficiência renal,

uma vez que a diminuição do débito cardíaco, característica dos estágios avançados de ICC, leva a uma diminuição de perfusão renal e ativação de um quadro neuro-humoral que resulta em declínio da função renal. Por outro lado, na DRC há um acúmulo de metabólitos e de volume que também agrava a função cardiovascular (SARNAK et al., 2003).

O fato de PNA e PNB terem suas concentrações plasmáticas aumentadas em doenças cardiovasculares (ANGERMAN; ERTL, 2004; MCCULLOUGH, 2004), faz com que sejam úteis como marcadores biológicos. Podendo ser utilizados para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento do tratamento de pacientes com DRC (HOCHER et al., 2004; SILVER et al., 2004; TAKAMI et al., 2004). Além disso, a utilização de PNs como ferramenta farmacológica despertou o interesse para a síntese de análogos recombinantes dos PNs humanos (hPN).

Estudos clínicos mostram que a utilização de PNA e PNB recombinantes humanos (hPNA e hPNB, respectivamente) reduz significativamente a pressão arterial, com aumento do débito cardíaco (CROZIER et al., 1986), aumento da resistência vascular sistêmica, e maior excreção de sódio em pacientes com ICC (YASUE; YOSHIMURA, 1996). Por outro lado, com uma menor potência hipotensora, o PNC quando administrado por via intravenosa, diminui transitoriamente a pressão arterial sistólica e diastólica, com aumento da frequência cardíaca e atividade diurética e natriurética (IGAKI T. et al., 1998).

Duas formas de hPNA, a anaritida e carperitida foram propostas. Anaritida (25 aminoácidos), não conseguiu obter efeitos natriuréticos e diuréticos significativos quando administrado a pacientes com ICC. Foram observados efeitos semelhantes com carperitida (28 aminoácidos), porém devido à hipotensão grave e perturbações da função renal a sua utilização como terapia para a doença renal e insuficiência cardíaca é limitada. Ao contrário do hPNA, a nesiritida, um hPNB, mostrou efeitos diuréticos e natriuréticos em pacientes com ICC. Sendo aprovado como um novo fármaco para o tratamento da ICC. Com o uso contínuo do hPNB, questões acerca de uma falta de ação no coração e na função renal foram levantadas. A preservação ou mesmo melhoria da função renal é uma prioridade alta na insuficiência cardíaca. Portanto, a segurança e eficácias desses hPNs são questionáveis (POTTER et al., 2009, VINK et al., 2012).

Ademais, PNs endógenos têm tempo de meia-vida muito curto, pois são rapidamente degradados por endopeptidases. Esse metabolismo ocorre primordialmente no rim, por concentrar uma grande quantidade de enzimas degradativas, mais precisamente, na borda em escova do túbulo proximal. O PND, por exemplo, sofre ação de enzimas proteolíticas (KIM,

et al., 2013) e podem ser removidos da circulação pelo RPN-C (JOHNS, et al., 2007), como acontece com os demais PNs. Níveis plasmáticos de PND permanecem altos por um período maior quando comparados aos PNs endógenos, devido a sua estrutura C-terminal mais longa com 15 aminoácidos, em comparação a 5 aminoácidos do PNA, 6 aminoácidos para o PNB e nenhum para o PNC. Isso torna o PND mais resistente às endopeptidases, o que minimiza sua metabolização e contribui para os efeitos natriuréticos e diuréticos (CHEN; LAINCHBURY; BURNETT, 2002).

A maior estabilidade plasmática conferida ao PND e os seus efeitos benéficos sobre a função renal e cardíaca, logo despertaram interesse para seu uso na terapia de doenças cardiovasculares. Na tentativa de melhorar as ações biológicas e minimizar efeitos indesejáveis, um peptídeo híbrido, resultado da junção dos 15 resíduos terminais do PND com o PNC humano, foi obtido. O resultado dessa junção originou o peptídeo CD-NP, contendo 37 aminoácidos em sua estrutura. As ações natriuréticas e diuréticas foram mantidas, com melhorias na filtração glomerular, e função cardíaca (LISY et al., 2008).

Uma proteína quimérica desenvolvida a partir do CD-NP, a cenderitida, exibiu efeitos cardioprotetores e antifibróticos (MARTIN, et al., 2012, ICHIKI, et al., 2014), mediados por cGMP, através dos receptores ligados a GC-A e GC-B (LEE et al., 2016). Ademais, em ensaios clínicos iniciais, cenderitida, revelou uma melhoria da função renal de pacientes com insuficiência cardíaca e insuficiência renal (ROSE, 2010). Em 2015, um estudo de Fase II foi concluído em pacientes com ICC estável. Eles receberam, por via subcutânea, a infusão por até oito dias consecutivos de cenderitida. Este ensaio aberto avaliou a segurança, tolerabilidade, perfis farmacocinéticos e resposta farmacodinâmica ao aumento gradual dos níveis de dose administrados. O fármaco foi bem tolerado e não houve eventos adversos significativos (ClinicalTrials.gov, identifier: NCT02359227).

Considerando que a ICC e a IRC são doenças que comumente cursam em paralelo, alterações na hemodinâmica renal podem ser decorrentes de alterações da pressão arterial sistêmica, ou seja, do efeito de PNs na hemodinâmica sistêmica. Por outro lado, os efeitos do PNs na hemodinâmica renal também repercutem sobre a hemodinâmica sistêmica e níveis pressóricos. Os efeitos diurético e natriurético de PNs são em parte responsáveis pela ação anti-hipertensiva destes agentes e uso na ICC. Ensaios experimentais sugerem que a administração de peptídeos natriuréticos exógenos ou inibidores do seu catabolismo para

pacientes com ICC pode ser clinicamente benéfica (TROUGHTON; MICHAEL FELKER; JANUZZI, 2014).

Peptídeos sintéticos possuem atividade biológica muito útil, podendo substituir peptídeos naturais ou até proteínas mais complexas. Porém devido à característica da meia-vida curta, diminuição da densidade de receptores, e dessensibilização intracelular é comum o aparecimento de tolerância após a utilização de análogos sintéticos de peptídeos natriuréticos.

Os PNs atualmente em uso são passíveis de indução de tolerância quanto à atividade diurética e natriurética, apresentando eficácia limitada. PNs sintéticos, similares aos endógenos podem se tornar alternativa terapêutica para doenças cardiorrenais, como o exemplo da nesiritida que é um peptídeo produzido pela tecnologia do DNA recombinante (O'CONNOR et al., 2015). Os PNs de serpentes, tendo em vista serem mais resistentes à endopeptidases humanas podem ser adicionalmente interessantes, uma vez que teria meia vida mais prolongada.

O NPCdc proposto neste projeto é um peptídeo sintético similar ao NPCasca obtido da *Crotalus durissus cascavella*, o qual pode se tornar uma interessante alternativa terapêutica, uma vez que estruturalmente ele tem a prerrogativa de ser lentamente metabolizado por endopeptidases humanas. Ele apresenta alça N-terminal longa de nove aminoácidos. Neste trabalho, nos propusemos investigar, em ratos com função renal padrão e com massa renal reduzida, os efeitos deste peptídeo sobre parâmetros de função renal, bem como sobre seus mecanismos de sinalização intracelular na aorta.

3 METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE EM FASE SÓLIDA DO NPCdc

O peptídeo natriurético (NPCdc) foi sintetizado pela empresa GenOne. O sequenciamento realizado em um sequenciador automático de peptídeos revelou 33 resíduos de aminoácidos: "VSTSRGSQGCFLKLDLDRIGAASGLGCWRRIVDS". Esta sequência é similar a estrutura primária do peptídeo original, isolado da *Crotalus durissus cascavella*, o NPCasca (EVANGELISTA et al., 2008). Além disso, a massa molecular do NPCdc foi determinada em 3.453,96 Da, em comparação a 3.453,94 Da do NPCasca.

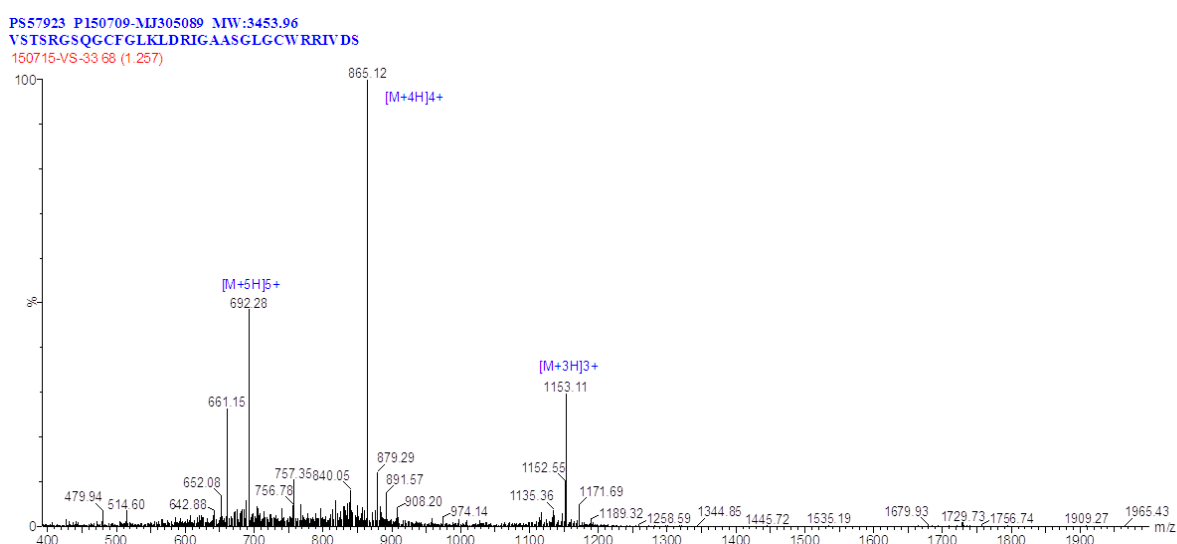


Figura 7 – Perfil de Espectrometria de Massas do NPCdc por MALDI-TOFF (GenOne).

3.2 MODELAGEM MOLECULAR

Para a predição das estruturas 3D e da função da sequência do NPCdc foi utilizado o programa I-TASSER (ZHANG, 2008, ROY et al., 2010, YANG et al., 2013, YANG et al., 2015). A predição foi baseada na estrutura secundária da sequência através do perfil de alinhamento de segmentação (PPA – *Profile-Profile threading Alignment*). A sequência alvo inicialmente foi fragmentada e foi realizado um alinhamento com as estruturas do PDB (*Protein Data Banking*) com similaridade superior a 70% para localizar os possíveis pontos de dobras da estrutura. Primeiro foi calculado o parâmetro B-factor profile (BFP), a partir de templates de proteínas do PDB em combinação com perfis de sequências derivadas de bancos

de dados. O perfil reportado do BFP corresponde ao fator B normalizado da proteína alvo, definido por $B = (B' - u) / s$, onde B' corresponde ao valor bruto do BFP; u e s correspondem à média e o desvio padrão, respectivamente, ao longo da sequência. O ângulo de torção e as distâncias interatômicas foram avaliados. A resolução dos modelos apresentam RMSD (*Root Mean Square Deviation*) na faixa de 1-2 Å. A precisão dos modelos das estruturas obtidas pelo I-TASSER foi estimada pelas simulações de montagem da estrutura através do C-score. Esse parâmetro varia de -5 a 2 e quanto mais positivo o resultado maior a confiabilidade da estrutura predita. O modelo gerado foi visualizado pelo programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (HUMPHREY et al., 1996).

3.3 MATERIAIS

A neprilisina foi gentilmente cedida pela professora Adriana Carmona da Universidade Federal de São Paulo. A ketamina (DOPALEN[®]) e a xilazina (ANASEDAN[®]) foram obtidos da CEVA (Paulínia, SP, Brasil). Tiopental sódico (THIOPENTAX[®]) foi obtido da Cristália (Produtos Químicos Farmacêuticos, Itapira, SP, Brasil). A heparina foi obtida da Blausiegel (Cotia, SP, Brasil). Os kits de ensaio enzimático colorimétrico de ureia e de creatinina foram obtidos da Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil). Folin, albumina sérica bovina (BSA), ATP, inibidor de tripsina, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ouabaína, furosemida, bis-tris-propano, EDTA, HEPES-Tris, lucigenina, Tris, Triton X-100, deoxicolato, coquetel inibidor de proteases, NADPH, inulina, antrona foram todos adquiridos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA). Todos os outros sais e reagentes foram da pureza mais elevada acessível. A membrana de nitrocelulose foi adquirida da GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido) e o reagente Luminata Forte Western HRP foi adquirido da Millipore (Molsheim, France).

3.4 PARÂMETRO FARMACOCINÉTICO

O ensaio para determinação da velocidade de hidrólise foi realizado em tampão TBS (Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM e pH 7,4) a 37 °C, utilizando 0,23 nmol de NEP recombinante e 4,95 µM de substrato fluorogênico, com adição de concentrações crescentes e cumulativas do peptídeo NPCdc. O ensaio foi realizado em espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 pc, em compartimento termostatizado a 37 °C, com as fendas de emissão e

excitação ajustadas em 5 nm, e comprimentos $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm. Os ensaios de inibição foram realizados em triplicata.

A constante de inibição aparente K_{iap} foi estimada através da equação $V_0 - V_i = 1 + [I] / K_{\text{iap}}$, onde V_0 = velocidade inicial de hidrólise na ausência do inibidor; V_i = velocidade de hidrólise na presença do inibidor; $[I]$ concentração molar do inibidor. O coeficiente angular do plote $(V_0/V_i) - 1$ em função de $[I]$, pode ser descrito como $1 / K_{\text{iap}}$. Assim, a constante de inibição K_i foi estimada usando a equação $K_i = K_{\text{iap}} / 1 + [S] / K_M$.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS

Todo o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco, sob nº 23076.016262/2015-01.

3.6 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, em ciclo 12h claro/escuro, temperatura em torno de 21° C, com livre acesso a água e ração.

3.7 NEFRECTOMIA 5/6 (Nx5/6)

Machos com idade entre 90 e 120 dias de vida, pesando em média 300g foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg, ip) e xilazina (10 mg/kg, ip). Após assepsia do local, realizou-se uma incisão abdominal para exposição dos rins. As vísceras foram afastadas para esquerda e os ramos posterior e inferior anterior da artéria renal esquerda foram ligados com fio cirúrgico estéril de nylon, SERTIX®. Após, as vísceras foram rebatidas para direita e então o rim direito foi descapsulado e totalmente removido. As vísceras foram reposicionadas, hidratadas com solução fisiológica e então a sutura da musculatura abdominal foi realizada (Figura 8).

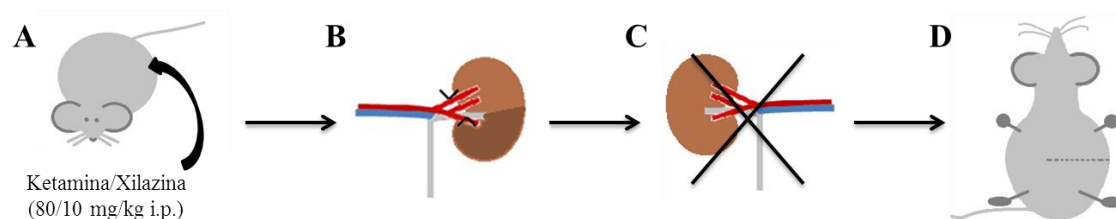


Figura 8 – Modelo cirúrgico – Nefrectomia 5/6. Ratos anestesiados com ketamina (80 mg/kg, ip) e xilazina (10 mg/kg, ip) (A), tiveram os ramos posterior e inferior anterior da artéria renal esquerda ligados com fio cirúrgico (B). Em seguida, o rim direito foi descapsulado e totalmente removido (C). E então se realizou sutura da musculatura abdominal (D).

Em seguida, os ratos foram colocados individualmente em gaiolas de plástico forradas com maravalha sob aquecimento com lâmpada incandescente. Após recuperação da anestesia, esses animais permaneceram em gaiolas individuais e no 13º dia pós-cirurgia foram alocados em gaiolas metabólicas, em jejum, por 12 horas onde o volume de urina e consumo hídrico foram mensurados. Ao término do período, os animais foram submetidos à coleta de amostra sanguínea, através da veia caudal, destinada à avaliação sérica das concentrações de creatinina e ureia. Além disso, as amostras de urina foram utilizadas para avaliação das concentrações de proteína e de creatinina.

No 15º dia após a cirurgia sham (n=17) ou Nx5/6 (n=19), parte dos ratos foram submetidos à infusão do NPCdc - peptídeo sintético originalmente obtido da *C.d.cascavella*, ou do veículo (salina). Assim, foram formados os grupos: sham (n=8), sham + NPCdc (n=9) Nx (n=11) e Nx + NPCdc (n=8). O protocolo experimental está resumido na figura 9.

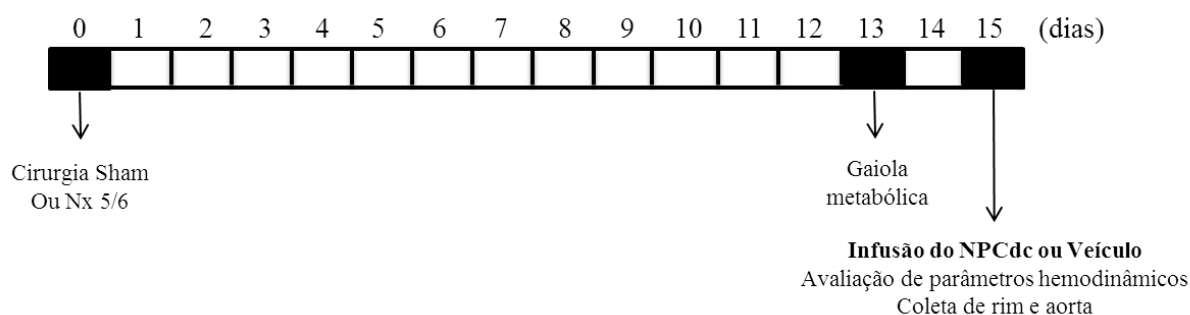


Figura 9 – Protocolo experimental em dias. Sham, ratos submetidos à cirurgia fictícia (n=17); Nx5/6, ratos submetidos à cirurgia de nefrectomia 5/6 (n=19). 15 dias após a cirurgia, parte dos ratos foram submetidos à infusão do NPCdc - peptídeo sintético originalmente obtido de *C.d.cascavella*, ou do veículo (salina). Assim, foram formados os grupos: sham (n=8), sham + NPCdc (n=9) Nx (n=11) e Nx + NPCdc (n=8).

3.8 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS

As amostras de sangue coletadas nos animais após a gaiola metabólica foram centrifugadas por 30 minutos a 6000 x g e foram destinadas para avaliação dos níveis séricos de ureia (ensaio enzimático colorimétrico, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e creatinina (kit comercial Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). A creatinina também foi mensurada nas amostras de urina, centrifugadas a 1000 x g por 30 minutos. A partir desses resultados o clearance de creatinina foi calculado através da seguinte equação: $CCr = V \times [CrU]/[Cr]$, onde, CCr = clearance de creatinina (mL/min); V = fluxo urinário (mL/min); [CrU] = concentração urinária de creatinina (mg/dL) e [Cr] = concentração plasmática de creatinina (mg/dL).

As amostras de urina também foram utilizadas para avaliar a excreção urinária de proteínas, determinada pelo método de fenol de Folin (LOWRY et al., 1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão. Os valores foram corrigidos de acordo com o peso corpóreo dos animais e fluxo urinário.

A partir da ingestão hídrica (IH) e do fluxo urinário (V), foi calculado o balanço hídrico (BH), conforme a seguinte equação: $BH = (IH) - (V) / 100g$ de peso corpóreo.

3.9 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIORRENAIS

3.9.1 Preparação do animal para medidas hemodinâmicas

Quinze dias após a cirurgia sham ou Nx5/6, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg, i.p.) e submetidos a cateterização. Para os animais nefrectomizados doses menores do anestésico (40mg/kg, ip) foram utilizadas, tendo em vista que a via de excreção do tiopental é renal. Quando apropriadamente anestesiados, os animais foram colocados em mesa cirúrgica aquecida, de forma a manter a temperatura do animal entre 36,5 e 37,0° C, medida por um termômetro digital. Foi realizada traqueostomia utilizando cateter de polietileno (PE 240) para ventilação mecânica. Em seguida, para avaliar a pressão arterial média (PAM), uma cânula (PE 50) preenchida com solução fisiológica heparinizada e ocluída com pino de metal, foi inserida na artéria femoral esquerda, a qual

estava conectada a um transdutor de pressão (SP 844, MEMSCAP Inc, Durham, UK) conectado a um amplificador em ponte (PowerLab, ADI Instruments, Austrália).

Outras cânulas de polietileno (PE 50) foram utilizadas para cateterizar as veias jugulares, direita e esquerda. Na veia jugular direita foi infundido inulina na concentração de 10%, a uma velocidade de infusão de 1,2 ml/h. Para tal, utilizou-se uma bomba de infusão contínua (11 Plus Syringe Pumps, Harvard). Através da veia jugular esquerda foi infundido BSA 4,7 g/dL (BIVOL; VAGNES; IVERSEN BM, 2005) através de bomba de infusão contínua, na velocidade de 6 ml/kg/h nos 40 minutos iniciais do experimento. Essa reposição visa repor o volume plasmático perdido durante a cirurgia, cerca de 20% (MADDOX et al., 1977).

Depois de cateterizadas as jugulares, foram procedidas laparotomia e incisão transversal abdominal à esquerda para localização do rim esquerdo. Cuidadosamente, a artéria renal deste rim foi dissecada para posicionamento de um sensor de fluxo perivascular 1mm (MA1PRB, Transonic Systems, NY, USA), o qual se encontrava conectado a um fluxômetro (modelo TS420, Transonic Systems Inc) para registro do fluxo sanguíneo renal (FSR). Em seguida, o ureter deste rim foi isolado e cateterizado com cânula de polietileno (PE 10), para coletas de amostras de urina em tubos graduados. Concluída a cirurgia, um período de equilíbrio de sessenta minutos foi aguardado para estabilização do animal. Passados trinta minutos do equilíbrio cirúrgico, deu-se início a infusão do peptídeo (NPCdc, 7,5 µg/kg/min) ou veículo (NaCl, 0,9%), acrescidos à solução de inulina, até o fim do experimento, totalizando setenta minutos ao final. A avaliação dos parâmetros hemodinâmicos renais foi realizada de acordo com trabalhos prévios do laboratório (PAIXÃO et al., 2001; VIEIRA-FILHO et al. 2018). Os registros da PAM, FC e FSR, bem como os períodos de coletas de hematócrito, sangue e urina estão esquematizados na figura 10.

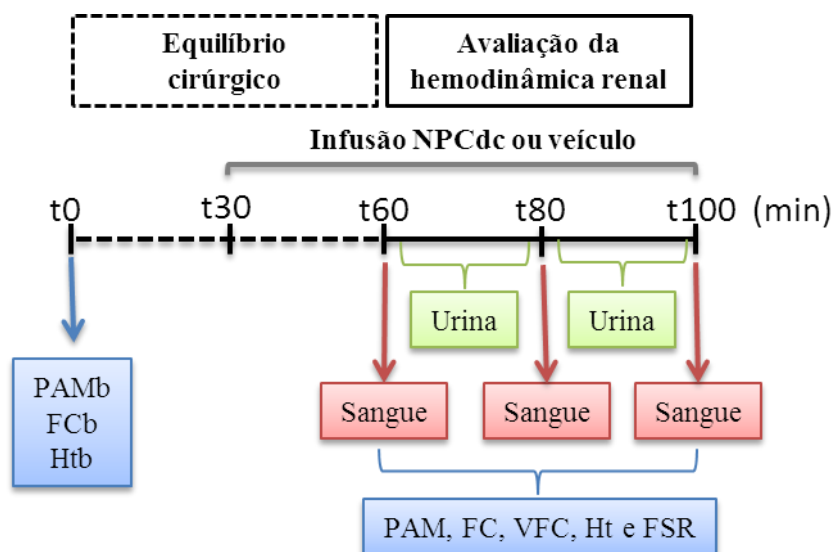


Figura 10 – Registro de parâmetros hemodinâmicos em minutos. t0 a t60 corresponde ao período de equilíbrio cirúrgico, no qual acontece a infusão de inulina e reposição de volume com BSA 4,7g/dL. Em t30 dar-se-á início a infusão do peptídeo (NPCdc, 7,5 µg/kgmin) ou veículo (NaCl, 0,9%) acrescidos à solução de inulina, até o fim do experimento (t100). PAMb = pressão arterial média basal; FCb = frequência cardíaca basal; Htb = hematócrito basal. PAM = pressão arterial média; FC = frequência cardíaca; VFC = variabilidade da frequência cardíaca; Ht = hematócrito; FSR = fluxo sanguíneo renal. A PAM foi monitorada continuamente durante todo o experimento.

3.9.2 Registro direto da pressão arterial média

Com a artéria femoral esquerda cateterizada, a pressão arterial média (PAM) foi monitorada. Amostras de sangue de aproximadamente 60 µl foram colhidas em capilares heparinizados (1,1mm, modelo G100CCH, Glasscyto), ao longo do experimento. A PAMb (basal) foi medida imediatamente após a cateterização da artéria femoral, procedimento que foi seguido pela coleta de uma amostra de sangue para avaliação do hematócrito pré-cirúrgico (Htb). Os registros foram obtidos por meio de transdutores de pressão acoplados a um polígrafo amplificador de sinais - taxa de amplificação de sinal de 2kHz (PowerLab, ADI Instruments, Austrália) conectados a um computador contendo um software específico de integração (LabChart v7.00, ADI Instruments, Austrália). Antes de cada medida, o transdutor foi calibrado através de um manômetro de mercúrio. Após um período de estabilização, os níveis de PAM e frequência cardíaca (FC) foram mensurados continuamente ao longo dos experimentos. A FC representa o número de batimentos do coração por unidade de tempo, expressa em batimentos por minuto (BPM). A FC foi calculada automaticamente pelo software a partir da detecção dos picos da pressão sistólica do registro da pressão arterial.

3.9.3 Análise da variabilidade da frequência cardíaca

A variabilidade da frequência cardíaca é uma medida não invasiva da função autonômica que reflete a variabilidade batimento a batimento na frequência cardíaca. Registros de pressão arterial de ratos anestesiados, obtidos durante a avaliação hemodinâmica renal, foram utilizados para analisar a variabilidade da frequência cardíaca. As análises foram realizadas no software LabChart (versão 8.1.11, RRID: SCR_001620, ADInstruments). A opção para ratos foi escolhida no pacote de software e foram considerados pontos dentro do intervalo de 100 a 200 ms. Batidas ectópicas e artefatos foram removidos manualmente. A análise espectral considerou uma média de 1500 pontos para 5 minutos de gravação. Vários parâmetros de tempo e frequência foram obtidos a partir da medição da variabilidade da frequência cardíaca. No domínio do tempo, foram considerados os seguintes parâmetros: desvio padrão da frequência cardíaca (DP FC), que representa a média dos desvios padrão da frequência cardíaca, e pRR50, que representa a porcentagem de intervalos RR com variações > 50 ms. No domínio da frequência, foram analisadas as seguintes bandas: frequência muito baixa (VLF, 0 - 0,2 Hz), baixa frequência (LF, 0,2 - 0,75 Hz) e alta frequência (HF, 0,75-2,5 Hz) (MALIK et al., 1996). Três períodos de 5 minutos foram capturados para a análise de variabilidade da frequência cardíaca: linha de base, 30 minutos e 65 minutos após o início da infusão do veículo ou de NPCdc. Vale ressaltar que todos os registros foram obtidos na ausência de agentes farmacológicos.

3.9.4 Medida do fluxo sanguíneo renal

Uma vez instalado, o sensor de fluxo perivascular registrava o fluxo sanguíneo de forma direta através de um sistema de aquisição de dados (PowerLab e software LabChart, ambos da ADI Instruments, Austrália). Após um período de estabilização de 60 min, sob infusão do NPCdc ou salina, foram realizadas as mensurações do fluxo sanguíneo renal (FSR). Após a realização do procedimento experimental o rim esquerdo foi removido, seco em papel filtro e pesado em balança de precisão. Os valores de FSR são expressos por ml/min/100g de peso corpóreo. Para os ratos sham, os resultados foram calculados para os dois rins.

3.9.5 Determinação do fluxo plasmático renal

A partir do FSR foi possível calcular o fluxo plasmático renal (FPR) através da equação: $FPR = FSR \times (1-Ht)$. Os valores de FPR são expressos por ml/min/100g de peso corpóreo. Para os ratos sham, os resultados foram calculados para os dois rins.

3.9.6 Determinação da resistência vascular renal

A resistência vascular renal (RVR) foi calculada de acordo com a seguinte equação: $RVR = PAM/FSR$, onde RVR corresponde à resistência vascular renal, PAM à pressão arterial média, e FSR ao fluxo sanguíneo renal. Estes dados foram corrigidos pelo peso corpóreo do animal. A RVR foi expressa como mmHg/ml/min/100g de peso corpóreo.

3.9.7 Avaliação da filtração glomerular

A filtração glomerular (FG) foi medida através do clearance de inulina, uma substância livremente filtrada, que não é reabsorvida e nem secretada. O clearance corresponde ao volume de plasma depurado por excreção urinária por uma unidade de tempo.

Assim, amostras de urina foram coletadas durante dois períodos de 20 minutos, na vigência da infusão do peptídeo (NPCdc, 7,5 µg/kgmin) ou veículo (NaCl, 0,9%), como mostra a figura 10. No início e fim de cada coleta, amostras de sangue também foram coletadas (figura 10), e os valores de PAM e FSR foram continuamente registrados durante os períodos de coleta de urina. A concentração de inulina no plasma e urina foi medida pelo método da antrona (FUHR et al., 1955) por espectrofotometria colorimétrica (Genesys 105 UV-VIS).

3.9.8 Determinação da fração de filtração

Por fim, a fração de filtração (FF) foi determinada através da relação $FG/FPR \times 100$. Estes dados foram corrigidos pela massa corpórea do animal (g). Para os ratos sham, os resultados da FG foram calculados para os dois rins.

3.9.9 Determinação da fração de excreção de sódio e potássio

Ao final da avaliação dos parâmetros hemodinâmicos, os animais foram eutanasiados e o rim esquerdo descapsulado, removido, pesado e congelado em nitrogênio líquido para posterior processamento e dosagens. As amostras de sangue foram centrifugadas e apenas o plasma utilizado. As urinas foram medidas e, juntamente com as amostras de plasma, congelados a -20 °C para dosagens posteriores.

As concentrações de sódio e potássio no plasma e na urina foram determinadas utilizando-se fotômetro de chama digital (Benfer, modelo BFC 300). A fração de excreção de sódio ou potássio (FE_{Na^+} ou FE_{K^+}) foi calculada utilizando-se a fórmula: $([U_{Na^+}] \text{ ou } [U_{K^+}] \times V / [P_{Na^+}] \text{ ou } [P_{K^+}] \times FG) \times 100$; onde, $[U_{Na^+}]$ ou $[U_{K^+}]$ é a concentração urinária do íon; V corresponde ao fluxo urinário; $[P_{Na^+}]$ ou $[P_{K^+}]$ refere-se a concentração plasmática do íon e FG a filtração glomerular, estimada pelo clearance de inulina.

3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ATPases TRANSPORTADORAS DE Na^+ NO TÚBULO PROXIMAL RENAL

A atividade das duas bombas de Na^+ foi medida em frações de membrana do túbulo proximal através de método colorimétrico, o qual se baseia na determinação quantitativa do fosfato inorgânico (Pi) liberado (GRUBMEYER; PENEFSKY, 1981).

3.10.1 Obtenção da fração de membranas do túbulo proximal

Após a coleta, os rins foram pesados, e o córtex renal foi removido e fatiado utilizando um micrótomo (modelo Stadie-Riggs) para obtenção do *cortex-corticis* (camada externa do córtex). Em seguida, o *cortex-corticis* foi homogeneizado a 2000 rpm em solução tampão isomótica, pH 7,4 mantida em banho de gelo (sacarose 250 mM, Hepes-Tris, EDTA 2 mM e de inibidor de tripsina 0,15mg/mL e PMSF 1 mM) numa proporção de 1g : 4 mL. O homogenato foi centrifugado a $755 \times g$ por 15 min a 4°C numa centrífuga Avanti J-E, utilizando um rotor JA-20. Em sequência, nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante obtido foi centrifugado a $8500 \times g$ por 20 min. Finalmente, outra centrifugação foi realizada em uma ultra centrífuga Optima LE-80k a $35000 \times g$ por 45 min a 4°C, utilizando um rotor 70 Ti. O sedimento foi ressuspensão em sacarose 250 mM, pH 7,4, aliquoteado em tubos e

armazenados a -20°C (CABRAL et al., 2002). A concentração proteica foi determinada pelo método de fenol de Folin (LOWRY et al., 1951) utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.10.2 Atividade da $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase

A atividade da $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase foi calculada a partir da diferença de P_i liberado na ausência e na presença de seu inibidor específico, ouabaína 2 mM. Para a avaliação da atividade da $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase, a preparação de membrana (concentração final de 0,05 mg/ml) foi adicionada à uma meio de reação contendo bis-tris-propano 50 mM (pH 7,4), EDTA 0,2 mM, MgCl_2 5 mM e 120 mM de NaCl. Após incubação durante 10 min a 37°C , a reação foi iniciada através da adição de uma mistura de ATP (5 mM) e KCl (24 mM) e parada após 10 min pela adição de um volume e meio de carvão ativado em solução de HCl 0.1 M. Finalmente, O P_i liberado foi mensurado espectrofotometricamente (absorbância à 660nm) em um volume de alíquota do sobrenadante obtido após centrifugação da suspensão de carvão ($1000 \times g$ por 20 min), adicionado a um volume do um reagente de cor contendo sulfato ferroso 8% , ácido sulfúrico (1N) e molibdato de amônio 50%. Todas as amostras foram mensuradas em triplicata e a atividade da enzima foi apresentada corrigida pelo tempo de reação e concentração de proteína da amostra.

3.10.3 Atividade da Na^{+} -ATPase

A atividade da Na^{+} -ATPase resistente à ouabaína, sensível à furosemida, foi calculada a partir da diferença de P_i liberado na ausência e presença de sua inibição, através do uso da furosemida 2 mM, ambos na presença de ouabaína 2 mM. A reação de hidrólise foi iniciada com adição de um volume da preparação de membrana (0,2 mg/mL), previamente incubada por 10 min a 37°C com ouabaína 2 mM. O meio de reação era composto por HEPES-Tris 20 mM, MgCl_2 10 mM, NaCl 120 mM e ATP 5mM (pH 7,4).

A reação foi interrompida após 12 min pela adição de um volume e meio de carvão ativado por HCl 0,1 M. O P_i liberado foi mensurado espectrofotometricamente (660 nm) numa alíquota de 0,1 mL do sobrenadante obtido após centrifugação da suspensão de carvão, a $1000 \times g$ por 10 min após adição de 0,1 mL de um reagente de cor contendo sulfato ferroso

8%, ácido sulfúrico (1N) e molibdato de amônio 50%. Todas as amostras foram mensuradas em triplicata e a atividade da enzima foi apresentada corrigida pelo tempo de reação e concentração de proteína da amostra.

3.11 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO ($O_2^{\cdot-}$) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NADPH

Para avaliar a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) basal e dependente da NADPH oxidase, o rim e a aorta foram utilizados. Os níveis de ânion superóxido foram detectados pela quimioluminescência derivada da lucigenina (RIBEIRO et al., 2018). Esta é uma técnica para detecção de ânion superóxido extracelular, sensível, reproduzível e confiável. Nessa reação, o $O_2^{\cdot-}$ reduz a lucigenina para seu radical cátion, que reage com um segundo ânion superóxido para formar a molécula rica em energia dioxetano, que emite um fóton (KITAGAWA et al., 2003).

Para obter homogenatos da aorta torácica, um segmento de aorta de 10 mm foi homogeneizado em 300 μ l de tampão RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% triton X-100, 1% de deoxicolato, 0,1% SDS e 1 mM PMSF) suplementado com um coquetel inibidor de protease (AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, bestatin 130 μ M, E-64 14 μ M, leupeptina 1 μ M e aprotinina 0,3 μ M) usando um homogeneizador de tecidos com um pistão de vidro (Starglass, 5 ml) em um banho de gelo para obter homogenatos da aorta torácica. Os homogenatos da aorta torácica foram centrifugados a $15.000 \times g$ por 15 minutos a 4 °C. Os homogenatos de rim foram centrifugados a $12.000 \times g$ por 12 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi adicionado à solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4) na proporção de 0,1 ml: 1 ml na presença e ausência de 100 μ M de NADPH. A quimioluminescência foi medida em um luminômetro (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia) a intervalos de 30 s por 5 min a 37 °C antes e após a adição de 10 μ M de lucigenina. Para reduzir o viés da ciclagem da lucigenina redox na presença de redutases celulares endógenas (LIOCHEV; FRIDOVICH, 1997), a análise dos dados considera a quimioluminescência produzida pela lucigenina na presença e na ausência da amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata. A quimioluminescência da lucigenina é relatada como unidades relativa de luz por minuto por miligrama de proteína total (RLU/mg de proteína).

3.12 AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO CELULAR NA AORTA

3.12.1 Dosagem de óxido nítrico

A determinação dos níveis de óxido nítrico (NO) em sistemas biológicos é difícil, uma vez que o NO endógeno na presença de oxigênio tem uma meia-vida curta. O NO intracelular pode ser facilmente oxidado em nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), compostos mais estáveis. No entanto, na ausência de hemoproteínas, o NO derivado de L-arginina em solução aquosa é espontaneamente oxidado em nitrito. Por esse motivo, a medida da concentração de nitrito é um método viável para inferir indiretamente se há alguma alteração dos níveis de NO após a administração do fármaco. Assim, o nível de (NO) foi determinado usando a metodologia de Griess (GREEN et al., 1982; ROMERO et al., 2011).

Os tecidos de cada animal foram homogeneizados e centrifugados (12000 x g, 4 °C, 15 minutos). Em seguida, o sobrenadante de cada amostra foi colocado no poço da microplaca, juntamente com o reagente de Griess (0,2% de naftiltilenodiamina e 2% sulfanilamida em ácido fosfórico a 5%, na proporção de 1:1). Após 10 minutos a temperatura ambiente, a absorbância foi medida com um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos como µM de nitrito por mg de proteínas. O nitrito de sódio foi usado como curva de referência padrão nas concentrações de 35, 30, 25, 20, 15, 10 e 5 µM.

3.12.2 Determinação da expressão proteica

Os níveis das proteínas cGKI, nNOS (NOS I), eNOS (NOS 3), AKT e ERK1/2 foram avaliados usando a técnica de Western blotting. Os níveis das formas fosforiladas, p-nNOS^{Ser-1417}, p-eNOS^{Ser-1177}, p-iNOS^{Tyr-151}, p-AKT^{Ser-473} e p-ERK1/2^{Thr-202/Tyr-204} também foram avaliados. Os homogenatos da aorta torácica, obtidos do segmento da aorta de 10 mm em 300 µl de tampão RIPA, suplementado com um coquetel inibidor de protease, usando um homogeneizador de tecidos com um pistão de vidro, foram centrifugados a 15.000 × g por 15 minutos a 4 °C. A proteína total foi medida no sobrenadante usando o reagente de Bradford e BSA como padrão. Foram utilizadas alíquotas de 100 µg de proteína por poço, exceto cGKI, AKT, ERK1/2 e suas formas fosforiladas, para as quais foram utilizados 30 µg de proteína por poço. As proteínas nNOS, eNOS, iNOS, p-nNOS e p-eNOS foram separadas por eletroforese

em gel de poliacrilamida a 7,5% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL-G & E). cGKI, AKT, ERK1/2 e suas formas fosforiladas foram separadas usando eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio de sítios de ligação não específicos com BSA 5%, as membranas de nitrocelulose foram incubadas a 4 °C com anticorpos primários desejados (Tabela 2). Após três lavagens de 10 minutos cada, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados à peroxidase em temperatura ambiente (Tabela 2). As imunotransferências foram detectadas usando um sistema aprimorado de quimioluminescência (Immobilon Forte) com um sistema de imagem (Chemidoc Touch®, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os níveis de todas as proteínas foram normalizados para a proteína constitutiva da β -actina. As bandas de imunoblot foram quantificadas usando o programa de computador ImageJ (RRID: SCR_003070).

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com o software Prism versão 7.00 (GraphPad Software, RRID: SCR_002798, La Jolla, CA, EUA). As variáveis contínuas foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças de função entre os grupos Nx5/6 e sham foram analisadas usando um teste t de Student não pareado. Para comparação da curva de sobrevivência entre os grupos sham e Nx5/6 foi utilizado o teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon. Os efeitos da infusão de solução salina ou NPCdc na pressão arterial média e na frequência cardíaca dentro dos grupos foram avaliados usando testes t de Student pareado. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância bidirecional (two-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak, onde um fator foi o tratamento (solução salina ou NPCdc) e o outro foi o grupo animal (sham ou Nx5/6). Quando apropriado, análise de variância unidirecional (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak foram usados para as análises estatísticas. Os resultados são apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (E. P. M). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas com $P < 0,05$.

Tabela 2 – Descrição dos anticorpos utilizados no western blotting e suas respectivas concentrações de uso.

Proteína	Anticorpo primário (Fabricante)	Diluição	Anticorpo secundário (Fabricante)	Diluição
ERK1/2	ERK1/ERK2 monoclonal antibody: (Thermo Fisher Scientific Cat# 13-6200, RRID: AB_2533024)	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP conjugate (Merck Millipore Cat# AP307P, RRID: AB_92)	1:3000
p-ERK	Phospho-ERK1/ERK2 (Thr202, Tyr204) monoclonal antibody (Thermo Fisher Scientific Cat# MA5-15174, RRID: AB_10980347)	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP conjugate (Merck Millipore Cat# AP307P, RRID: AB_92)	1:3000
AKT	AKT1 monoclonal antibody (Thermo Fisher Scientific: Cat# MA5-14898, RRID: AB_10983391)	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP conjugate (Merck Millipore Cat# AP307P, RRID: AB_92)	1:3000
p-AKT	Phospho-AKT1 (Ser473) monoclonal antibody (Thermo Fisher Scientific Cat# OMA1-03061, RRID: AB_557533)	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP conjugate (Merck Millipore Cat# AP307P, RRID: AB_92)	1:3000
nNOS	Anti-nNOS/NOS I antibody: 07-571-I (Merck Millipore Cat# 07-571, RRID: AB_310722)	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP conjugate (Merck Millipore Cat# AP307P, RRID: AB_92)	1:3000
p-nNOS	Human nNOS (neuronal) (phospho S1417) (Abcam Cat# ab5583, RRID: AB_304964)	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP conjugate (Merck Millipore Cat# AP307P, RRID: AB_92)	1:3000
eNOS	Anti-eNOS/NOS III (Merck Millipore Cat# 07-520, RRID: AB_310684)	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP conjugate (Merck Millipore Cat# AP307P, RRID: AB_92)	1:3000
p-eNOS	p-NOS3 antibody (Ser 1177) (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-12972, RRID: AB_653178)	1:1000	Anti-goat IgG (Abcam Cat# ab6741, RRID: AB_955424)	1:4000
p-iNOS	Anti-iNOS (phospho Y151): Cat# ab182640, RRID: AB_10697752 (Abcam)	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP conjugate (Merck Millipore Cat# AP307P, RRID: AB_92)	1:3000
cGKI α / β	cGKI α / β (G-3) monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-271766, RRID: AB_10709434)	1:200	Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP (Thermo Fisher Scientific Cat# 62-6520, RRID: AB_2533947)	1:3000
β -actina	beta Actin Loading Control monoclonal antibody: Cat# MA5-15739, RRID: AB_10979409 (Thermo Fisher Scientific)	1:5000	Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP (Thermo Fisher Scientific Cat# 62-6520, RRID: AB_2533947)	1:5000

4 RESULTADOS

4.1 MODELAGEM DO NPCdc

O valor de BFP analisado pelo I-TASSER, foi deduzido a partir de templates de proteínas do PDB em combinação com perfis de sequências derivadas de bancos de dados. O BFP apresentado na figura 11 corresponde ao fator B normalizado da proteína alvo. Observa-se que a sequência avaliada apresenta valores satisfatórios de BPF para os 33 resíduos de aminoácidos, garantindo uma maior precisão da estrutura secundária predita. Os valores de BPF para a sequência do NPCdc variaram de -0,04 a 2,05 sendo predominantes as estruturas desordenadas (coil) e folhas β (strand).

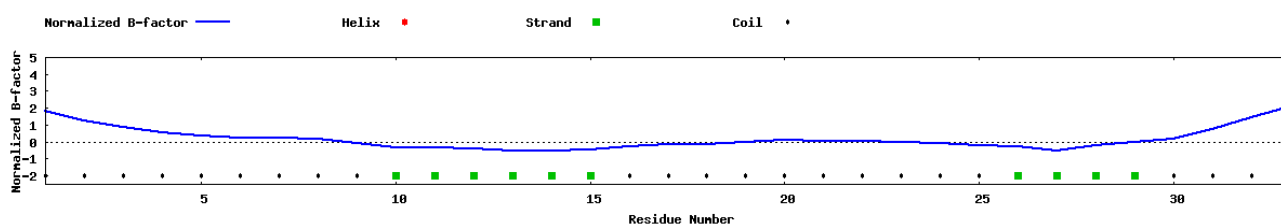


Figura 11 – Parâmetro B-factor profile (BPF) para a predição da estrutura secundária da sequência do NPCdc.

Após o alinhamento, o programa I-TASSER gerou os cinco melhores modelos 3D para a sequência avaliada (Figura 12). A confiança de cada modelo é medida quantitativamente pelo C-score, que varia de -5 a 2, onde um C-score de um valor mais alto significa um modelo com maior confiança e vice-versa. Dentre os modelos previstos, foi considerado o melhor modelo o que apresentou um C-score = -0,51, ou seja, o Modelo 1.

Com base no valor de C-score e no comprimento do peptídeo foi possível estimar os valores do TM-score e do RMSD, parâmetros que são usados para comparar estruturas no PDB e assim relacionar função. Para o Modelo 1 foram estimados valores de TM-score = 0.65 ± 0.13 e RMSD = $2.8 \pm 2.0\text{\AA}$.

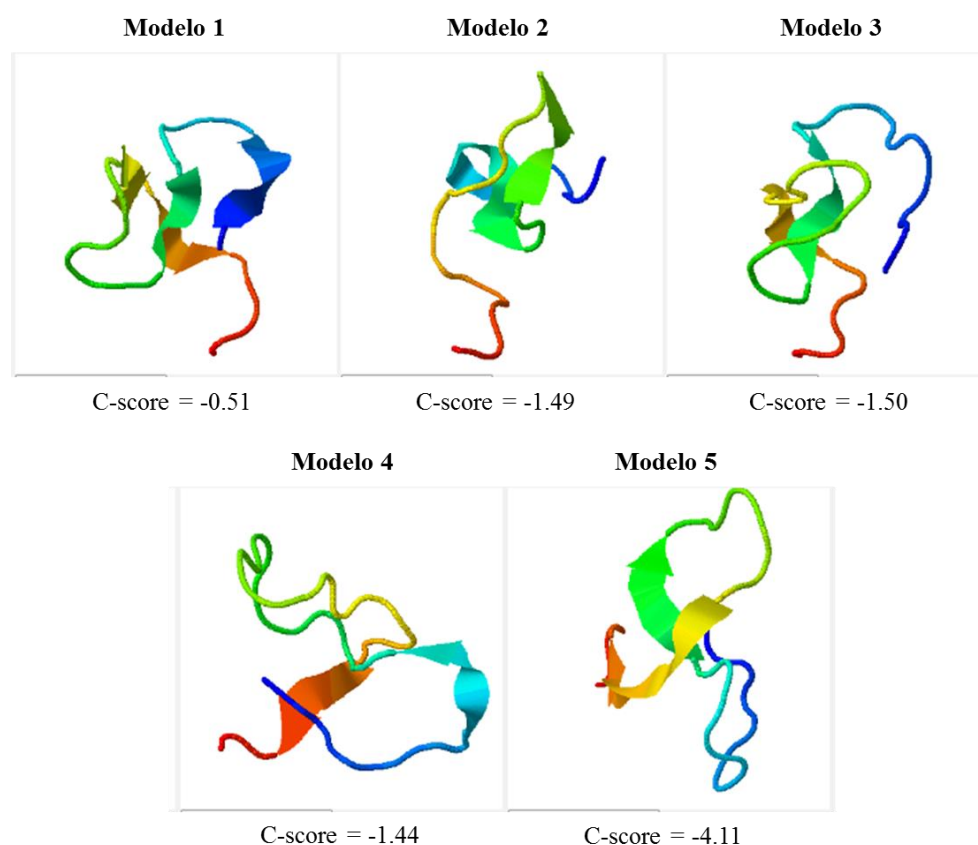


Figura 12 – Modelos 3D do NPCdc gerados pelo programa I-TASSER. O C-score corresponde à precisão dos modelos das estruturas obtidas pelo I-TASSER.

Na tabela 3 estão identificadas estruturas análogas ao NPCdc. Conforme valor do TM-score as proteínas são classificadas. Quanto mais próximo o valor de TM-score entre as estruturas conhecidas no PDB e o NPCdc, maior a semelhança estrutural.

Tabela 3 – Proteínas baseada no TM-score do alinhamento estrutural entre o NPCdc e as estruturas conhecidas no PDB.

Rank	PDB Hit	TM-score	RMSD ^a	IDEN ^a	Cov
1	1q01A	0,503	2,21	0,375	0,818
2	3sumA	0,402	2,87	0,097	0,939
3	1itkB	0,396	2,51	0,103	0,818
4	2b2qB	0,396	2,39	0,067	0,849
5	1mwvA1	0,396	2,38	0,067	0,849
6	3ut2A	0,372	2,53	0,067	0,849
7	2ccdB	0,371	2,38	0,069	0,818
8	1g81A	0,370	2,25	0,034	0,727
9	1k2yX	0,370	3,16	0,094	0,970

RMSD^a é o RMSD entre resíduos estruturalmente alinhados pelo TM-align; IDEN^a é a identidade percentual da sequência na região estruturalmente alinhada; Cov representa a cobertura do alinhamento por alinhar pelo TM-align e é igual ao número de resíduos estruturalmente alinhados dividido pelo comprimento da proteína de consulta.

4.2 ENSAIO DE INIBIÇÃO DO NPCdc

A constante de afinidade (K_M) do peptídeo NPCdc foi estimada através de ensaios de inibição utilizando a NEP recombinante, frente ao substrato fluorogênico Abz-(d)Arg-Gly-Leu-Eddnp. O peptídeo apresentou boa afinidade frente à NEP com um $K_M = 1,50 \mu\text{M}$, a curva de inibição (Figura 13) corresponde a um inibidor competitivo linear simples, o que indica que este peptídeo interage com o centro catalítico da NEP e pode ser reconhecido como substrato.

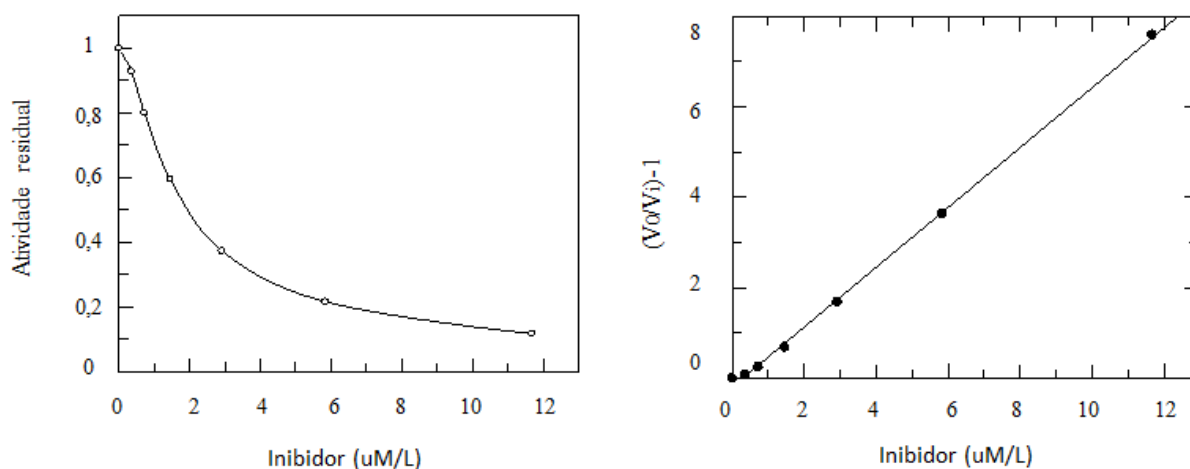


Figura 13 – Determinação da constante de inibição (K_i) do NPCdc na atividade hidrolítica da endopeptidase neutra (NEP). Os ensaios foram realizados utilizando o substrato FRET Abz- (d) Arg-Gly-Leu-Eddnp. Inserção: atividade residual na presença de diferentes concentrações de inibidores.

4.3 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

A redução de massa renal pela nefrectomia 5/6 é um modelo de doença renal crônica, bem estabelecido em ratos. Contudo, há uma variação em relação ao tempo do protocolo experimental. Por isso, inicialmente foi realizada uma curva de sobrevivência, na qual os animais foram monitorados diariamente durante 30 dias. Os resultados demonstraram que da forma realizada e padronizada neste estudo, a cirurgia da Nx5/6 causou a morte de 20% dos animais em até 15 dias (Figura 14). Os óbitos foram confirmados em dias distintos após a cirurgia. Os animais que morreram durante o procedimento cirúrgico ou devido o uso dos anestésicos não foram contabilizados para a avaliação da curva de sobrevivência.

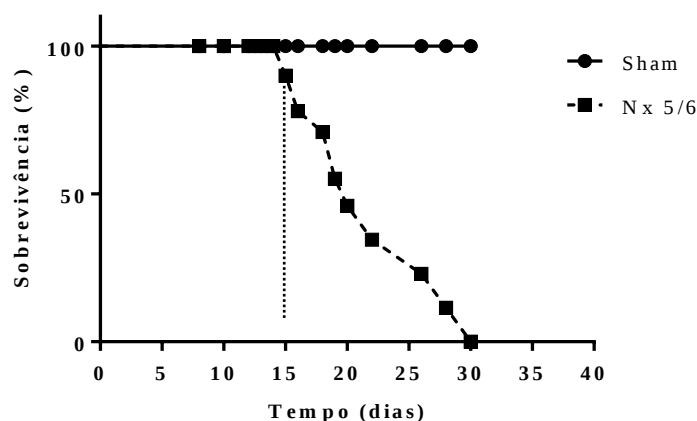


Figura 14 – Curva de sobrevivência dos animais após a cirurgia de nefrectomia 5/6 (Nx5/6). Os animais foram monitorados diariamente durante 30 dias (n=42). Resultados são expressos em % de sobrevivência. $p < 0,05$ grupo experimental quando comparados entre si (teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE DRC

A tabela 1 resume os parâmetros de função geral e renal dos grupos Nx5/6 e sham no 13º dia após a cirurgia. Os animais Nx5/6 apresentaram menor peso corpóreo (16%, $P < 0,01$) e menor balanço hídrico (70% $P < 0,01$) quando comparados aos animais sham. Por outro lado, o fluxo urinário, a excreção protéica urinária e os níveis séricos de ureia e creatinina aumentaram (60%, 124%, 51% e 100%, respectivamente, $P < 0,05$) no grupo Nx5/6 em comparação ao grupo sham. Além disso, a depuração da creatinina, um estimador da taxa de filtração glomerular, diminuiu (55%, $P < 0,05$) no grupo Nx5/6 em comparação ao grupo sham. Além da disfunção renal, o índice cardíaco foi 44% ($P < 0,0001$, teste t de Student não pareado) maior no grupo Nx5/6 do que no grupo sham (Nx5/6: $0,39 \pm 0,01$ e sham: $0,27 \pm 0,01\%$).

Tabela 4 – Parâmetros metabólicos avaliados no 13º dia após a nefrectomia 5/6 (Nx5/6)

	Sham (n=17)	Nx5/6 (n=18)	t	d.f.	P valor
Peso corpóreo (g)	337 ± 10	$284 \pm 10^*$	3,449	11	0,005
Ingestão hídrica (mL/100g/12h)	$9,2 \pm 0,6$	$7,7 \pm 1,3$	0,758	10	NS
Fluxo urinário (mL/100g)	$3,8 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,7^*$	2,326	11	0,040
Balanço hídrico (mL/100g)	$5,4 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,9^*$	3,122	11	0,009
Ureia sérica (mg/dL)	$56,7 \pm 8,6$	$85,7 \pm 9,9^*$	2,027	11	0,047
Creatinina sérica (mg/dL)	$0,4 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1^*$	2,812	11	0,016
C_{Cr} (mL/100g/min)	$0,9 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1^*$	2,568	11	0,026
Proteína urinária (mg/100g/12h)	$7,8 \pm 1,3$	$17,5 \pm 2,9^*$	2,492	11	0,029

Os valores apresentados expressam a média $\pm$ EPM. Cr, creatinina; C_{Cr} , clearance de creatinina. A análise estatística usada entre os grupos foi o teste t de Student. * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham. NS, não significante.

4.5 EFEITOS DO NPCdc SOBRE PARÂMETROS CARDIORRENAIS

4.5.1 Pressão arterial e frequência cardíaca

As figuras 15A e 15B mostram a pressão arterial média e a frequência cardíaca avaliadas no início e nos últimos 40 minutos de uma solução salina contínua de 70 minutos ou infusão de NPCdc, respectivamente. Duas semanas após a cirurgia, o grupo Nx5/6 apresentou pressão arterial média basal mais alta de 47 mmHg ($P < 0,001$, two-way ANOVA) do que o grupo sham. O NPCdc diminuiu a pressão arterial média nos grupos sham e Nx5/6 (48 e 69 mmHg, respectivamente, $P < 0,001$, teste t de Student pareado, análise estatística dentro dos grupos, linhas tracejadas de barras preenchidas na figura 15A). A redução induzida pelo NPCdc na pressão arterial média foi mais consistente no grupo Nx5/6 do que no grupo sham (32 e 14 mmHg, respectivamente, $P < 0,001$, two-way ANOVA, figura 15A). A administração de solução salina combinada com condições experimentais, como anestesia e laparotomia, também diminuiu a pressão arterial média nos grupos sham e Nx5/6 (29 e 35 mmHg, respectivamente, $P < 0,001$, teste t de Student pareado, análise estatística dentro dos grupos, linhas tracejadas de barras vazias na figura 15A).

A frequência cardíaca basal foi semelhante entre os grupos sham e Nx5/6 (357 e 370 bpm, respectivamente, $P > 0,05$, figura 15B). O NPCdc reduziu a frequência cardíaca no grupo sham (28 bpm, $P < 0,001$, teste t de Student pareado, análise estatística dentro dos grupos, linhas tracejadas das barras preenchidas na figura 15B) em comparação ao valor basal, mas não no grupo Nx5/6 ($P > 0,05$, teste t de Student pareado, análise estatística dentro dos grupos, figura 15B). Embora o efeito do NPCdc na frequência cardíaca no grupo Nx5/6 não tenha sido estatisticamente significativo em comparação com o valor basal, a frequência cardíaca do grupo Nx5/6 tratado com NPCdc foi significativamente menor do que o grupo Nx5/6 tratado com solução salina (28 bpm, $P < 0,05$, two-way ANOVA). A infusão de solução salina combinada com condições experimentais, como anestesia e laparotomia, diminuiu a frequência cardíaca do grupo sham (44 bpm, $P < 0,05$, teste t de Student pareado, linhas

tracejadas de barras vazias, figura 15B), mas não mudou a frequência cardíaca do grupo Nx5/6 (teste t de Student pareado, figura 15B).

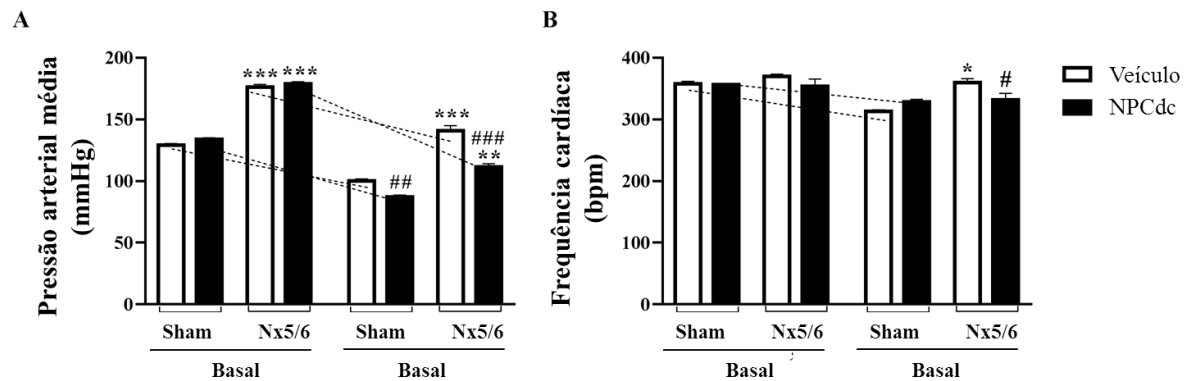


Figura 15 – Pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) antes e durante a infusão de solução salina ou NPCdc. Parâmetros medidos nos grupos sham e nefrectomizados (Nx5/6) medidos antes e durante os últimos 40 minutos da infusão de solução salina (100 µl/kg/min) ou NPCdc (7,5 µg/kg/min). Os dados são relatados como médias ± E.P.M., n = 8 a 11 animais por grupo. Os parâmetros foram comparados entre grupos (barras) usando two-way ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Holm-Sidak e foram comparados dentro de grupos (final vs. linha de base, linhas tracejadas acima das barras) usando testes t de Student emparelhados. A ausência de linhas tracejadas sobre barras indica que o veículo ou NPCdc não afetou o parâmetro. * P <0,05 e *** P <0,001: vs. sham; #P <0,05, ## P <0,01 e ### P <0,001: vs. veículo.

4.5.2 Variabilidade da frequência cardíaca

A tabela 5 resume os principais achados de variabilidade da frequência cardíaca. No basal, o grupo Nx5/6 não mostrou nenhuma alteração nos parâmetros do domínio do tempo. No entanto, este grupo apresentou VLF reduzida no domínio da frequência (28%, P <0,05), acompanhada de uma tendência à diminuição da LF (P = 0,09) em comparação com o grupo sham. Após 30 a 35 minutos do início da infusão contínua de NPCdc, o pRR50% no domínio do tempo aumentou nos grupos sham e Nx5/6. No entanto, essa diferença não era mais evidente aos 65-70 minutos após o início da infusão contínua de NPCdc. Por outro lado, a infusão de NPCdc não afetou o SD HR no domínio do tempo em 30 a 35 minutos, mas aumentou (79%, P <0,05) esse parâmetro em 65 a 70 minutos no grupo Nx5/6. A HF no domínio da frequência não foi afetada pela nefrectomia ou pelo NPCdc.

Tabela 5 – Análise de variabilidade da frequência cardíaca

	Sham		Nx 5/6		Teste t	
Basal				<i>t</i>	d.f.	<i>P</i> value
SD HR (1/min)	52.9 ± 7.0		45.3 ± 5.6	0.415	16	NS
pRR50 (%)	3.0 ± 2.1		1.0 ± 0.9	0.773	16	NS
VLF (%)	6.7 ± 0.6		4.8 ± 0.6	2.073	33	0.046
LF (%)	17.1 ± 1.7		12.7 ± 1.9	1.708	33	0.097
HF (%)	60.0 ± 1.5		59.3 ± 2.0	0.243	33	0.809
Two-way ANOVA						
	Veículo	NPCdc	Veículo	NPCdc	Nx5/6	NPCdc
30 – 35 min						
após o início da						
infusão						
SD HR (1/min)	48.4 ± 10.5	59.0 ± 9.9	37.6 ± 9.6	46.1 ± 11.8	NS	NS
pRR50 (%)	0.05 ± 0.02	5.7 ± 1.0	0.04 ± 0.02	2.7 ± 1.0	0.079	<0.001
VLF (%)	4.9 ± 1.0	7.6 ± 2.0	7.5 ± 2.0	5.0 ± 1.3	NS	NS
LF (%)	14.4 ± 1.9	16.3 ± 2.2	12.6 ± 2.1	13.4 ± 3.0	NS	NS
HF (%)	61.9 ± 1.5	60.6 ± 2.5	61.6 ± 2.3	64.8 ± 2.6	NS	NS
65 – 70 min						
após o início da						
infusão						
SD HR (1/min)	48.4 ± 10.5	61.4 ± 0.2	37.6 ± 9.6	67.7 ± 11.2	NS	0.047
pRR50 (%)	0.05 ± 0.02	0.06 ± .02	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.02	NS	NS
VLF (%)	4.9 ± 1.0	6.05 ± 0.6	7.5 ± 2.0	6.9 ± 1.3	NS	NS
LF (%)	14.4 ± 1.9	18.1 ± 1.5	12.6 ± 2.1	16.1 ± 2.5	NS	NS
HF (%)	62.0 ± 1.5	60.0 ± 1.4	61.0 ± 2.5	60.0 ± 1.5	NS	NS

SD HR, desvio padrão da frequência cardíaca; pRR50, percentagem de intervalos NN consecutivos cuja diferença é superior a 50ms; VLF, frequência muito baixa (0–0.2 Hz); LF, frequência baixa (0.2–0.75 Hz); HF, frequência alta (0.75–2.5 Hz); Os resultados são expressos como média ± EPM, referentes a um n = 8-11 animais por grupo. As diferenças estatísticas foram avaliadas por two-way ANOVA, seguida pelo teste de Holm-Sidak's para múltiplas comparações. NS, não significante.

4.5.3 Hemodinâmica renal

Os parâmetros hemodinâmicos renais avaliados durante os últimos 40 minutos da infusão contínua de NPCdc de 70 minutos são apresentados na figura 16. Consistente com a pressão arterial média elevada, o grupo Nx5/6 apresentou níveis significativamente mais altos de resistência vascular renal (Figura 16) , juntamente com redução do fluxo sanguíneo renal, fluxo plasmático renal e taxa de filtração glomerular (Figura 16B, C e D, respectivamente) em comparação com o grupo sham. A fração de filtração não foi alterada no grupo Nx5/6 em comparação com o grupo sham (Figura 16E). O tratamento com NPCdc reduziu

significativamente a resistência vascular renal (Figura 16A), não alterou o fluxo sanguíneo renal e o fluxo plasmático renal (Figura 16B e C, respectivamente) e aumentou a taxa de filtração glomerular e a fração de filtração (Figura 16D e E, respectivamente). Da mesma forma, a fração de excreção de Na^+ e K^+ foram aumentadas por NPCdc no grupo Nx5/6, mas as excreções urinárias de Na^+ e K^+ não foram alteradas (Tabela 6).

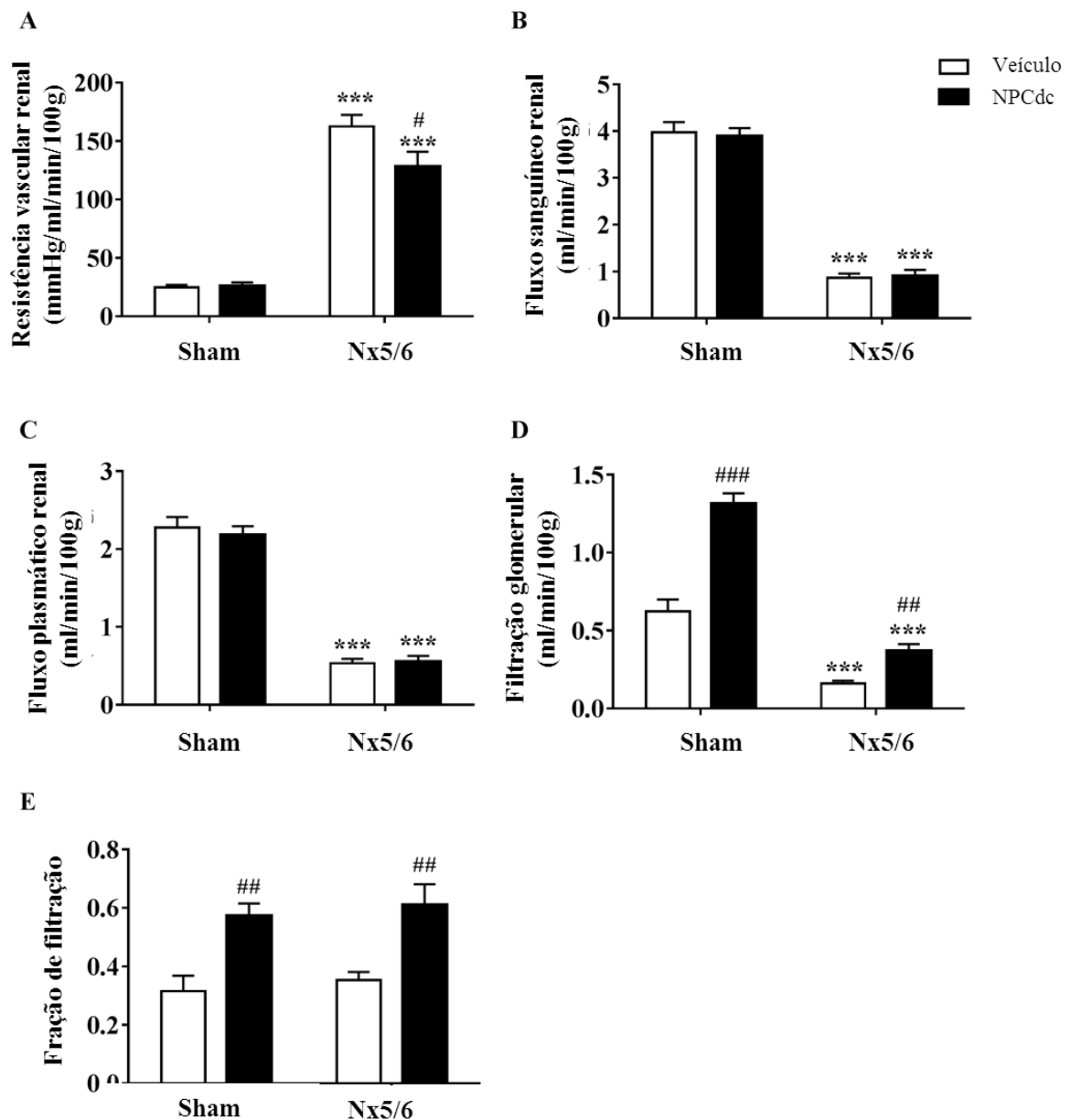


Figura 16 – Parâmetros hemodinâmicos renais nos grupos sham e Nx5/6 durante a infusão de solução salina ou NPCdc. A hemodinâmica renal foi avaliada nos últimos 40 minutos de uma infusão de 70 minutos de veículo (solução salina, 100 $\mu\text{l/kg/min}$) ou NPCdc (7,5 $\mu\text{g/kg/min}$). (A) resistência vascular renal; (B) fluxo sanguíneo renal; (C) fluxo plasmático renal; (D) taxa de filtração glomerular; (E) fração de filtração. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M., $n = 8-11$ animais por grupo. Os resultados foram analisados usando two-way ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Holm-Sidak. *** $P < 0,001$: vs. sham; # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$: vs. veículo.

Tabela 6 – Concentração plasmática e urinária dos íons sódio e potássio após administração do veículo ou NPCdc

	Sham ¹		Nx5/6	One-way ANOVA	
	Veículo	Veículo	NPCdc	Sham vs. Nx5/6	Veículo vs. NPCdc
Fluxo urinário (µl/min/100g)	3,22±0,29	5,28±0,29	5,85±0,38	<0,001	0,030
Excreção de Na ⁺ urinário (mmol/min/100g)	0,22±0,02	0,59±0,09	0,36±0,06	0,011	NS
Excreção de K ⁺ urinário (mmol/min/100g)	0,43±0,02	0,45±0,03	0,37±0,04	NS	NS
Na ⁺ plasmático (mmol/l)	146,40±3,92	167,00±5,42	151,8±6,35	NS	NS
K ⁺ plasmático (mmol/l)	5,30±0,29	5,10±0,26	4,49±0,22	NS	NS
Fração de excreção de Na ⁺	0,3±0,1	0,8±0,4	1,3±1,8	NS	0,002
Fração de excreção de K ⁺	16,7±4,3	21,0±1,6	33,8±4,2	NS	0,040

Os valores apresentados expressam a média ± EPM. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. ¹Amostras do grupo sham tratadas com NPCdc foram perdidas.

Após a avaliação da hemodinâmica renal, o coração e o rim dos animais foram coletados e pesados. O grupo Nx5/6 mostrou um aumento no índice renal (26% P<0.001) e no índice cardíaco (44% P<0.0001) quando comparado ao grupo sham (Tabela 7).

Tabela 7 – Parâmetros avaliados no 15º dia após a Nx5/6

	Sham		Nx5/6		Two-way ANOVA	
	Veículo	NPCdc	Veículo	NPCdc	Nx5/6	NPCdc
Peso corpóreo (g)	379±14	360±18	287±15	302±12	<0,001	0,907
Peso renal (g)	1,3±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1	1,2±0,1	0,760	0,273
Índice renal (%)	0,3±0,1	0,3±0,1	0,5±0,1	0,4±0,1	0,001	0,227
Peso cardíaco (g)	1,0±0,1	1,0±0,1	1,19±0,1	1,06±0,1	0,081	0,264
Índice cardíaco (%)	0,3±0,1	0,3±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1	<0,001	0,123

Os valores apresentados expressão a média ± EPM. Os dados foram analisados por two-way ANOVA seguido pelo teste de Holm-Sidak's para múltiplas comparações. n=8–11 por grupo.

4.5.4 ATPases transportadoras de Na⁺ no túbulo proximal renal

As enzimas Na⁺/K⁺-ATPase e Na⁺-ATPase, presentes na membrana basolateral, são responsáveis pelo transporte tubular proximal de Na⁺. A atividade da Na⁺/K⁺-ATPase foi reduzida (45% P <0,0001) no grupo Nx5/6 em comparação com o grupo sham (Figura 17A), e a atividade da Na⁺-ATPase permaneceu inalterada (Figura 17B). Por outro lado, o NPCdc diminuiu a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (23% P <0,05) no grupo sham (Figura 17A) e aumentou a atividade da Na⁺-ATPase nos grupos sham (47%, P<0,05) e Nx5/6 (64% P <0,05 (Figura 17B).

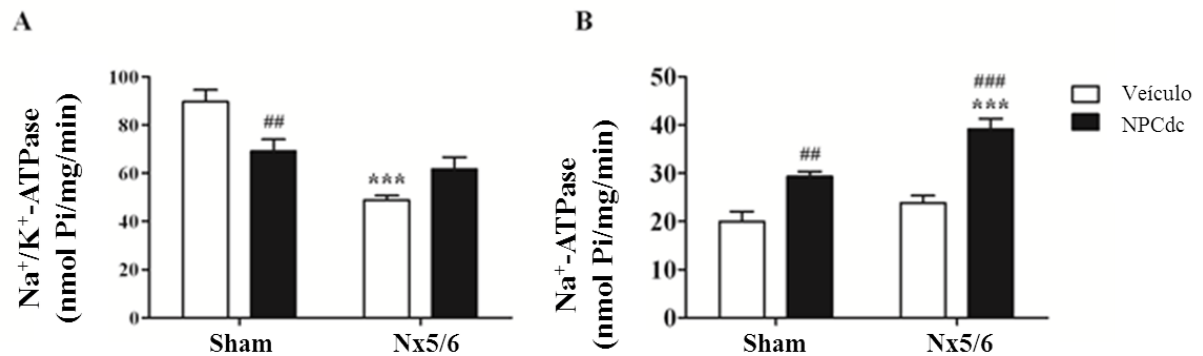


Figura 17 – Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase e Na⁺-ATPase no túbulo proximal renal após infusão do NPCdc. Ratos nefrectomizados (Nx5/6) ou sham, submetidos à administração intravenosa do NPCdc (7.5µg/kg/min) ou veículo (salina). Os resultados são expressos como média ± EPM, referentes a um n=8-11 animais por grupo. As diferenças estatísticas foram avaliadas por two-way ANOVA, seguida pelo teste de Holm-Sidak's para múltiplas comparações. *P<0,05 e ***P<0.001 VS. veículo.

4.5.5 Níveis de ânion superóxido renal

Os efeitos da nefrectomia e NPCdc nos níveis de O₂^{•-} basal e estimulado por NADPH são mostrados na figura 18. Um aumento de 2 vezes nos níveis de O₂^{•-} basal foi observado no grupo Nx5/6 em comparação ao grupo sham (Figura 18A). Além disso, a atividade da NADPH oxidase também foi aumentada (131%, P <0,05) no grupo Nx5/6 em comparação com o grupo sham (Figura 18B). NPCdc reduziu a atividade da NADPH oxidase (26%, P <0,05) no grupo Nx5/6 (Figura 18B); no entanto, os níveis basais de O₂^{•-} não mudaram (Figura 18A). Por outro lado, o NPCdc não afetou os níveis de O₂^{•-} basais ou dependentes da NADPH oxidase - nos rins do grupo sham (Figura 18A e B).

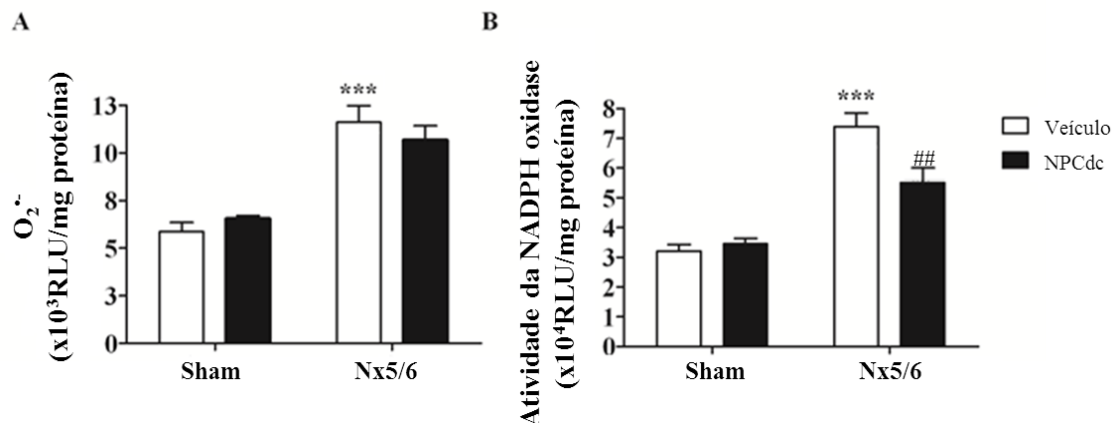


Figura 18 – (A) Níveis basais de ânion superóxido (O₂^{•-}) e (B) atividade de NADPH oxidase no rim após a infusão de solução salina ou NPCdc. Os grupos sham e Nx5/6 foram submetidos a uma injeção intravenosa

contínua de veículo (solução salina, 100 µl/kg/min) ou NPCdc (7,5µg/kg/min) por 70 min imediatamente antes dos rins serem removidos. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M., n = 6-8 diferentes amostras. Os resultados foram analisados utilizando-se ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações Holm-Sidak. *** P <0,001: vs. sham; ## P <0,01: vs. veículo.

4.6 EFEITOS DO NPCdc SOBRE A SINALIZAÇÃO CELULAR DA AORTA

4.6.1 Atividade da NADPH oxidase, níveis de NO e de cGKI

Os efeitos da nefrectomia e NPCdc nos níveis de $O_2^{\cdot-}$ dependentes de NADPH oxidase são mostrados na figura 22A. A nefrectomia resultou em um aumento de 1,4 vezes na produção de $O_2^{\cdot-}$ estimulada pela NADPH oxidase em aortas torácicas do grupo Nx5/6 em comparação com aortas sham. O NPCdc atenuou (42%, P <0,05) a produção de $O_2^{\cdot-}$ estimulado pela NADPH oxidase em aortas do grupo Nx5/6. Por outro lado, o NPCdc não afetou a atividade da NADPH oxidase no grupo sham (Figura 22A).

A concentração de nitrito [NO_2^-] foi usada para determinar os níveis de NO na aorta torácica (Figura 22B). As amostras da aorta torácica do grupo Nx5/6 continham menores [NO_2^-] (71%, P <0,001) do que os animais sham. O NPCdc aumentou [NO_2^-] nos grupos sham e Nx5/6 (66% e 166%, respectivamente, P <0,001) em comparação aos grupos tratados com veículo.

Como o NO ativa o sGC para produzir cGMP e o principal alvo do cGMP é a cGKI, os níveis da proteína cGKI na aorta torácica foram medidos. Os níveis da proteína cGKI foram reduzidos (48%, P <0,001) em aortas do grupo Nx5/6 (Figura 22C). Por outro lado, o NPCdc aumentou apenas os níveis de cGKI (82%, P <0,05) no grupo Nx5/6, mas não nas aortas torácicas do grupo sham.

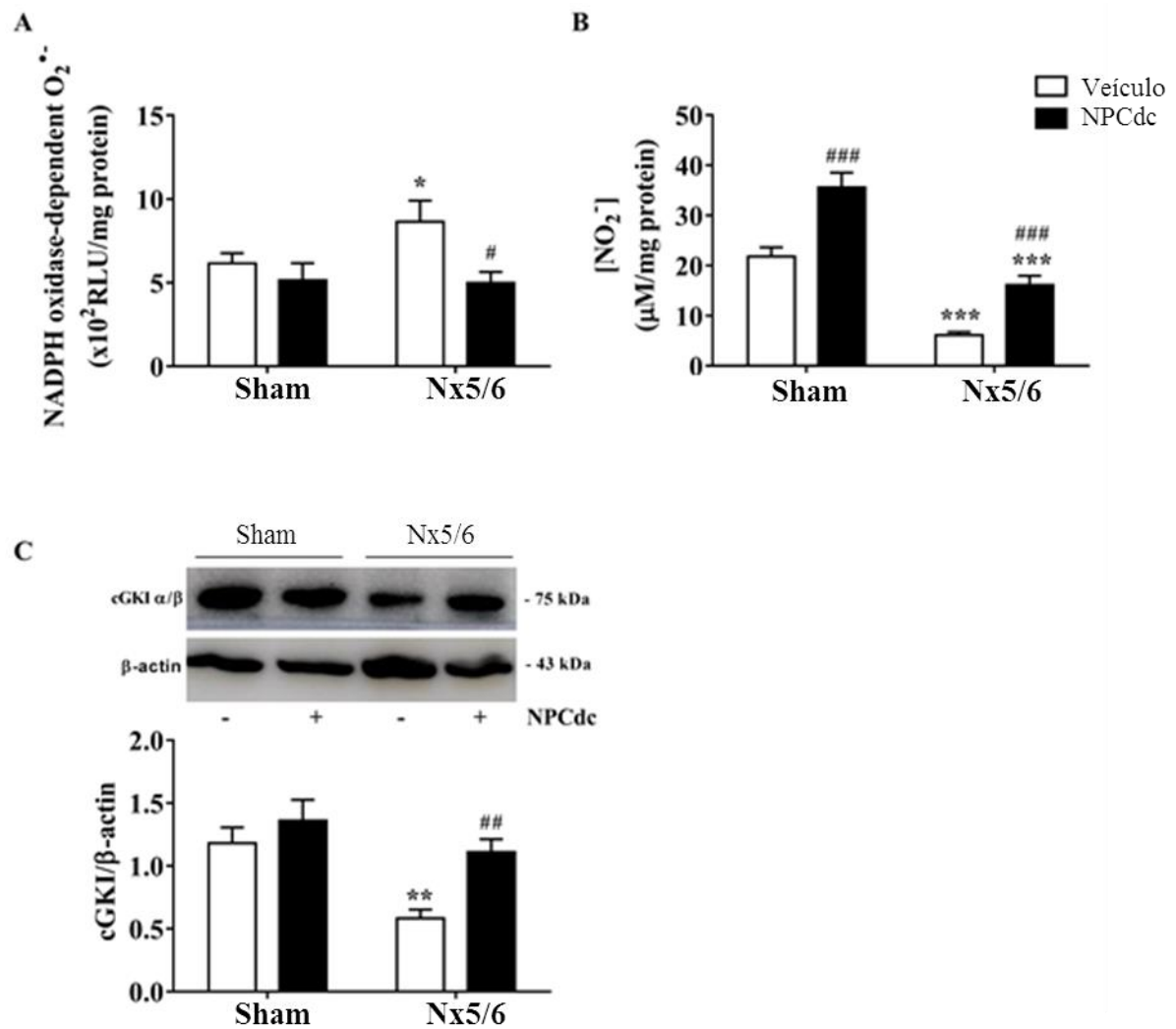
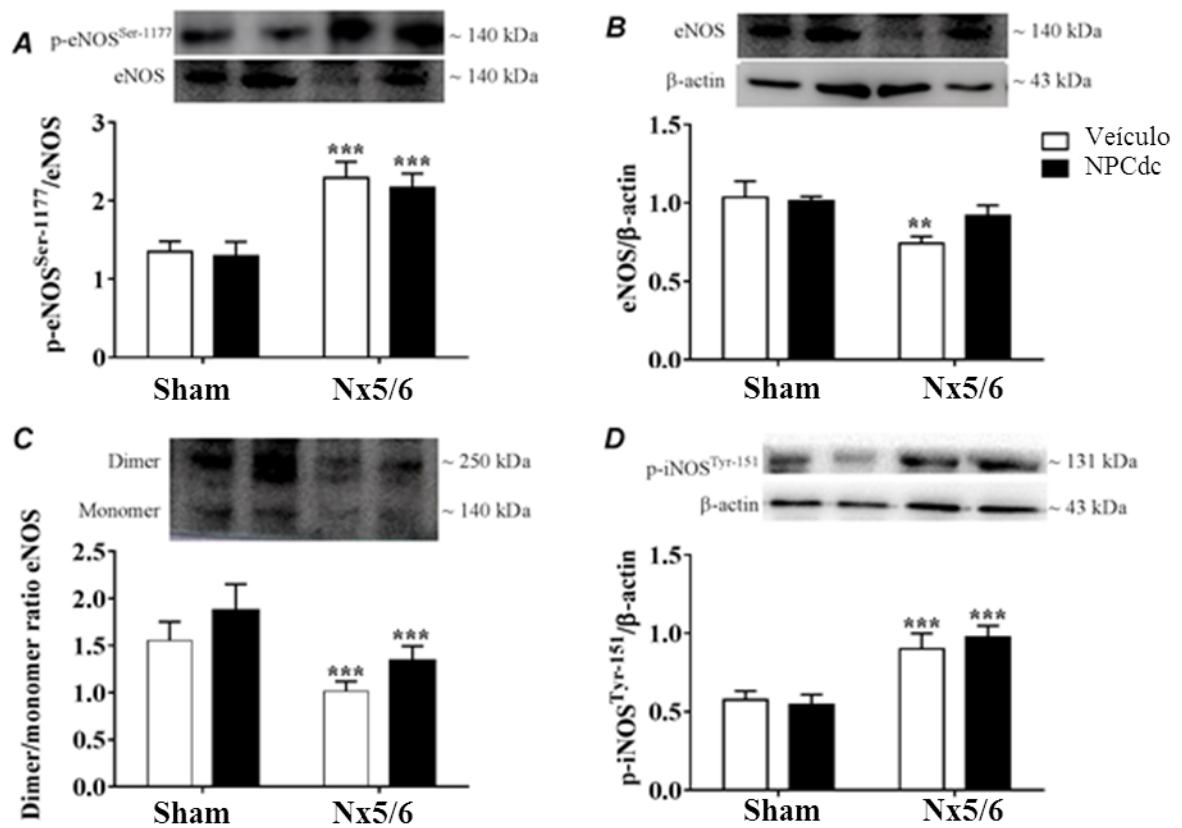


Figura 19 – (A) Atividade da NADPH oxidase, (B) concentração de nitrito $[NO_2^-]$ e (C) dos níveis de proteína quinase dependente de cGMP (cGKI) na aorta torácica após a infusão de solução salina ou NPCdc. Os grupos sham e Nx5/6 foram submetidos a uma infusão intravenosa contínua de veículo (solução salina, 100 μ l/kg/min) ou NPCdc (7,5 μ g/kg/min) por 70 min imediatamente antes da aorta torácica ser coletada. Imunoblots representativos para cGKI e β -actina são mostrados acima dos gráficos de barra em (C). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M $n = 6-8$ amostras diferentes. Os resultados foram analisados usando two-way ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações de Holm-Sidak. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$: vs. sham; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$: vs. veículo.

4.6.2 Expressão da eNOS, nNOS e iNOS

Uma vez que os níveis de $[NO_2^-]$ na aorta torácica foram modulados tanto pela nefrectomia quanto pelo NPCdc, os níveis de eNOS e nNOS total, bem como os sítios de fosforilação da eNOS^{Ser-1177} e nNOS^{Ser-1417} também foram investigados (Figura 21). Além disso, é sabido que a nefrectomia aumenta a expressão da iNOS e exacerba a inflamação na aorta (AIELLO et al., 1997). A lesão nos vasos contribui para a progressão da doença renal

crônica. Portanto, o p-iNOS^{Tyr-151} foi investigado (Figura 21D). A razão p-eNOS^{Ser-1177}/eNOS (Figura 21A) aumentou no grupo Nx5/6, enquanto a expressão total da eNOS (Figura 21B) foi reduzida (29%, $P < 0,01$) no grupo Nx5/6 tratado com veículo. Embora a razão p-eNOS^{Ser-1177}/eNOS aumentou no grupo Nx5/6, a eNOS foi desacoplada, evidenciada pela razão dímero/monômero diminuída (Figura 21C). O NPCdc não afetou a razão p-eNOS^{Ser-1177}/eNOS em outros grupos. O grupo Nx 5/6 também apresentou níveis mais altos (58%, $P < 0,001$) de p-iNOS^{Tyr-151} (Figura 21D). Os níveis de p-nNOS^{Ser-1417}/nNOS foram semelhantes entre todos os grupos, enquanto os níveis totais de nNOS aumentaram no grupo sham tratado com NPCdc (Figura 21E e F, respectivamente).



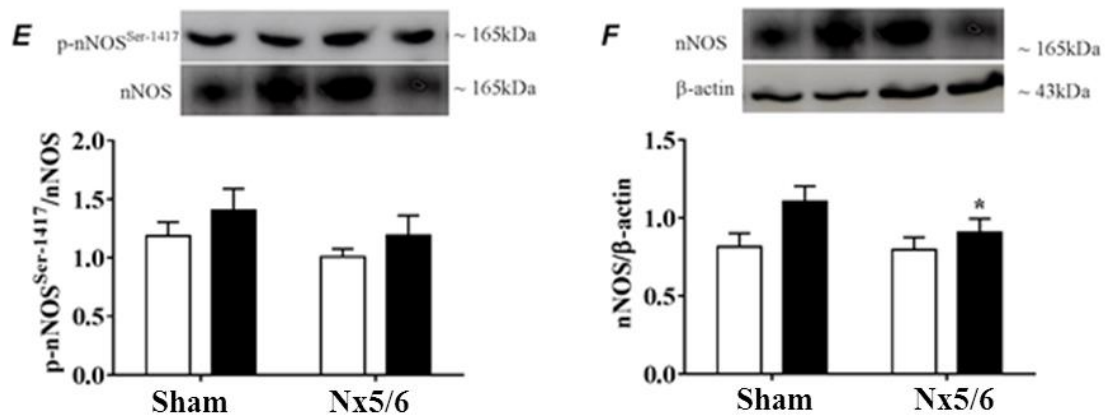


Figura 20 – Níveis de proteínas NOS na aorta torácica após a infusão de solução salina ou NPCdc. (A) p-eNOS^{Ser-1177}/eNOS, (B) níveis totais de eNOS, (C) razão dímero/monômero da eNOS, (D) níveis p-iNOS^{Tyr-151}, (E) razão p-nNOS^{Ser-1417}/nNOS, e (F) níveis totais de nNOS. Immunoblots representativos são mostrados acima dos respectivos gráficos. Os grupos sham e Nx5/6 foram submetidos a infusão intravenosa contínua do veículo (solução salina, 100 µl/kg/min) ou NPCdc (7,5 µg/kg/min) por 70 minutos imediatamente antes da coleta da aorta torácica. Os dados são apresentados como média ± E.P.M., n = 5-7 amostras diferentes. Os resultados foram analisados por two-way ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações de Holm-Sidak. ** P < 0,01 e *** P < 0,001: vs. sham. A avaliação densitométrica de todos os blots foi quantitativa e estatisticamente reproduzida em uma segunda medição.

4.6.3 Expressão da AKT e ERK1/2

As vias de sinalização da AKT e da ERK1/2 também foram avaliadas por estarem envolvidas na sinalização do NO. A razão p-AKT^{Ser-473}/AKT foi semelhante entre os grupos (Figura 20A), enquanto os níveis totais de AKT diminuíram (27%, P < 0,01) no grupo Nx5/6, independentemente do tratamento (Figura 20B). O NPCdc aumentou significativamente a razão p-ERK1/2^{Thr-202/Tyr-204}/ERK1/2 nos grupos sham e Nx5/6 (68% e 46%, respectivamente, P < 0,001, figura 8C). Por outro lado, os níveis totais de ERK1/2 foram semelhantes entre os grupos (Figura 8D).

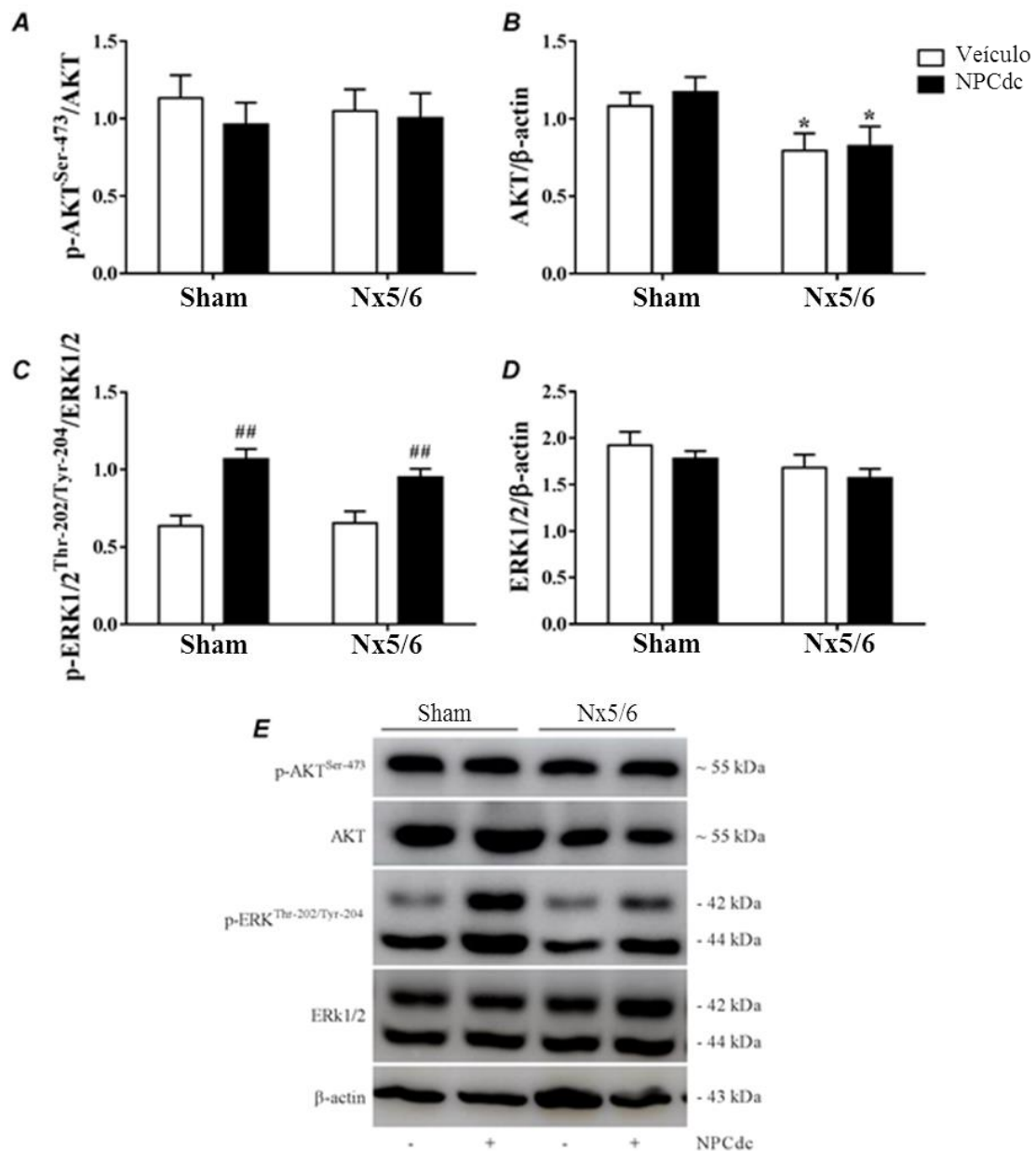


Figura 21 – Níveis das proteínas AKT e ERK1/2 na aorta torácica após infusão de solução salina ou NPCdc. (A) razão p-AKT^{Ser-473}/AKT, (B) níveis totais de AKT, (C) razão p-ERK1/2^{Thr-202/Tyr-204}/ERK, (D) níveis totais de ERK1/2 e (E) imunoblots representativos. Os grupos sham e Nx5/6 foram submetidos a uma infusão intravenosa contínua de veículo (solução salina, 100 µl/kg/min) ou NPCdc (7,5 µg/kg/min) por 70 minutos imediatamente antes da aorta torácica ser coletada. Os dados são apresentados como médias ± E.P.M., n = 7 ou 8 amostras. Os resultados foram analisados usando two-way ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações Holm-Sidak. *P<0,05: vs. sham; ## P <0,01: vs. veículo.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos o NPCdc, um peptídeo sintético, similar ao NPCasca obtido originalmente do veneno da *Crotalus durissus cascavella*. Este peptídeo foi sintetizado pela empresa GenOne que revelou a sequência “VSTSRGSQGCFGLKLDRIGAASGLGCWRRIVDS” similar à do NPCasca (EVANGELISTA, et al, 2008).

Para a modelagem molecular do NPCdc foi utilizada a sequência peptídica em formato FASTA (S441160) pelo programa I-TASSER. A validação do modelo proposto foi realizada no próprio servidor do I-TASSER através da verificação de diferentes parâmetros de precisão e confiança do modelo gerado (ROY et al., 2010). O procedimento foi totalmente automatizado, realizado através da combinação dos métodos de segmentação, modelagem *ab initio* e refinamento estrutural. A estrutura secundária foi desenvolvida através de simulações de alinhamento de fragmentos da sequência alvo com sequências existentes no PDB. A avaliação da confiança da estrutura predita foi estimada pelo parâmetro BFP. Para o NPCdc, os valores de BFP foram menores do que 2, garantindo uma maior precisão das estruturas secundárias preditas nos fragmentos analisados. Resíduos de aminoácidos com valores de BFP maiores do que 2 são considerados menos estáveis na estrutura experimental. Além disso, na estrutura secundária, as conformações mais frequentes foram as estruturas desordenadas (*coil*) e folhas β (*strand*), comuns a família dos PNs (MIMEAULT et al., 1995).

Os cinco melhores modelos 3D para o NPCdc foram gerados a partir de estruturas resolvidas por cristalografia disponíveis no PDB. O parâmetro utilizado para validar essa etapa foi o C-score que prevê a qualidade da modelagem, ou seja, determina quão distante estão às estruturas nativas e o modelo previsto (ROY et al., 2012). O Modelo 1 foi considerado o resultado mais confiável, uma vez que o valor de C-score = -0,51 foi o mais positivo dentre os modelos gerados. A identidade mínima de cada modelo com a sequência analisada foi maior que 25%. A precisão local dessa predição é definida como a distância de desvio (em Angstrom) entre as posições dos resíduos nos modelos e na estrutura nativa. O valor estimado de RMSD igual a 2.8 Å para o NPCdc prediz a posição de ligação dos átomos dos ligantes observadas experimentalmente e a prevista pelo algoritmo. Embora valores de RMSD inferiores a 2 Å sejam considerados garantia de um bom desempenho, a faixa de 2 -

3,5 Å é compatível com a resolução de Raio-X e adequa-se bem para dinâmicas moleculares (MUHAMMAD et al., 2014).

Adicionalmente, o valor de TM-score reforça a qualidade do modelo predito comparando a estrutura e função de *templates* de proteínas. Das estruturas confrontadas pelo TM-align, o peptídeo Lebetina (1q01) foi o que apresentou maior semelhança estrutural, com um valor de TM-score igual a 0,53, em comparação a 0,65 do NPCdc. A Lebetina é um potente inibidor da agregação plaquetária (MARRAKCHI et al., 2001), possui 38 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 3.954,44 Da. É sabido que devido à analogia estrutural, geralmente essas proteínas têm alvos similares. Isso foi confirmado pelas ações natriuréticas descritas para Lebetina (MOSBAH et al., 2019) e para o NPCasca (EVANGELISTA et al., 2008). Os resultados da modelagem molecular auxiliam na melhoria de parâmetros cinéticos e funcionais, uma vez que as interações entre o ligante e o alvo são conhecidas. Portanto são considerados fundamentais no planejamento de fármacos.

Como parâmetro farmacocinético, investigamos a interação do NPCdc com a NEP através da constante de afinidade (K_M). A NEP é uma metaloproteinase envolvida com o metabolismo de PNs endógenos (BAYES-GENIS; BARALLAT; RICHARDS, 2016). Os resultados revelaram um $K_M = 1,50 \mu\text{M}$, o que indica que este peptídeo interage com a NEP e pode ser reconhecido como substrato. O valor de K_M demonstra apenas a afinidade entre o ligante e o centro catalítico da enzima. O NPCdc possui uma afinidade maior pela NEP quando comparado aos PNs endógenos (hPNA-28, $K_M = 28,3 \mu\text{M}$; hPNB-32, $K_M = 102 \mu\text{M}$ e hPNC-22, $K_M = 12,4 \mu\text{M}$) (WATANABE et al., 1996). No entanto, não dá para inferir se o NPCdc é mais ou menos resistente a hidrólise pela NEP. Para isso, seria necessária a determinação da constante catalítica (K_{cat}). Quanto maior o valor de K_{cat} mais rápida é a hidrólise.

A melhor maneira de analisarmos diferentes substratos frente à mesma enzima é através da análise da eficiência catalítica obtida pela relação K_{cat}/K_m . Baseado nos parâmetros cinéticos para hidrólise dos peptídeos existe uma correlação entre eficiência catalítica e tempo de meia vida dos PNs endógenos. A hidrólise do hPNA-28 e do hPNC-22 apresenta eficiência catalítica similar (WATANABE et al., 1996) e tempo de meia vida em torno de 2 a 4 minutos (PANKOW et al., 2009), já o hPNB-32 apresenta eficiência catalítica significativamente menor que hPNA e hPNC (WATANABE et al., 1996), porém a meia-vida plasmática do

hPNB é consideravelmente maior, em torno de 20 min (SMITH et al., 2000, PANKOW et al., 2009).

A eficácia da catálise de PNs pela NEP é determinada, em parte, pela facilidade com que o anel de 17 resíduos entra na fenda catalítica e como os terminais amino e carboxila se orientam no sítio ativo da enzima. Quanto mais alongados esses terminais, o peptídeo se torna mais resistente à hidrólise (BAYES-GENIS; BARALLAT; RICHARDS, 2016). O hPNB ocupa a fenda catalítica da NEP sem catálise atuando como um potencial inibidor da NEP (PANKOW et al., 2009, VODOVAR et al., 2015). Similarmente ao hPNB, o NPCdc apresenta a extremidade C terminal mais alongada que hPNA e hPNC, o que sugere que o NPCdc também tenha maior resistência à hidrólise pela NEP.

Além disso, investigamos o papel do NPCdc na hipertensão e alterações na função renal de ratos submetidos a Nx5/6, um modelo de DRC. Nos animais Nx5/6, o menor peso corpóreo observado é decorrente de um desequilíbrio no metabolismo proteico, o que leva a degradação de proteínas musculares, de forma semelhante ao que acontece com pacientes que apresentam DRC (MAFRA; BURINI, 2001). Outra característica em comum é a alteração na função renal, evidenciada pelos níveis plasmáticos aumentados de ureia e creatinina, além da ocorrência de proteinúria e redução do clearance de creatinina, um estimador da FG (TRAYNOR et al., 2006, MCWILLIAM et al., 2009). Além disso, a diminuição do balanço hídrico acompanhado do aumento da diurese, como mostrado na Tabela 3 indica alterações nos mecanismos de concentração e diluição tubular, como incapacidade de reabsorver sódio e água, e aumento da resistência ao ADH (YEH et al., 1975, TANNEN et al., 1969).

Ainda sobre os efeitos da Nx5/6, foi observado hipertrofia cardíaca e renal (Tabela 7). No curso da DRC é frequente os pacientes apresentarem hipertrofia ventricular esquerda (LEVIN et al., 2005, SILBERBERG et al., 1989), este processo compensatório benéfico permite que o ventrículo esquerdo produza força adicional para aumentar o trabalho cardíaco e manter a tensão constante na parede (LONDON, 2001). Por outro lado, a hipertrofia renal está associada com declínios iniciais mais rápidos na FG e desenvolvimento de microalbuminúria, ambos os fatores de risco para a doença cardiovascular (GO et al., 2004).

O conjunto de alterações funcionais observadas no grupo Nx5/6, evidenciado pela disfunção renal e hipertensão indica que o infarto da massa renal foi uma ferramenta eficaz para gerar sinais de doença renal crônica duas semanas após a nefrectomia, conforme relatado em estudos prévios (GRIFFIN et al., 1994, NAKAMOTO et al., 1999, DO C MAQUIAVELI

et al., 2014). Com base em estudos anteriores usando o NP2_Casca (Evangelista et al., 2008), era esperado o efeito hipotensivo do NPCdc nos grupos sham e Nx5/6. O início da ação hipotensora ocorreu 30 minutos após o início da infusão de NPCdc em ambos os grupos, enquanto que para o nesiritida, um peptídeo natriurético recombinante humano do tipo B, relatou-se que o início ocorreu aos 15 minutos (COLUCCI, 2001). Em contraste com os efeitos do NPCdc na redução da frequência cardíaca, a nesiritida induz um aumento discreto na frequência cardíaca de pacientes com insuficiência cardíaca aguda descompensada no início do tratamento (COLUCCI 2001).

Em relação ao NPCdc, além do efeito hipotensor bem caracterizado durante a infusão do peptídeo (Figura 15A), uma modulação na frequência cardíaca também parece ter acontecido. A diminuição da frequência cardíaca pelo NPCdc nos ratos Nx5/6 (Figura 15B) sugere uma atenuação da atividade simpática, como demonstrado em pacientes com disfunção cardiorrenal (CHOU et al., 2018). Uma correlação inversa entre níveis elevados do fragmento N-terminal do PNB (NT-proPNB) e redução na VFC foram encontrados em pacientes com angina instável. Essa combinação sugere uma melhora da disfunção neuro-hormonal, o que representa um bom prognóstico nesses pacientes (DUFANG et al., 2015).

A variabilidade da frequência cardíaca foi avaliada no presente estudo como uma ferramenta para estimar a função autonômica (MALIK et al., 1996). Semelhante à doença renal crônica em pacientes (CHOU et al., 2018) e ratos Lewis com doença renal policística (HILDRETH et al., 2013), o parâmetro no domínio da frequência VLF foi reduzido e a LF mostrou uma tendência decrescente no grupo Nx5/6 nos registros cardiorrenais basais. Uma diminuição na VLF está associada à diminuição da sensibilidade barorreflexa (HILDRETH et al., 2013). O grupo Nx5/6 mostra angiotensina II elevada, o principal componente do sistema renina-angiotensina (BIDANI et al., 2000; OGAWA et al., 2012), que está associado à sensibilidade barorreflexa prejudicada (BONADUCE et al., 1994). O efeito do NPCdc no aumento de parâmetros no domínio do tempo, como pRR50, nos grupos sham e Nx5/6, e a SD HR no grupo Nx5/6 indica uma melhora na variabilidade da frequência cardíaca. Uma menor variabilidade da frequência cardíaca está associada a um maior risco de doença cardiovascular, uma vez que a maioria dos pacientes com doença renal crônica em estágio avançado apresenta valores reduzidos para os parâmetros de variabilidade da frequência cardíaca (FADAEI et al., 2017; CHOU et al., 2018). Por outro lado, uma variabilidade elevada da frequência cardíaca está associada a um aumento da atividade parassimpática e

uma diminuição da atividade simpática (EWING et al., 1984), efeitos que têm sido atribuídos a peptídeos natriuréticos (MOGHTADAEI et al., 2017).

Como demonstrado em estudos anteriores (GRIFFIN et al., 1994; PAIXÃO et al., 1998), a hemodinâmica renal no grupo Nx5/6 foi caracterizada por um aumento substancial da resistência vascular renal e redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular. A ativação excessiva do sistema renina-angiotensina (OGAWA et al., 2012) contribuiu para elevações da pressão arterial e alterações hemodinâmicas renais no grupo Nx5/6. Além disso, os nervos aferentes renais são sensíveis à quimioterapia e respondem ao receptor de estiramento; assim, a superativação simpática é um colaborador seminal da hipertensão em indivíduos com doença renal crônica (CAMPESE et al., 1995; SATA et al., 2018). Além disso, os níveis de ADH são aumentados e induzem hipertensão em ratos submetidos a Nx5/6 (BOUBY et al., 1990). Com base nos resultados do presente estudo, o estresse oxidativo em todo o rim (Figura 18) representa um fator adicional que contribui para a hipertensão no grupo Nx5/6, uma vez que níveis elevados de ânion superóxido exercem um efeito negativo na biodisponibilidade do NO (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Os peptídeos natriuréticos regulam a pressão sanguínea exercendo um efeito vasorelaxante, regulando o volume intravascular. Os efeitos vasorelaxantes dos peptídeos natriuréticos são mediados por uma ação direta nos receptores e um contrabalanço dos hormônios vasoconstritores. Uma infusão de ANP inibe o sistema renina-angiotensina-aldosterona (BURNETT et al. 1984; ATARASHI et al. 1985), inibe a atividade do nervo simpático renal/lombar e ativa o nervo aferente vagal (IMAIZUMI et al., 1987). De acordo com os resultados da análise da variabilidade da frequência cardíaca (tabela 5), o NPCdc suprimiu a atividade simpática e ativou os nervos aferentes vagais para diminuir a resistência vascular renal no grupo Nx5/6. Além disso, com base no aumento dos níveis de NO na aorta (Figura 19B), o NPCdc pode ter produzido um aumento geral nos níveis vasculares de NO, o que é parcialmente consistente com uma redução na atividade da NADPH oxidase (Figura 19A) que aumenta a biodisponibilidade do NO (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). O efeito antioxidante direto do NPCdc é desconhecido.

O aumento da taxa de filtração glomerular e da fração de filtração observada nos grupos sham e Nx5/6 parece ser um efeito do NPCdc no aumento da pressão hidrostática capilar glomerular e do coeficiente de ultrafiltração, respectivamente, produzindo vasodilatação pré-glomerular e vasoconstrição pós-glomerular (MARIN-GREZ et al., 1986; DUNN et al., 1986) e aumentando a permeabilidade glomerular (AXELSSON et al., 2011).

Além disso, ao neutralizar a atividade simpática, os peptídeos natriuréticos aumentam o coeficiente de ultrafiltração (AWAZU et al., 1991). O efeito do NPCdc no aumento da taxa de filtração glomerular e da fração de filtração foi responsável pelo aumento da excreção fracionada de Na^+ e K^+ . Como as excreções urinárias de Na^+ e K^+ não foram afetadas pelo NPCdc (Tabela 3), o peptídeo não afetou a reabsorção total de Na^+ e K^+ ao longo do néfron.

Concomitante à redução substancial na taxa de filtração glomerular, a atividade de Na^+/K^+ -ATPase foi reduzida nos túbulos proximais do grupo Nx5/6 como resultado do balanço glomerulotubular (RECTOR et al., 1996; WANG et al., 2017) e aumento dos níveis de ânion superóxido, consistente com um estudo anterior (ZHANG et al., 2002). A redução induzida por NPCdc observada na atividade de Na^+/K^+ -ATPase no grupo sham era esperada, porque esse é um efeito clássico dos peptídeos natriuréticos (APERIA et al., 1994). Por outro lado, sugere-se que seu efeito no aumento da atividade de Na^+ -ATPase nos grupos sham e Nx5/6 seja mediado pela via NPR-C/ERK1/2, com base nas evidências obtidas na aorta (Figura 21C e D) e um estudo anterior do nosso grupo (SILVA et al., 2014).

Na presença do déficit de NO no grupo Nx5/6, os níveis de cGKI também foram reduzidos (Figura 19C). A produção de NO induzida pelo aumento dos níveis de $\text{p-iNOS}^{\text{Tyr-151}}$ (Figura 20D) pareceu ser extinta por $\text{O}_2^{\bullet-}$. Além disso, encontramos uma razão dímero/monômero da eNOS reduzida (Figura 20C). Sabe-se que a expressão total de eNOS (KIM et al., 2000) e tetra-hidrobiopterina (Montes-Rivera et al. 2018; 2019) são reduzidas em ratos Nx5/6. A redução da tetra-hidrobiopterina leva ao desacoplamento da eNOS (Roe et al., 2012; Chen et al., 2014). No grupo Nx5/6, o NPCdc reduziu a atividade da NADPH oxidase, juntamente com um aumento de 166% nos níveis de NO, o que resultou no aumento dos níveis de cGKI, enquanto no grupo sham, o NPCdc não afetou os níveis de $\text{O}_2^{\bullet-}$, o nível de NO só foi 66% e o nível de cGKI não foi aumentado. O efeito agudo do NPCdc na redução da atividade da NADPH oxidase exclusivamente em ratos submetidos a nefrectomia 5/6 é provavelmente um efeito indireto mediado pela supressão da produção de angiotensina II, nervos simpáticos e vasopressina (CHARLOUX et al., 2003).

A produção de NO induzida por NPCdc nos grupos sham e Nx5/6 não pareceu ser mediada pela atividade da NOS, com base nos níveis das proteínas $\text{p-eNOS}^{\text{Ser-1177}}$, $\text{p-iNOS}^{\text{Tyr-151}}$ e $\text{p-nNOS}^{\text{Ser-1417}}$. No entanto, o tempo é um fator importante a ser considerado na determinação da fosforilação da NOS. Um rápido aumento da fosforilação é comumente observado nos primeiros minutos após a administração da incubação com substâncias, seguido de uma diminuição, com falta de efeito após 45 minutos (GINGERICH; KRUKOFF, 2008; XIA et al., 2016). A atividade da eNOS é modulada através da fosforilação pela

proteína cinase A, proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMP) e AKT (MICHELL et al., 2001). Os níveis de p-AKT^{Ser-473} (Figura 21A), investigados no presente estudo, não foram afetados pelo NPCdc, sugerindo que a fosforilação dessa isoforma ocorreu muito cedo, antes do término da infusão ou não ocorreu. No entanto, p-ERK1/2^{Thr-202/Tyr-204} (Figura 21C) foi observado nos grupos sham e Nx5/6.

Considerando o aumento paralelo dos níveis de NO, pode existir uma relação entre o NO e a via MAPK, como mostrado em um estudo anterior (AREJIAN; ANAND-SRIVASTAVA, 2009). Os peptídeos natriuréticos também modulam indiretamente a via MAPK ativando o NPR-C (KHAMBATA et al., 2011; TOURKI et al., 2016). O papel fisiológico do NPCdc na fosforilação do ERK1/2 pode exercer um efeito positivo no reparo de lesões endoteliais (KHAMBATA et al., 2011) ou um efeito negativo, levando à tolerância ao NO (AREJIAN; ANAND-SRIVASTAVA, 2009), o aumento a longo prazo nos níveis de p-ERK1/2 pode levar à regulação negativa de Gai e tolerância ao NO (AREJIAN; ANAND-SRIVASTAVA, 2009).

Embora o tempo de 70 min de infusão de NPCdc possa constituir uma limitação para observar as formas fosforiladas de NOS e AKT, esse período foi necessário para caracterizar os efeitos hipotensores e renais do peptídeo. Outra limitação neste estudo é o ensaio de quimiluminescência da lucigenina para medição de superóxido. No entanto, a diferença consistente observada entre os ratos controle e Nx5/6 em referência a esses dados o torna mais forte. Em seguida, os efeitos fisiológicos do NPCdc relatados no presente estudo sugerem que esse peptídeo representa um novo medicamento promissor para gerenciar sintomas de congestão em pacientes com insuficiência cardíaca descompensada aguda, um tipo de síndrome cardiorrenal. Para adicionar evidências sobre a vantagem desse peptídeo em relação ao leito, são necessários estudos sobre sua interação com peptidases endógenas, como a neprilisina.

6 CONCLUSÃO

Estes dados indicam que o efeito hipotensor agudo do NPCdc foi devido a alterações hemodinâmicas renais, levando a um aumento da taxa de filtração glomerular e à excreção fracionada de Na^+ . Por outro lado, esse mesmo efeito do peptídeo na aorta foi mediado pelos níveis elevados de NO, embora qualquer isoforma fosforilada da NOS tenha sido aumentada pelo NPCdc. O aumento dos níveis de NO observado no grupo Nx5/6 parece envolver uma diminuição na atividade da NADPH oxidase. O efeito do NPCdc no aumento dos níveis de p-ERK1/2^{Thr-202/Tyr-204} na aorta torácica dos grupos sham e Nx5/6 sugere que a ativação do NPR-C medeia esse efeito.

7 PERSPECTIVAS

Espera-se que estes resultados possam levar a novas terapias, baseadas em peptídeo natriurético e/ou em abordagens antioxidantes, para melhorar as complicações das doenças cardiorrenais. Mais investigações são necessárias para ampliar o conhecimento e esclarecer outros mecanismos que permeiam a ação do NPCdc. Também questões ligadas à segurança e tolerabilidade em seres humanos precisam ser consideradas, para que então todos esses esforços possam ser traduzidos em benefícios clínicos em estados de doença cardiorrenal.

REFERÊNCIAS

- ABUZINADAH, A. R. Blood pressure oscillations in baroreflex failure. **Clin Auton Res.** v. 26, n. 6, p. 465-466, 2016.
- AIELLO, S. et al. Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. **Kidney Int.** v. 52, p. 171–181, 1997.
- ALMEIDA, F. A.; SUZUKI M.; MAACK T. Atrial natriuretic factor increases hematocrit and decreases plasma volume in nephrectomized rats. **Life Sci.** v. 39, p. 1193–1199, 1986.
- AMIN, O.; CARRETERO, I.; SADAYOS, H. I. Mechanisms of action of atrial natriuretic factor and C-type natriuretic peptide. **Hypertension.** v. 27, p. 684–687, 1995.
- AMININAS, A. B. et al. Functional and structural characterization of a novel member of the natriuretic family of peptides from the venom of *Pseudocerastes persicus*. **FEBS Letters** v. 557, p. 104-108, 2004.
- ANAND I. S. et al. Interaction Between Spironolactone and Natriuretic Peptides in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction: From the TOPCAT Trial. **JACC Heart Fail.** v.5, n. 4, p. 241-252, 2017.
- ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. **Pep-tides.** v. 26, p. 1044-1059, 2005.
- ANDERSON, S. et al. Control of glomerular hypertension limits injury in rats with reduced renal mass. **J. Clin. Invest.** v. 76, p. 612-9, 1985.
- ANDRADE, F.A. et al. Vascular relaxation induced by C-type natriuretic peptide involves the Ca²⁺/NOsynthase/ NO pathway. **PLoS One** v. 9, e95446, 2014.
- ANDREW, P. J.; MAYER B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res.** v. 43, n. 3, p. 521-31, 1999.
- ANGERMAN, C.E.; ERTL, G. Natriuretic peptides – new diagnostic markers in heart disease. **Herz.** v. 29, p. 609–617, 2004.
- ANISHCHENKO, A. M. et al. Dynamics of blood pressure elevation and endothelial dysfunction in SHR rats during the development of arterial hypertension.
- APERIA, A. et al. Activation/deactivation of renal Na⁺/K⁺-ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. **FASEB J.** 8, 436–439, 1994.
- AREJIAN, M., LI, Y., ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Nitric oxide attenuates the expression of natriuretic peptide receptor C and associated adenylyl cyclase signaling in aortic vascular smooth muscle cells: role of MAPK. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** v. 296, p. H1859–H1867, 2009.
- ARMALY, Z.; ASSADY S.; ABASSI Z. Corin: a new player in the regulation of salt-water balance and blood pressure. **Curr Opin Nephrol hypertens.** v. 22, n.6, p. 713-722, 2013.

- ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.
- ATARASHI, K.; MULROW, P.J.; FRANCO-SAENZ, R. Effect of atrial peptides on aldosterone production. **J. Clin. Investig.** v. 76, p. 1807–1811, 1985.
- AUGUSTYNIAK, R. A. et al. Sympathetic overactivity as a cause of hypertension in chronic renal failure. **J Hypertens.** v. 20, n. 1, p. 3-9, 2002.
- AWAZU, M. et al. Renal sympathetic nerves modulate glomerular ANP receptors and filtration. **Am J Physiol.** v. 261, p. F29-35, 1991.
- AXELSSON, J.; RIPPE, A.; RIPPE, B. Transient and sustained increases in glomerular permeability following ANP infusion in rats. **Am J Physiol Renal Physiol.** 300, F24-30, 2011.
- BARAUNA, V. G. et al. AT1 receptor blocker potentiates shear-stress induced nitric oxide production via modulation of eNOS phosphorylation of residues Thr(495) and Ser(1177). **Biochem Biophys Res Commun.** v. 441, n. 4, p. 713-9, 2013.
- BAYES-GENIS, A.; BARALLAT J.; RICHARDS. A Test in Context: Neprilysin: Function, Inhibition, and Biomarker. **J Am Coll Cardiol.** Aug 9;68(6):639-653 2016.
- BAYLIS, C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 294, n. 1, p. F1-9, 2008.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews.** v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.
- BELTOWSKI, J. et al. Regulation of renal ouabain-resistant Na⁺-ATPase by leptin, nitric oxide, reactive oxygen species, and cyclic nucleotides: implications for obesity-associated hypertension. **Clin Exp Hypertens.** v. 29, n. 3, p. 189–207, 2007.
- BENNETT, M. R.; SINHA, S.; OWENS, G. K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. **Circ Res.** v. 118, n. 4, p. 692–702, 2016.
- Bidani, A.K., Griffin, K.A., Bakris, G., Picken, M.M. 2000. Lack of evidence of blood pressure-independent protection by renin-angiotensin system blockade after renal ablation. *Kidney Int.* 57, 1651-61.
- BILZER, M. et al. Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. **Am J Physiol.** v. 276, p. 1137–44, 1999.
- BIVOL, L. M.; VÂGNES, O. B.; IVERSEN B. M. The renal vascular response to ANG II injection is reduced in the nonclipped kidney of two-kidney, one-clip hypertension. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 289, n. 2, p. 393-400, 2005.
- BLAZER-YOST, B. L.; LIU, X.; HELMAN, S. I. Hormonal regulation of ENaCs: insulin and aldosterone. **Am J Physiol.** v. 274, n. 5 Pt 1, p. C1373-9, 1998.
- BONADUCE, D. et al. Effects of converting enzyme inhibition on heart period variability in patients with acute myocardial infarction. **Circulation.** v. 90, p. 108-13, 1994.
- BONGARTZ, L. G. Target organ cross talk in cardiorenal syndrome: animal models. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 303, n. 9, p. F1253-63, 2012.

BOUBY, N.; BACHMANN, S.; BICHET, D.; BANKIR, L. Effect of water intake on the progression of chronic renal failure in the 5/6 nephrectomized rat. **Am J Physiol.** v. 258, p. F973-9, 1990.

BREIVIK, L. et al. B-type natriuretic peptide expression and cardioprotection is regulated by Akt dependent signaling at early reperfusion. **Peptides.** v. 66, p. 43-50, 2015.

BRENNER, B. M. et al. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. **Physiol Rev.** v. 70, p. 665–699, 1990.

BRENNER, B. M. Nephron adaptation to renal injury or ablation. **Am. J. Physiol.** v. 249, p. 324-37, 1985.

BRENNER, B. M.; GARCIA, D. L.; ANDERSON, L. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? **Am J Hypertens.** v. 1, n. 4, p. 335-47, 1988.

BRYAN, P. M. et al. Renal hyporesponsiveness to atrial natriuretic peptide in congestive heart failure results from reduced atrial natriuretic peptide receptor concentrations. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 292, n. 5, p.F1636-44, 2007.

BRYAN, N. S., BIAN, K.; MURAD, F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. **Front. Biosci.** v. 14, p. 1–18, 2009.

BURNETT, J.C. JR.; GRANGER, J.P.; OPGENORTH, T.J. Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and renin release. **Am J Physiol.** v. 247, p. F863-6, 1984.

BUYS, E. S. Genetic modifiers of hypertension in soluble guanylate cyclase $\alpha 1$ -deficient mice. **J Clin Invest.** v. 122, n. 6, p. 2316-25, 2012.

CAI, C. Y. et al. Dendroaspis natriuretic peptide relaxes gastric antral circular smooth muscle of guinea-pig through the cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway. **World J. Gastroenterol.** v. 14, p. 5461-5466, 2008.

CAMPESE, V.M.; KOGOSOV, E.; KOSS, M. Renal afferent denervation prevents the progression of renal disease in the renal ablation model of chronic renal failure in the rat. **Am J Kidney Dis.** 26, 861-5, 1995.

CAPASSO, G. et al. Bicarbonate reabsorption and NHE-3 expression: abundance and activity are increased in Henle's loop of remnant rats. **Kidney Int.** v. 62, n. 6, p. 2126–2135, 2002.

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 75, n. 1, p. 50-83, 2011.

CARINI R. et al. Mechanism of hepatocyte protection against hypoxic injury by atrial natriuretic peptide. **Hepatology.** v. 37, p. 277–85, 2003.

CARLSTRÖM, M.; WILCOX, C. S.; ARENDSHORST, W. J. Renal autoregulation in health and disease. **Physiol Rev.** v. 95, n. 2, p. 405-511, 2015.

CARUSO-NEVES, C. et al. Ouabain-insensitive Na^+ -ATPase of proximal tubules is an effector for urodilatin and atrial natriuretic peptide. **Biochim Biophys Acta.** v. 1660, n. 1-2, p. 93-8, 2004.

CERRA, M.C.; PELLEGRINO, D. Cardiovascular cGMP-generating systems in physiological and pathological conditions. **Curr Med Chem.** v. 14, p. 585-99, 2007.

- CHAN, E. C. et al. Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. **Pharmacol Therapeutics**. v. 122, p. 97–108, 2009.
- CHANDRA, P. et al. Predictors of heart rate variability and its prognostic significance in chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**. v. 27, p. 700–9, 2012.
- CHANUTIN, A.; FERRIS E. B. Experimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy. **Arch Intern Med**. v. 49, p. 767, 1932
- CHARLOUX, A. et al. Mechanisms of renal hyporesponsiveness to ANP in heart failure. **Eur J Clin Invest**. v. 33, n. 9, p. 769–708, 2003.
- CHARLOUX, A. et al. Renal hyporesponsiveness to brain natriuretic peptide: both generation and renal activity of cGMP are decreased in patients with pulmonary hypertension. **Peptides**. v. 27, n. 11, p. 2993–9, 2006.
- CHEN, H. H.; LAINCHBURY, J. G.; BURNETT, J. C. JR. Natriuretic peptide receptors and neutral endopeptidase in mediating the renal actions of a new therapeutic synthetic natriuretic peptide dendroaspis natriuretic peptide. **J Am Coll Cardiol**. v.40, p. 1186–91, 2002.
- CHEN, D.D. Tetrahydrobiopterin regulation of eNOS redox function. **Curr Pharm Des**. v. 20, p. 3554–62, 2014.
- CHEVALIER, R. L. Functional adaptation to reduced renal mass in early development. **Am J Physiol**. v. 242, n. 2, p.190–6, 1982.
- CHOU, Y. H. et al. Heart Rate Variability as a Predictor of Rapid Renal Function Deterioration in Chronic Kidney Disease Patients. **Nephrology** (Carlton). 2018
- CHOW, B. S. Relaxin signals through a RXFP1-pERK-nNOS-NO-cGMP-dependent pathway to up-regulate matrix metalloproteinases: the additional involvement of iNOS. **PLoS One**. v. 7, n. 8, p. e42714, 2012.
- CLERICO, A, VITTORINI S, PASSINO, C. Circulating forms of the b-type natriuretic peptide prohormone: pathophysiologic and clinical considerations. **Adv Clin Chem**. v. 58, p. 31–44, 2012.
- COLUCCI, W. S. et al. Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. **N Engl J Med**. 343:246–53, 2000.
- COLUCCI, W.S. Nesiritide for the treatment of decompensated heart failure. **J Card Fail**. 7, 92–100, 2001.
- COSTA, M. A. et al. Atrial natriuretic peptide influence on nitric oxide system in kidney and heart. **Regul. Pept**. v. 118, n. 3, p. 151–157, 2004.
- COSTA, M. A. et al.. Role of cardiovascular nitric oxide system in C-type natriuretic peptide effects. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 359, n. 1, p. 180–6, 2007.
- CROZIER, I. G., et al. Haemodynamic effects of atrial peptide infusion in heart failure. **Lancet**. v. 29, n. 8518, p. 1242–5, 1986.
- CUADRADO, A.; NEBRED, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **Biochem J**. v. 429, n. 3, p. 403–17, 2010.

- CULLETON, B.F. Cardiovascular disease and mortality in a community- based cohort with mild renal insufficiency. **Kidney Int.** v. 56, p. 2214-9, 1999.
- CYGANKIEWICZ, I.; ZAREBA, W. Heart rate variability. **Handbook of Clinical Neurology.** v. 117, p. 379-393, 2013.
- DAS, B.; SARKAR, C.; SHANKAR, P. R. Pretreatment with sarafotoxin 6c prior to coronary occlusion protects against infarction and arrhythmias via cardiomyocyte mitochondrial K(ATP) channel activation in the intact rabbit heart during ischemia/reperfusion. **Cardiovasc. Drugs Ther.** v. 21, n. 4, p. 243-51, 2007.
- DE ALBUQUERQUE, M. J. C. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from Bothrops erythromelas venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inducer of prostaglandin I2 release by endothelial cells. **Biochem. Pharmacol.** v. 72, n. 3, p. 377-84, 2006.
- DE BOLD, A. J. et al. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. **Life Sci.** v. 28, p. 89-94, 1981.
- DE NICOLA, L. et al. Pathophysiological role and diuretic efficacy of atrial natriuretic peptide in renal patients. **J Am Soc Nephrol.** v. 8, p. 445–55, 1997.
- DE VITO, P. et al. Atrial natriuretic peptide and oxidative stress. **Peptides.** v.31, p. 1412–1419, 2010.
- DEAN, A. D., et al. Distribution and regulation of guanylyl cyclase type B in the rat nephron. **Am J Physiol.** v. 270, p. F311–81996.
- DHANANJAYA, B. L.; D’SOUZA, C. J. The pharmacological role of nucleotidases in snake venoms. **Cell Biochem. Funct.** v. 28, n. 3, p. 171-7, 2010.
- DI LEO, R. et al. Autonomic function in elderly uremics studied by spectral analysis of heart rate. **Kidney Int.** v. 67, p. 1521-5, 2005.
- DI MARCO, G. S. et al. Purification and characterization of a neutral endopeptidase-like enzyme from human urine. **J Hypertens.** v. 16, p. 1971-8, 1998.
- DIAS, J. et al. ANG-(3-4) inhibits renal Na⁺-ATPase in hypertensive rats through a mechanism that involves dissociation of ANG II receptors, heterodimers, and PKA. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 306, n. 8, p. F855-63, 2014.
- DO C MAQUIAVELI, C. et al. Brazilian embauba (*Cecropia pachystachya*) extract reduces renal lesions in 5/6 nephrectomized rats. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.** v. 15, n. 4, p. 430-9, 2014.
- DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cell Mol Life Sci.** v. 17, p. 2851-71, 2009.
- DUFANG, M. et al. N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Levels Inversely Correlated With Heart Rate Variability in Patients With Unstable Angina Pectoris. **Int Heart J.** v. 57, n. 3, p. 292-298, 2016.

DUNN, B.R.; ICHIKAWA, I.; PFEFFER, J.M.; TROY, J.L.; BRENNER, B.M. Renal and systemic hemodynamic effects of synthetic atrial natriuretic peptide in the anesthetized rat. **Circ Res.** v. 59, p. 237-46, 1986.

ELESGARAY, R. et al. Renal actions of atrial natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats: the role of nitric oxide as a key mediator. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 302, p. F1385–F1394, 2012.

ELESGARAY, R. et al. Signaling cascade that mediates endothelial nitric oxide synthase activation induced by atrial natriuretic peptide. **Regul Pept.** v. 151, p. 130–134, 2008.

ELMI, M. M. et al. Structural and Functional Characterization of a Mutant of *Pseudocerastes persicus* Natriuretic Peptide. **Protein & Peptide Letters.** v. 13, p. 295-300, 2006.

ERDOS E. G.; SKIDGEL R. A. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. **Faseb J.** v. 3, p. 145-51, 1989.

EVANGELISTA J. S. et al. Hypotensive Effects of the *Crotalus durissus cascavella* Venom: Involvement of NO. **Nat Prod Commun.** v. 6, n. 6, p. 871-4, 2011.

EVANGELISTA J. S. et al. Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon.** v. 1, n. 7, p. 737-44, 2008.

EWING, D. J., NEILSON, J. M., TRAVIS, P. 1984. New method for assessing cardiac parasympathetic activity using 24 hour electrocardiograms. **Br Heart J.** v. 52, p. 396-402.

FADAEI, S. B. Oxidative stress is associated with decreased heart rate variability in patients with chronic kidney disease. **Redox Rep.** v. 22, p. 197-204, 2017.

FELBER, D. et al. Heart rate variability in an ageing population and its association with lifestyle and cardiovascular risk factors: Results of the sapaldia study. **Europace.** v. 8, p. 521-9, 2006.

FERRAILLE, E.; DIZIN, E. Coordinated Control of ENaC and Na⁺,K⁺-ATPase in Renal Collecting Duct. **J Am Soc Nephrol.** v. 27, n. 9, p. 2554-63, 2016.

FERNANDEZ, J. Isolation of an acidic phospholipase A2 from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. **Biochimie.** v. 92, n. 3, p. 273-83, 2010.

FERRAILLE, E.; DOUCET, A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. **Physiol Rev.** v. 81, n. 1, p. 345-418, 2001

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

FLORAS, J. S. Inhibitory effect of atrial natriuretic factor on sympathetic ganglionic neurotransmission in humans. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 269, p. R406–R412, 1995.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J.** 33, 829-37, 837a-837d, 2012.

- FRY, B. G. et al. Novel natriuretic peptides from the venom of the inland taipan (*Oxyuranus microlepidotus*): isolation, chemical and biological characterization. v. 327, n. 2005, p. 1011–1015, 2004.
- FU, S. et al. Brain Natriuretic Peptide and Its Biochemical, Analytical, and Clinical Issues in Heart Failure: A Narrative Review. **Front. Physiol.** v. 9, p. 692, 2018.
- FU, S. et al. Synthesis, secretion, function, metabolism and application of natriuretic peptides in heart failure. **J Biol Eng.** v. 12, p. 2, 2018
- FUJIIHARA C.K. et al. Pathogenesis of glomerular sclerosis in subtotaly nephrectomized analbuminemic rats. **Am. J. Physiol.** v. 261, p. 256-64, 1991.
- FUHR, J.; KACZMARCZYK, J.; KRUTTGEN, C. D. A simple colorimetric method of inulin determination in renal clearance studies on metabolically normal subjects and diabetics. **Klin Wochenschr.** v. 33, n; 29-30, p. 729-30, 1955.
- GARFINKLE, M. A. Salt and essential hypertension: pathophysiology and implications for treatment. **J Am Soc Hypertens.** pii: S1933-1711, n. 17, p. 30105-5, 2017.
- GAVA, A. L. et al. Effects of 5/6 nephrectomy on renal function and blood pressure in mice. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.** v.4, n. 3, p. 167-73, 2012.
- GERBES, A. L. et al. Transcription of brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide genes in human tissues. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 78, n. 6, p. 1307-11, 1994.
- GINGERICH, S.; KRUKOFF, T.L. Activation of ERbeta increases levels of phosphorylated nNOS and NO production through a Src/PI3K/Akt-dependent pathway in hypothalamic neurons. **Neuropharmacology.** 55, 878-85, 2008.
- GKALIAGKOUSI, E.; GAVRIILAKI E.; TRIANTAFYLLOU A.; DOUMA S. Clinical Significance of Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. **Curr Hypertens Rep.** v. 17, n. 11, p. 85, 2015.
- GO, A. S. et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. **N Engl J Med.** v. 351, p. 1296–305, 2004.
- GONG, B., WU, Z., LI, Z. 2016. Efficacy and safety of nesiritide in patients with decompensated heart failure: a meta-analysis of randomised trials. **BMJ Open.** 6, e008545.
- GRAHAM, R. L. J. et al. Identification and functional analysis of a novel bradykinin inhibitory peptide in the venoms of New World *Crotalinae* pit vipers. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 338, n. 3, p. 1587-92, 2005.
- GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. **Redox biology.** v. 6, p. 524–51, 2015.
- GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.** 126, 131-8, 1982.
- GRIFFIN, K. A.; PICKEN, M.; BIDANI, A. K. Method of renal mass reduction is a critical modulator of subsequent hypertension and glomerular injury. **J Am Soc Nephrol.** v. 4, n. 12, p. 2023-31, 1994.

- GRIFFIN, K.A.; PICKEN, M.; BIDANI, A.K. Method of renal mass reduction is a critical modulator of subsequent hypertension and glomerular injury. **J Am Soc Nephrol.** v. 4, p. 2023-31, 1994.
- GUO, L. J. et al. ENaC is regulated by natriuretic peptide receptor-dependent cGMP signaling. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 304, n. 7, p. F930-7, 2013.
- GUO S.; CHEN X.. The human Nox4: gene, structure, physiological function and pathological significance. **J Drug Target.** v. 23, n. 10, p. 888-96, 2015.
- GUPTA, D. K.; WANG, T. J. Natriuretic Peptides and Cardiometabolic Health. **Circ J.** v. 79, n. 8, p. 1647-55, 2015.
- GUTKOWSKA, J. et al. Increased plasma immunoreactive atrial natriuretic factor concentrations in salt sensitive Dahl rats. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 136, n. 1, p. 411-6, 1986.
- HAMRAHIAN, S. M. Management of Hypertension in Patients with Chronic Kidney Disease. **Curr Hypertens Rep.** v. 19, n. 5, p. 43, 2017.
- HASEGAWA, K. et al. Plasma levels of atrial natriuretic peptide in patients with chronic renal failure. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 63, n. 4, p. 819-22, 1986.
- HASHIM, S. L. I. Y.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B. Small cytoplasmic domain peptides of natriuretic peptide receptor-C attenuate cell proliferation through G α protein/MAP kinase/PI3-kinase/AKT pathways. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 291, p. H3144–H3153, 2006.
- HATAMIZADEH, P. et al. Cardiorenal syndrome: pathophysiology and potential targets for clinical management. **Nat Rev Nephrol.** 9, 99-111, 2012.
- HERMANN, M.; FLAMMER, A.; LÜSCHER, T. F. Nitric oxide in hypertension. **J Clin Hypertens (Greenwich).** v. 8, n. 12 Suppl 4, p. 17-29, 2006.
- HILDRETH, C. M.; KANDUKURI, D. S.; GOODCHILD, A. K.; PHILLIPS, J. K. Temporal development of baroreceptor dysfunction in a rodent model of chronic kidney disease. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v. 40, p. 458-65, 2013.
- HILL, N. R. et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One.** v. 11, n. 7, p. e0158765, 2016.
- HIRATA, Y. The Effects of Human Atrial 28-Amino Acid Peptide on Systemic and Renal Hemodynamics in Anesthetized Rats. **Circ Res.** v. 57, p. 634-639, 1985.
- HOCHER, B. et al. Relaxin is an independent risk factor predicting death in male patients with end-stage kidney disease. **Circulation.** v. 109, p. 2266–2268, 2004.
- HOFMANN, F. cGMP regulated protein kinases (cGK). **Handb Exp Pharmacol.** n. 191, p. 137-62, 2009.
- HOFMANN, F. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. **Physiol Rev.** v. 86, n. 1, p.1-23, 2006.

- HOSTETTER, T. H. et al. Detecting early chronic kidney disease: are clinical laboratories a problem? **Am J Kidney Dis.** v. 42, n. 2, p. 392-4, 2003.
- HUANG, J. Gi-coupled receptors mediate phosphorylation of CPI-17 and MLC20 via preferential activation of the PI3K/ILK pathway. **Biochem J.** v. 396, p. 193-200, 2006.
- HUNT, P. J. Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 78, p. 1428–1435, 1994.
- ICHIKI, T. Cardiac fibrosis in end-stage human heart failure and the cardiac natriuretic peptide guanylyl cyclase system: regulation and therapeutic implications. **J Mol Cell Cardiol.** n. 75, p. 199-205, 2014.
- IDE, T. et al. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. **Circ Res.** v. 86, p. 152–7, 2000.
- IGAKI, T. et al. Effects of intravenously administered C-type natriuretic peptide in humans: comparison with atrial natriuretic peptide. **Hypertens Res.** v. 21, n. 1, p. 7-13, 1998.
- IGNARRO, L. J. et al. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 34, n. 6, p. 879-86, 1999.
- IMAIZUMI, T.; TAKESHITA, A.; HIGASHI, H.; NAKAMURA, M.. alpha-ANP alters reflex control of lumbar and renal sympathetic nerve activity and heart rate. **Am J Physiol.** v. 253, p. H1136-40, 1987.
- INOUE, T.; NONOGUCHI, H.; TOMITA, K. Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. **Cardiovasc Res.** v. 51, p. 470–480, 2001.
- JACKSON, J. R.; GREGG, A. R. Updates on the Recognition, Prevention and Management of Hypertension in Pregnancy. **Obstet Gynecol Clin North Am.** v. 44, n. 2, p. 219-230, 2017.
- JARARI, N. et al. A review on prescribing patterns of antihypertensive drugs. **Clin Hypertens.** v.22, p.22: 7, 2015.
- JIN, X. et al. C-type natriuretic peptide ameliorates ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury by inhibiting apoptosis and oxidative stress in rats. **Life Sciences.** v. 117, p. 40–45, 2014.
- JOHNS, D. G. et al. Dendroaspis natriuretic peptide binds to the natriuretic peptide clearance receptor. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 358, n. 1, p. 145-9, 2007.
- JOSHI, S. et al. NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Oxalate Induced Injury in Kidneys. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** v. 2013, p. 1–18, 2013.
- KATO, T. et al. Atrial natriuretic peptide promotes cardiomyocyte survival by cGMP-dependent nuclear accumulation of zyxin and Akt. **J Clin Invest.** v. 115, p. 2716–2730, 2005.
- KEMI, O. J. et al. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. **J Cell Physiol.** v. 214, p. 316–21, 2008.

KERKELÄ, R.; ULVILA J.; MAGGA J. Natriuretic peptides in the regulation of cardiovascular physiology and metabolic events. **J. Am. Heart Assoc.** v. 4: e002423, 2015.

KERR, M. A.; KENNY, A. J. The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border. **Biochem J.** v. 137, p. 489-95, 1974.

KERR, P. M. et al. Endothelial calcium-activated potassium channels as therapeutic targets to enhance availability of nitric oxide. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 90, n. 6, p. 739-52, 2012.

KHAMBATA, R. S.; PANAYIOTOU, C. M.; HOBBS, A. J. 2011. Natriuretic peptide receptor-3 underpins the disparate regulation of endothelial and vascular smooth muscle cell proliferation by C-type natriuretic peptide. **Br J Pharmacol.** 164, 584-97.

KIM E. K.; CHOI E. J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochim Biophys Acta.** v. 1802, n. 4, p. 396-405, 2010.

KIM S. et al. Changes in the sodium and potassium transporters in the course of chronic renal failure. **Nephron Physiol** 115: 31–41, 2010.

KIM S. W. et al. Decreased nitric oxide synthesis in rats with chronic renal failure. **J Korean Med Sci.** v. 15, n. 4, p. 425-30, 2000.

KIM, et al. Dendroaspis natriuretic peptide is degraded by a metalloproteinase in the rat kidney. **Mol Med Rep.** v. 9, n. 3, p. 1037-43, 2014.

KIM, S.W.; LEE, J.; PAEK, Y.W.; KANG, D.G.; CHOI, K.C. Decreased nitric oxide synthesis in rats with chronic renal failure. **J Korean Med Sci.** v. 4, p. 425-30, 2000.

KINOSHITA, H. et al. Urine and plasma levels of uroguanylin and its molecular forms in renal diseases. **Kidney Int.** v. 52, p. 1028-1034, 1997.

KITADA, M. et al. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. **Diabetes.** v. 52, n. 10, p. 2603–14, 2003.

KOCHVA, E.; VILJOEN, C. C.; BOTES, D. P. A new type of toxin in the venom of snakes of the genus *Atractaspis* (*Atractaspidinae*). **Toxicon.** v. 20, n. 3, p. 581-92, 1982.

KOEPKE, J. P.; DIBONA, G. F. Functions of the renal nerves. **Physiologist.** v. 28, n. 1, p. 47-52, 1985.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. **Toxicon.** v. 59, p. 497–506, 2012.

KONUKOGLU, D.; UZUN, H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. **Adv Exp Med Biol.** v. 956, p. 511-540, 2017.

KORKMAZ, B. Activation of MEK1/ERK1/2/iNOS/sGC/PKG pathway associated with peroxynitrite formation contributes to hypotension and vascular hyporeactivity in endotoxemic rats. **Nitric Oxide.** v. 24, n. 3, p. 160-72, 2011.

KOURIE, J. I; RIVE, M. J. Role of natriuretic peptides in ion transport mechanisms. **Med Res Rev.** v. 19, n. 1, p. 75-94, 1999.

- KRISHNAN, S. M. et al. The Impact of the Nitric Oxide (NO)/Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) Signaling Cascade on Kidney Health and Disease: A Preclinical Perspective. **Int J Mol Sci.** v. 19, n. 6, p. E1712, 2018.
- KUJAL, P.; VERNEROVÁ, Z. 5/6 nephrectomy as an experimental model of chronic renal failure and adaptation to reduced nephron number. **Cesk Fysiol.** v. 57, n. 4, p. 104-9, 2008.
- KUNATH, F. et al. Partial nephrectomy versus radical nephrectomy for clinical localised renal masses. **Cochrane Database Syst Rev.** v. 5, p. CD012045, 2017.
- KURIBAYASHI, Y.; MAJIMA, M.; KATORI, M.; KATO, H. Major kininases in rat urine are neutral endopeptidase and carboxypeptidase Y-like exopeptidase. **Biomed Res.** v. 14, p. 191-201, 1993.
- KURTZ, A. et al. Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 83, p. 4769–4773, 1986.
- KWON, T. H. et al. Reduced aqp1, -2, and -3 levels in kidneys of rats with crf induced by surgical reduction in renal mass. **Am J Physiol.** v. 277, n.2 Pt 2, p. 257-70, 1998.
- KWON, T-H. Altered expression of Na transporters NHE-3, NaPi-II, Na-K-ATPase, BSC-1, and TSC in CRF rat kidneys. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 277, n. 2, p. F257–F270, 1999.
- LANESE, D. M.; YUAN, B. H.; FALK, S. A.; CONGER, J. D. Effects of atriopeptin III on isolated rat afferent and efferent arterioles. **Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol** 261: F1102–F1109, 1991.
- LAPPAS, G.; DAOU, G. B.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B. Oxidative stress contributes to the enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens.** v. 23, p. 2251–61, 2005.
- LAYTON, A. T.; EDWARDS, A.; VALLON, V. Adaptive changes in GFR, tubular morphology, and transport in subtotal nephrectomized kidneys: modeling and analysis. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 313, n. 2, p. F199-F209, 2017.
- LEE, C. Y. et al. Cenderitide: structural requirements for the creation of a novel dual particulate guanylyl cyclase receptor agonist with renal-enhancing in vivo and ex vivo actions. **Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother.** v. 2, n. 2, p. 98-105, 2016.
- LEVIN, A. et al. Canadian Randomized Trial of Hemoglobin Maintenance to Prevent or Delay Left Ventricular Mass Growth in Patients With CKD. **Am J Kidney Dis.** v. 46, p. 799-811, 2005.
- LEVIN, A. et al. Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: identifying opportunities for intervention. **Am J Kidney Dis.** v. 27, p. 347-54, 1996.
- LEVIN, E. R.; GARDNER, D. G.; SAMSON, W. K. Natriuretic peptides. **N Engl J Med.** v. 339, p. 321–8, 1998.
- LI, J. M. et al. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. **Hypertension.** v. 40, p. 477–84, 2002.

- LI, T.; GUA, C.; WU, B.; CHEN, Y. Increased circulating trimethylamine N-oxide contributes to endothelial dysfunction in a rat model of chronic kidney disease. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 495, p. 2071-2077, 2017.
- LIOCHEV, S. I, FRIDOVICH, I. Lucigenin luminescence as a measure of intracellular superoxide dismutase activity in Escherichia coli. **Proc Natl Acad Sci USA.** 94, 2891-6, 1997.
- LISY, O. et al. Design, synthesis, and actions of a novel chimeric natriuretic peptide: CD-NP. **J Am Coll Cardiol.** v. 52, n. 1, p. 60-8, 2008.
- LISY, O. et al. Therapeutic actions of a new synthetic vasoactive and natriuretic peptide, Dendroaspis natriuretic peptide, in experimental severe congestive heart failure. **Hypertension.** v. 37, p. 1089-1094, 2001.
- LIU, C. et al. Glucocorticoids improve renal responsiveness to atrial natriuretic peptide by up-regulating natriuretic peptide receptor-A expression in the renal inner medullary collecting duct in decompensated heart failure. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 339, n. 1, p.203-9, 2011.
- LIU, C. et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).** v. 42, n. 6, p. 396-402, 2010.
- LIU, M. et al. Cardiovascular disease and its relationship with chronic kidney disease. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v. 18, n. 19, p. 2918-26, 2014.
- LIU, J. et al. Metabonomics revealed xanthine oxidase-induced oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Analytical and bioanalytical chemistry.** v. 407, n. 9, p. 2569–79, 2015.
- LIU, J. et al. Reactive Oxygen Species Modulation of Na/K-ATPase Regulates Fibrosis and Renal Proximal Tubular Sodium Handling. **International Journal of Nephrology.** v. 2012, p. 1–14, 2012.
- LONDON, G. Pathophysiology of cardiovascular damage in the early renal population. **Nephrol Dial Transplant.** v. 16, Suppl 2, p. 3-6, 2001.
- LOPERENA, R.; HARRISON, D. G. Oxidative Stress and Hypertensive Diseases. **Med Clin North Am.** v. 101, n. 1, p. 169-193, 2017.
- LOPES-PIRES, M. E. PKC and AKT Modulate cGMP/PKG Signaling Pathway on Platelet Aggregation in Experimental Sepsis. **PLoS One.** v. 10, n. 9, p. e0137901, 2015.
- LOPEZ-NOVOA, J. M.; MARTINEZ-SALGADO, C.; RODRIGUEZ-PEÑA, A. B.; HERNANDEZ, F. J. L. Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: Therapeutic perspectives. **Pharmacology and Therapeutics.** v. 128, n. 1, p. 61-81, 2010.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.
- MAACK, T. et al. Renal hemodynamic and natriuretic effects of atrial natriuretic factor. **Fed Proc.** v. 45, n. 7, p. 2128-32, 1986.

- MAFRA, D.; BURINI, R. C. The effects on the correction of metabolic acidosis with sodium bicarbonate on protein catabolism in chronic kidney failure. **Rev. Nutr.** v. 14, n. 1, p. 53-59, 2001.
- MAGALHAES, J.C.G. et al. Renal function in juvenile rats subjected to pre-natal malnutrition and chronic salt overload. **Experimental Physiology**. v. 91, n. 3, p. 611 - 619, 2006.
- MAHINRAD, S. et al. Natriuretic peptides in the central nervous system: Novel targets for cognitive impairment. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 68, p. 148-56, 2016.
- MALIK, M. et al. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. **Eur Heart J.** v. 17, p. 354-81, 1996.
- MARIN-GREZ, M.; FLEMING, J.T.; STEINHAUSEN, M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. **Nature.** 324, 473-6, 1986.
- MARTIN, F. L. et al. CD-NP: a novel engineered dual guanylyl cyclase activator with anti-fibrotic actions in the heart. **PLoS One.** v. 7, n. 12, p. e52422, 2012.
- MARTINS, J. P.; MONTEIRO, J. C.; PAIXÃO, A. D. Renal function in adult rats subjected to prenatal dexamethasone. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 30, p. 32-37, 2003.
- MATSUI, T. Purification and amino acid sequence of halastase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. **Eur. J. Biochem.** v. 252, n. 3, 569-75, 1998.
- MATSUKAWA, T.; MIYAMOTO, T. Angiotensin II-stimulated secretion of arginine vasopressin is inhibited by atrial natriuretic peptide in humans. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 300, p. R624–R629, 2011
- MCCULLOUGH, P.A. Clinical applications of B-type natriuretic peptide levels in the care of cardiovascular patients. **Minerva Cardioangiol.** v. 52, p. 479–489, 2004.
- MCDONALD, L. J.; MURAD F. Nitric oxide and cGMP signaling. **Adv Pharmacol.** v. 34, p. 263-75, 1995.
- MCDUGALL, J. G.; YATES N. A. Natriuresis and inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase: modulation of response by physiological manipulation. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** Suppl.25, p. S57-60, 1998.
- MCWILLIAM, A. et al. Laboratory tests of renal function. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine.** v. 10, n. 6, p. 296-99, 2009.
- MEEMS, L. M. G.; BURNETT, J. C. Jr. Innovative Therapeutics: Designer Natriuretic Peptides. **JACC: Basic to Translational Science.** v.1, n. 7, p. 557-567, 2016.
- MICHEL, G. H. Two N-terminally truncated forms of C-type natriuretic peptide from habu snake venom. **Peptides.** v. 21, n. 5, p. 609-15, 2000.

- MICHELL, B.J. et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. **J Biol Chem.** v. 276, p. 17625-8, 2001.
- MIMEAULT, M. et al., Evaluation of conformational and binding characteristics of various natriuretic peptides and related analogs. **Biochemistry.** v. 34, n. 3, p. 955-64, 1995.
- MOGHTADAEI, M.; POLINA, I.; ROSE, R. A. Electrophysiological effects of natriuretic peptides in the heart are mediated by multiple receptor subtypes. **Prog Biophys Mol Biol.** v. 120, n. 1-3, p. 37-49, 2016.
- MOGHTADAEI, M.; LANGILLE, E.; RAFFERTY, S.A.; BOGACHEV, O.; ROSE, R.A. Altered heart rate regulation by the autonomic nervous system in mice lacking natriuretic peptide receptor C (NPR-C). **Sci Rep.** 7, 17564, 2017.
- MONTES-RIVERA, J. et al. Effect of (-)-epicatechin on the modulation of progression markers of chronic renal damage in a 5/6 nephrectomy experimental model. **Heliyon.** 5, e01512, 2019.
- MONTES-RIVERA, J.O. et al. Apocynin combined with drugs as coadjuvant could be employed to prevent and/or treat the chronic kidney disease. **Ren Fail.** v. 40, p. 92-98, 2018.
- MORII N. et al. Decreased content in left atrium and increased plasma concentration of atrial natriuretic polypeptide in spontaneously hypertensive rats (SHR) and SHR stroke-prone. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 135, n. 1, p. 74-81, 1986.
- MORO, C., LAFONTAN, M. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 304, p. 358–68, 2013.
- MOSBAH, A. et al. Lebetin Peptides, A New Class of Potent Platelet Aggregation Inhibitors: Chemical Synthesis, Biological Activity and NMR Spectroscopic Study. DOI: 10.1007/s10989-019-09812-8. **Int J Pept Res Ther**, 2019.
- MUHAMMAD, J. et al. Molecular modeling and molecular dynamics simulation study of the human Rab9 and RhoBTB3 C-terminus complex. **Bioinformation.** v. 10, n. 12, p. 757-763, 2014.
- MUKOYAMA, M. et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. **J. Clin. Invest.** v. 87, p. 1402–1412, 1991.
- MÜNZEL, T. et al. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. **Circulation.** v. 108, n. 18, p. 2172-83, 2003.
- NAGUIB, R.E.; CONTANT, C.; CUPPLES, W.A. Atrial natriuretic factor, angiotensin II, and the slow component of renal autoregulation. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 72, n. 10, p. 1132-7, 1994.
- NAKAGAWA, H. et al. Brain Natriuretic Peptide Counteracting the Renin-angiotensin-aldosterone System in Accelerated Malignant Hypertension. **Am J Med Sci.** v. 352, n. 5, p. 534-539, 2016.

- NAKAMOTO, H. et al. Effects of cicletanine on the progression of renal failure in 5/6 nephrectomized hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v. 26, n. 3, p. 236-41, 1999.
- NATHISUWAN, S.; TALBERT, R. L. A review of vasopeptidase inhibitors: a new modality in the treatment of hypertension and chronic heart failure. **Pharmacotherapy**. v. 22, p. 27-42, 2002.
- NISHIKIMI, T. et al. Diversity of molecular forms of plasma brain natriuretic peptide in heart failure-different proBNP-108 to BNP-32 ratios in atrial and ventricular overload. **Heart**. v. 96, n. 6, p. 432-9, 2010.
- NITTA, K. et al. Risk factors for increased left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease: findings from the CKD-JAC study. **Clin Exp Nephrol**. v. 17, n. 5, p. 730-742, 2018.
- NOGUEIRA, A.; PIRES, M. J.; OLIVEIRA, P. A. Pathophysiological Mechanisms of Renal Fibrosis: A Review of Animal Models and Therapeutic Strategies. **In Vivo**. v. 31, n. 1, p. 1-22, 2017.)
- OBI, Y.; KIM, T.; KOVESDY, C.P.; AMIN, A.N.; KALANTAR-ZADEH, K. Current and Potential Therapeutic Strategies for Hemodynamic Cardiorenal Syndrome. **Cardiorenal Med**. 6, 83-98, 2015.
- O'CONNOR, C. M. Effect of nesiritide in patients with acute decompensated heart failure. **N Engl J Med**. v. 365, n. 1, p. 32-43, 2011.
- O'CONNOR, P. M. COWLEY, JR A. W. Medullary thick ascending limb buffer vasoconstriction of renal outer-medullary vasa recta in salt-resistant but not salt-sensitive rats. **Hypertension**. v. 60, p. 965-72, 2012.
- OGAWA, Y. Natriuretic Peptide Receptor Guanylyl Cyclase-A Protects Podocytes from Aldosterone-Induced Glomerular Injury. **J Am Soc Nephrol**. v. 23, p. 1198-1209, 2012.
- OHISHI, K.; HISHIDA, A.; HONDA, N. Direct vasodilatory action of atrial natriuretic factor on canine glomerular afferent arterioles. **Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol**. v. 255, p: F415-F420, 1988.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thio-barbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**. v. 95, n. 2, p. 351-8, 1979.
- ONDETTI, M. A; CUSHMAN D. W. Inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Biochemical**. p.165-204, 1981.
- OSLON, J. L. et. al. Altered glomerular selectivity and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass. **Kidney Int**. v. 22, p. 112-26, 1982.
- O'TIERNEY, P. F. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin II-stimulated proliferation in fetal cardiomyocytes. **J Physiol**. v. 588, n. Pt 15, p. 2879-89, 2010.
- PAIXÃO, A. D. O. et al. Age-dependent hypertension and renal sodium handling in the female intrauterine growth restricted rat. **The FASEB Journal**. v. 27. p. 907.11, 2013.

PAIXÃO, A. D. O. et. al. Regional Brazilian diet induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. **Biology of Neonate**. v, 80, p. 239-46, 2001.

PAIXÃO, A.D., FERREIRA, A.T., OSHIRO, M.E., RAZVICKAS, C.V., BOIM, M.A. SCHOR, N. Renal hemodynamic response to erythropoietin-induced polycythemia in 5/6 nephrectomised rats is different from normal rats. **Exp Nephrol**. v. 6, p. 245-52, 1998.

PALMER, L. G.; SCHNERMANN, J. Integrated control of Na transport along the nephron. **Clin J Am Soc Nephrol**. v. 10, p. 676-687, 2015.

PANDEY, K. N. Emerging roles of natriuretic peptides and their receptors in pathophysiology of hypertension and cardiovascular regulation. **J Am Soc Hypertens**. v. 2, p. 210–226, 2008.

PANKOW, K. et al. Structural substrate conditions required for neutral endopeptidase-mediated natriuretic peptide degradation. **J Mol Biol**. v. 393, p. 496–503, 2009.

PARIKH, J. D., HOLLINGSWORTH, K. G., WALLACE, D., BLAMIRE, A. M., MAC-GOWAN, G. A. Left ventricular functional, structural and energetic effects of normal aging: Comparison with hypertension. **PLoS One**. v. 12, n. 5, p. 0177404, 2017.

PELLIZZARO, M.C. e PANCHENIAK, E.F.R. Assistência farmacêutica no tratamento de doenças cardiovasculares e hipertensão. **Infarma** v. 15, n. 9-10, p.69-71, 2003.

PETI, W.; PAGE, R. Molecular basis of MAP kinase regulation. **Protein Sci**. v. 22, n. 12, p. 1698-710, 2013.

PINHEIRO, L. C.; TANUS-SANTOS, J. E.; CASTRO, M. M. The potential of stimulating nitric oxide formation in the treatment of hypertension. **Expert Opin Ther Targets**. v. 21, n. 5, p. 543-556, 2017.

POTTER, L. R. et al. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. **Handb Exp Pharmacol**. v. 191, p. 341–66, 2009.

RABKIN, S. W.; TSANG M. Y. The action of nitric oxide to enhance cell survival in chick cardiomyocytes is mediated through a cGMP and ERK1/2 pathway while p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathways do not alter cell death. **Exp Physiol**. v. 93, n. 7, p. 834-42, 2008.

RECTOR, F.C. JR.; BRUNNER, F.P.; SELDIN, D.W. Mechanism of glomerulotubular balance. I. Effect of aortic constriction and elevated ureteropelvic pressure on glomerular filtration rate, fractional reabsorption, transit time, and tubular size in the proximal tubule of the rat. **J Clin Invest**. v. 45, p. 590-602, 1996.

RIBEIRO, V.S., CABRAL, E.V., VIEIRA, L.D., AIRES, R.S., FARIAS, J.S., MUZI-FILHO, H., VIEYRA, A., PAIXÃO, A.D. Perinatal α -tocopherol overload programs alterations in kidney development and renal angiotensin II signaling pathways at birth and at juvenile age: Mechanisms underlying the development of elevated blood pressure. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**. 1864, 2458-2471, 2018.

ROCAFULL, M. A. et al. Isolation and cloning of the K⁺-independent, ouabain-insensitive Na⁺-ATPase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1808, n. 6, p. 1684–700, 2011.

- ROE, N.D., REN, J. Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases. **Vasc Pharmacol.** v. 57, p. 168–172, 2012.
- ROMERO, M. et al. Spontaneously Hypertensive Rats: Beneficial Renal Effects and Sex Differences. **PLoS ONE.** v. 10, n. 3, p. e0120362, 2015.
- RONCO, C.; DI LULLO, L. Cardiorenal Syndrome in Western Countries: Epidemiology, Diagnosis and Management Approaches. **Kidney Dis (Basel).** v. 2, n. 4, p. 151–163, 2017.
- ROSE, R. A. CD-NP, a chimeric natriuretic peptide for the treatment of heart failure. **Curr Opin Investig Drugs.** v. 11, n. 3, p. 349–56, 2010.
- ROSE, R.A.; GILES, W.R. Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. **J Physiol.** v. 586, p. 353–66, 2008.
- ROY, A.; KUCUKURAL A.; ZHANG Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols.** v. 5, p. 725–738, 2010.
- RUBATTU, S. Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. **Am J Hypertens.** v. 21, p. 733–41, 2008.
- SAHA, S. et al. Activation of natriuretic peptide receptor-C attenuates the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: implication of $\text{G}\alpha$ protein. **J Mol Cell Card.** v. 44, p. 336–44, 2008.
- SALERNO, J.C, et al. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by ERK phosphorylation at Ser⁶⁰². **Biosci. Rep.** v. 34, n. 5, p. 535–545, 2014.
- SANTOS-ARAÚJO C. et al. Local modulation of the natriuretic peptide system in the rat remnant kidney. **Nephrol Dial Transplant.** v. 24, p. 1774–82, 2009.
- SARNAK, M. J. et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. **Hypertension.** v. 42, n. 5, p. 1050–65, 2003.
- SARTORI, C. et al. Insulin, nitric oxide and the sympathetic nervous system: from crossroads to metabolic and cardiovascular homeostasis. **Rev Med Suisse Romande.** v. 124, n. 10, p. 635–8, 2004.
- SATA, Y.; HEAD, G.A.; DENTON, K.; MAY, C.N.; SCHLAICH, M.P. Role of the Sympathetic Nervous System and Its Modulation in Renal Hypertension. **Front Med (Lausanne).** v. 5, p. 28, 2018.
- SCAVONE, C. et al. Atrial natriuretic peptide modulates sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase through a mechanism involving cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 272, p. 1036–43, 1995.
- SCHINNER, E. Inhibition of the TGF β signalling pathway by cGMP and cGMP-dependent kinase I in renal fibrosis. **FEBS Open Bio.** v. 7, n. 4, p. 550–561, 2017.
- SCHIRGER, J. A. et al. Presence of Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. **Mayo Clin. Proc.** v. 74, p. 126–130, 1999.

- SCHRECK, C.; O'CONNOR, P. M. NAD(P)H oxidase and renal epithelial ion transport. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 300, n. 5, p. R1023-9, 2011.
- SCHULZ-KNAPPE, P.; FORSSMANN, K.; HERBST, F. Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. **Klin. Wochenschr.** v. 66, p. 752-759, 1988.
- SCHWEITZ, H. et al. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 13928–13932, 1992.
- SCOTLAND R. S.; AHLUWALIA A.; HOBBS A. J. C-type natriuretic peptide in vascular physiology and disease. **Pharmacol Ther.** v. 105, p. 85–93, 2005.
- SERAVALLE G.; GRASSI G. Obesity and hypertension. **Pharmacol Res.** v. 19, n. 122, p. 1-7, 2017.
- SHI, S. J. et al. Natriuretic peptide receptor A mediates renal sodium excretory responses to blood volume expansion. **Am J Physiol Renal Physiol**. v. 285, p. F694–702, 2003.
- SHIMIZU, T. et al. Dysnatremia in Renal Failure. **Contrib Nephrol.** v. 196, p. 229-236, 2018.
- SHONO, M. et al. Predominant effect of A-type natriuretic peptide on reduction of oxidative stress during treatment of patients with heart failure. **Circ J.** v. 71, p. 1040–6, 2007.
- SHOWALTER, C. J. et al. Renal response to atrial natriuretic factor is modulated by intrarenal angiotensin II. **Am J Physiol**. v. 254, p. R453–6, 1988.
- SILBERBERG, J. S. et al. Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end stage renal disease. **Kidney Int** v. 6, p. 286-900 1989.
- SILVA, P.A. et al. Mechanisms involving Ang II and MAPK/ERK1/2 signaling pathways underlie cardiac and renal alterations during chronic undernutrition. **PLoS One**. v. 9, p. e100410, 2014.
- SILVER, M.A., et al. B NP Consensus Panel 2004: a clinical approach for the diagnostic, prognostic, screening, treatment monitoring, and therapeutic roles of natriuretic peptides in cardiovascular diseases. **Congest. Heart Fail.** v. 10, p. 1–30, 2004.
- SINDIC, A. Current understanding of guanylin peptides actions. **ISRN Nephrol.** p. 813648, 2013.
- STELLAR, E.; EPSTEIN, A. N. Neuroendocrine factors in salt appetite. **J Physiol Pharmacol.** v. 42, n. 4, p. 345-55, 1991.
- STERNLICHT, H.; BAKRIS, G. L. The Kidney in Hypertension. **Med Clin North Am.** v. 101, n. 1, p. 207-217, 2017.
- SUGA, S. et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. **Endocrinology**. v. 130, p. 229–239, 1992.
- SUN, Y. et al Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **J Recept Signal Transduct Res.** v. 35, n. 6, p. 600-4, 2015.

- SUNDGREN, N. C. et al. Angiotensin II stimulates hyperplasia but not hypertrophy in immature ovine cardiomyocytes. **J Physiol**. v. 548, p. 881–891, 2003.
- SVÍGLEROVÁ, J. et al. Cardiovascular parameters in rat model of chronic renal failure induced by subtotal nephrectomy. **Physiol Res**. v. 59, Suppl 1:S81-8, 2010.
- TAGUCHI, K. Enhanced estradiol-induced vasorelaxation in aortas from type 2 diabetic mice may reflect a compensatory role of p38 MAPK-mediated eNOS activation. **Pflugers Arch**. v. 464, n. 2, p. 205-15, 2012.
- TAKAMI, Y., et al. Diagnostic and prognostic value of plasma brain natriuretic peptide in nondialysis-dependent CRF. **Am. J. Kidney Dis**. v. 44, 420–428, 2004.
- TANG, L. et al. Urolithin A alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt pathway. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 486, n. 3, p. 774-780, 2017.
- TANKUT, S. S.; YORUK, A.; BISOGNANO, J. D. Device-Directed Therapy for Resistant Hypertension. **Cardiol Clin**. v. 35, n. 2, p. 255-260, 2017.
- TANNEN, R. L. et al. Vasopressin-resistant hyposthenuria in advanced chronic renal disease. **N Engl J Med**. v. 280, n. 21, p. 1135–1141, 1969.
- TEIXEIRA, S. S. Molecular characterization of an acidic phospholipase A(2) from Bothrops pirajai snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Arch. Toxicol**. v. 85, n. 10, p. 1219-33, 2011.
- TERADA, Y. et al. PCR localization of C-type natriuretic peptide and B-type receptor mRNAs in rat nephron segments. **Am J Physiol**. v. 267, p. F215–22, 1994.
- THEILIG, F.; WU Q. ANP-induced signaling cascade and its implications in renal pathophysiology. **Am J Physiol Renal Physiol**. v. 308, n. 10, p. F1047-55, 2015.
- THOONEN, R. Pathophysiology of hypertension in the absence of nitric oxide/cyclic GMP signaling. **Curr Hypertens Rep**. v. 15, n. 1, p. 47-58, 2013.
- TOMINO, Y. Pathogenesis and treatment of chronic kidney disease: a review of our recent basic and clinical data. **Kidney Blood Press Res**. v. 39, n. 5, p. 450-89, 2014.
- TOURKI, B. et al. Lebetin 2, a Snake Venom-Derived Natriuretic Peptide, Attenuates Acute Myocardial Ischemic Injury through the Modulation of Mitochondrial Permeability Transition Pore at the Time of Reperfusion. **PLoSOne**. v. 11, p. e0162632, 2016.
- TRAYNOR, J. et al. How to measure renal function in clinical practice. **BMJ (Clinical research ed.)**. v. 333, n. 7571, p. 733-37, 2006.
- TROUGHTON, R.; MICHAEL FELKER G. JANUZZI J. L. JR. Natriuretic peptide-guided heart failure management. **Eur Heart J**. v. 35, n. 1, p. 16-24, 2014.
- TURNER, A. J.; ISAAC, R. E.; COATES, D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. **Bioessays**. v. 23, p. 261-9, 2001.
- VALENTIN, J. P. Plasma concentration of atrial natriuretic peptide after acute reduction in functioning renal mass in the rat. **Can J Physiol Pharmacol**. v. 75, n. 2, p. 153-7, 1997.

VELDKAMP, P. J. et al. Direct evaluation of the microvascular actions of ANP in juxtamedullary nephrons. **Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.** v. 254, p. F440–F444, 1988.

VIEIRA-FILHO, L. D. et al. Oxidative stress induced by prenatal LPS leads to endothelial dysfunction and renal haemodynamic changes through angiotensin II/NADPH oxidase pathway: Prevention by early treatment with α -tocopherol. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** v. S0925-4439, n. 18, p. 30354-5, 2018.

VIEIRA-FILHO, L. D. et al. Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium ATPases in offspring. **Clinical and experimental pharmacology & physiology.** v. 36, n. 12, p. 1157–63, 2009.

VIEYRA, A. et al. Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. **J Biol Chem.** v. 261, p. 4247-55, 1986.

VINK, S. et al. Natriuretic peptide drug leads from snake venom. **Toxicon.** v. 59, n. 4, p. 434-45, 2012.

VIVES, D. et al. Atrial natriuretic peptides and urodilatin modulate proximal tubule Na(+)-ATPase activity through activation of the NPR-A/cGMP/PKG pathway. **Peptides.** v. 31, n. 5, p. 903-8, 2010.

VODOVAR, N. et al., GREAT Network. High plasma B-type natriuretic peptide concentrations directly inhibit circulating neutral endopeptidase activity in heart failure. **J Am Coll Cardiol HF.** v. 3, p. 629–36, 2015.

WALFORD, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide in vascular biology. **J. Thromb. Haemost.** v. 1, p. 2112–2118, 2003.

WANG, Y. et al. Enhancing cGMP in experimental progressive renal fibrosis: soluble guanylate cyclase stimulation vs. phosphodiesterase inhibition. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 290, n. 1, p. F167-76 2006

WANG, Z. et al. Resveratrol ameliorates low shear stress-induced oxidative stress by suppressing ERK/eNOS^{Thr495} in endothelial cells. **Mol Med Rep.** v. 10, n. 4, p. 1964-72, 2014.

WANG, T., WEINBAUM, S., WEINSTEIN, A.M. Regulation of glomerulotubular balance: flow-activated proximal tubule function. **Pflugers Arch.** v. 469, p. 643-654, 2017.

WATANABE, G. et al. Angiotensin II activation of cyclin D1-dependent kinase activity. **J Biol Chem.** v. 271, p. 22570–22577, 1996.

WEBSTER, A. C. Chronic Kidney Disease. **Lancet.** v. 389, n. 10075, p.1238-1252, 2017.

WIJEYARATNE, C. N.; MOULT, P. J. The effect of alpha human atrial natriuretic peptide on plasma volume and vascular permeability in normotensive subjects. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 76, p. 343–346, 1993.

WINAVER, J. et al. ANP inhibits Na(+)-H⁺ antiport in proximal tubular brush border membrane: role of dopamine. **Kidney Int.** v. 38, n. 6, p. 1133-40, 1990.

- WONG, P. C.; GUO, J.; ZHANG, A. The renal and cardiovascular effects of natriuretic peptides. **Adv Physiol Educ.** v. 41, n. 2, p. 179–185, 2017.
- WOODARD, G. E; ROSADO, J. A. Natriuretic peptides in vascular physiology and pathology. **Int Rev Cell Mol Biol.** v. 268, p. 59–93, 2008.
- WOODMAN, O. L. Atrial natriuretic peptide prevents diabetes-induced endothelial dysfunction. **Life Sci.** v. 82, n. 15-16, p. 847-54, 2008.
- WU, C. et al. Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. **J Biol Chem.** v. 278, n. 28, p. 25847–25852, 2003.
- XIA, T. et al. Tirofiban induces vasorelaxation of the coronary artery via an endothelium-dependent NO-cGMP signaling by activating the PI3K/Akt/eNOS pathway. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 474, p. 599-605, 2016.
- XUE, M. L. et al. Carnitine Attenuates Cardiac Dysfunction by Ischemic Insults Through Akt Signaling Pathway. **Toxicol Sci.** v.160, n. 2, p. 341-350, 2017.
- YAMAMOTO, S.; KON, V. Mechanisms for increased cardiovascular disease in chronic kidney dysfunction. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** v. 18, n. 3, p. 181–188, 2009.
- YANDLE, T. G. Metabolic clearance rate and plasma half life of alpha-human atrial natriuretic peptide in man. **Life Sci.** v. 38, p. 1827–1833, 1986.
- YANG, H. C.; ZUO, Y.; FOGO, A. B. Models of chronic kidney disease. **Drug Discov Today Dis Models.** v. 7, n. 1-2, p. 13-19, 2010.
- YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic Acids Research.** v. 43, p. W174-W181, 2015.
- YASUE, H., YOSHIMURA, M. J. Natriuretic peptides in the treatment of heart failure. **Card Fail.** v. 2, n.4 p. S277-85, 1996.
- YEH, B. P. et al. Factors influencing sodium and water excretion in uremic man. **Kidney Int.** v. 7, n. 2, p. 103–110, 1975.
- YOSHIZUMI, M. et al. Effect of endothelin-1 (1–31) on extracellular signal-regulated kinase and proliferation of human coronary artery smooth muscle cells. **Br J Pharmacol.** v. 125, p. 1019–1027, 1998.
- YU, Q.; GAO, F.; MA, X. L. Insulin says NO to cardiovascular disease. **Cardiovasc Res.** v. 89, p. 516–24, 2011.
- ZAKERI, R.; BURNETT, J. C. Designer natriuretic peptides: a vision for the future of heart failure therapeutics. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 89, n. 8, p. 593-601, 2011.
- ZATZ, R. Fisiopatologia Renal. São Paulo: **Atheneu.** 2002.
- ZEIDEL, M. L. Renal actions of atrial natriuretic peptide: regulation of collecting duct sodium and water transport. **Annu Rev Physiol.** v. 52, p. 747-59, 1990.
- ZHANG, C.; FREDDOLINO, P. L.; ZHANG, Y. COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein–protein interaction information. **Nucleic Acids Research.** v. 45, p. W291-W299, 2017.

ZHANG, H. Glucagon-like peptide-1 protects cardiomyocytes from advanced oxidation protein product-induced apoptosis via the PI3K/Akt/Bad signaling pathway. **Mol Med Rep.** v. 13, n. 2, p.1593-601, 2016.

ZHANG, Y.; XU, X.; REN, J. MTOR overactivation and interrupted autophagy flux in obese hearts: a dicey assembly? **Autophagy.** v. 9, p. 939–41, 2013.

ZHANG, C., IMAM, S.Z., ALI, S.F.,MAYEUX, P.R. Peroxynitrite and the regulation of Na^+/K^+ -ATPase activity by angiotensin II in the rat proximal tubule. **Nitric Oxide.** v. 7, p. 30-5, 2002.

ZHAO, J.; LI L.; PENG L. MAPK1 up-regulates the expression of MALAT1 to promote the proliferation of cardiomyocytes through PI3K/AKT signaling pathway. **Int J Clin Exp Pathol.** v. 8, n. 12, p. 15947-53, 2015.

ZIMMERMANN, S. MOELLING K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). **Science.** v. 286, n. 5445, p. 1741-4, 1999.

ANEXO



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 21 de setembro de 2015

Ofício nº 88/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof.^a Ana Durce Oliveira da Paixão
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.016262/2015-01

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **"Veneno da crotalus durissus cascavella efeitos de um peptídeo natriurético na hipertensão em ratos."**

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia; Animal; rato heterogêneo; Linhagem; Wistar; idade; 90 dias; peso; 250-300g; Sexo; macho; nº de animais a ser utilizado; 40

Atenciosamente

 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584